Molekulare Charakterisierung des CDC5-Proteins von Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) und Analyse seiner Interaktion mit dem "Potato spindle tuber viroid" (PSTVd)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christina Timmermann
aus Hamburg

Hamburg 2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. U. WIENAND
Tag der Disputation: 21. Dezember 2007

Hamburg, den 09. Dezember 2007

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **1**

1. Einleitung **3**

1.1 Viroide 3

1.1.1 Geschichtliche Einführung 3

1.1.2 Symptome und wirtschaftliche Bedeutung von Viroidinfektionen 3

1.1.3 Ursprung der Viroide 8

1.1.4 Struktur 9

1.1.5 Klassifizierung 14

1.1.6 Replikation 15

1.1.7 Transport 17

1.1.8 Pathogenität 19

1.2 Mit PSTVd interagierende Proteine 21

1.3 Zielsetzung 23

2. Material und Methoden **24**

2.1 Material 24

2.1.1 Pflanzenmaterial 24

2.1.2 Bakterienstämme 24

2.1.3 Hefestämme 24

2.1.4 Chemikalien und Lösungen 25

2.1.5 Enzyme 25

2.1.6 Kits 25

2.1.7 Vektoren 26

2.1.8 Oligonukleotide 26

2.1.9 Antikörper 30

2.2 Methoden 30

2.2.1 Anzucht der Versuchspflanzen 30

2.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden 30

2.2.2.1 Phenol / Chloroform-Extraktion 30

2.2.2.2 Nukleinsäurefällung 31

2.2.2.3 Isolierung genomischer DNA 31

2.2.2.4 RNA-Extraktion aus pflanzlichen Geweben 32

2.2.2.5 DNA-Verdau 33

2.2.2.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	33
2.2.2.7	mRNA-Isolation aus Gesamt-RNA	35
2.2.3	Genom-Analysen	35
2.2.3.1	PCR (Polymerase-Chain-Reaction)	35
2.2.3.2	RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)	36
2.2.3.3	"RACE" (Rapid Amplification of cDNA Ends)	36
2.2.3.4	"Genome-Walk"	37
2.2.3.5	Aufreinigung von PCR-Produkten	38
2.2.3.6	Klonierungsstrategien	38
2.2.3.7	Transformation von Klonierungsprodukten in *E.coli*	40
2.2.3.8	PCR-Analyse rekombinanter Plasmide	40
2.2.3.9	Isolierung von Plasmid-DNA	40
2.2.3.10	Restriktionsanalyse isolierter Plasmid-DNA	42
2.2.3.11	Sequenzierung von rekombinanten Plasmiden und PCR-Produkten	42
2.2.3.12	Computerauswertung der Sequenzen	43
2.2.3.13	Herstellung von RNA-Hybridisierungssonden	43
2.2.3.14	Northern-Blot-Analysen	45
2.2.3.15	Southern-Blot-Analysen	45
2.2.3.16	Hybridisierung	46
2.2.3.17	Detektion	46
2.2.3.18	"Stripping" - Entfernen einer Dig-markierten RNA-Sonde von Northern-Blot Membranen	47
2.2.3.19	Primer-Extension	47
2.2.4	Promotorstudien	50
2.2.4.1	Herstellung von cdc5-Promotor / GFP-Konstrukten	50
2.2.4.2	Anzucht von Tomatenpflanzen zur Protoplastenisolation	51
2.2.4.3	Isolation von Mesophyllprotoplasten	51
2.2.4.4	DNA-Transfer in Mesophyllprotoplasten von *Solanum lycopersicum* L.	52
2.2.4.5	Auswertung der Transformationsergebnisse	53
2.2.5	Tri-Hybrid-Studien	53
2.2.5.1	Transformation des Hefestammes CG-1945	53
2.2.5.2	Analyse der RNA-Protein Interaktion	56
2.2.5.3	RNA-Extraktion aus Hefe	57

2.2.5.4 Proteinextraktion aus Hefe 58
2.2.5.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE) 59
2.2.5.6 Färbung von SDS-PAA-Gelen 60
2.2.5.7 Western-Blot-Analysen 61
2.2.5.8 Ponceau-S-Färbung 61
2.2.5.9 Immunodetektion 62
2.2.6 "Gel-Shift"-Analysen 62
2.2.6.1 Proteinexpression und Aufreinigung 63
2.2.6.2 Ethanolfällung von Proteinen 63
2.2.6.3 Viroid-RNA-Isolation aus Gesamt-RNA von infizierten Pflanzen 63
2.2.6.4 "Gel-Shift" 64
3. Ergebnisse **65**
3.1. Physikalische Charakterisierung des cdc5-homologen Gens der Tomate 65
3.1.1 5'-"RACE"-Analysen (Rapid Amplification of cDNA Ends) 65
3.1.2 Die cdc5-cDNA von *Sl* Goldkugel und *Sl* Micro-Tom 69
3.1.3 Genomische Analyse von *Sl*cdc5 70
3.1.3.1 Genomische Sequenzierung von *Sl*cdc5 und Analyse der Introns 70
3.1.3.2 Analyse des 5' und 3' nicht kodierenden Bereiches (UTR) über "Genome-Walk" 72
3.1.3.3 Analyse des *Sl*cdc5 Promotors durch "Primer-Extension" 76
3.1.4 Vergleichende Betrachtung der cdc5-Gene von *Nicotiana rustica* L. und *Solanum tuberosum* L. 80
3.2 Funktionsanalyse des cdc5-Promotors 81
3.3 Bindungsstudien zum Nachweis einer Interaktion des CDC5-Proteins mit PSTVd 85
3.3.1 Das Tri-Hybrid-System nach Putz *et al*. (1996) 85
3.3.1.1 Nachweis der Transkripte von cdc5 und PSTVd mittels Northern-Blot-Analysen 91
3.3.1.2 RT-PCR zum Nachweis der cdc5-spezifischen Transkripte 93
3.3.1.3 Hybridisierung von isolierter poly (A^+)-RNA mit cdc5-spezifischer Sonde 94
3.3.1.4 Nachweis der GAL4-AD/CDC5-Fusionsproteine über Western-Blot-Analysen 97
3.3.2 "Gel-Shift"-Analysen 99

4. Diskussion **103**
4.1 Charakterisierung von CDC5-homologen Proteinen 103
4.1.1 Struktur der CDC5-homologen Proteine 103
4.1.2 Funktion CDC5-homologer Proteine 104
4.2 Das CDC5-Homolog der Tomate (*Sl*CDC5) 106
4.2.1 Identifikation und funktionelle Charakterisierung des *Sl*CDC5-Promotors 110
4.3 Analysen zur Bedeutung des C-terminalen Bereiches von *Sl*CDC5 111
4.3.1 Bindungsstudien 111
4.4 Putative Funktion des *Sl*CDC5 in der Pathogenese von Viroiderkrankungen 113
5. Zusammenfassung **115**
6. Literaturverzeichnis **117**
7. Anhang **131**
7.1 Sequenzen 131
7.1.1 Sequenzen der Tomate 131
7.1.1.1 DNA-Sequenz des *Sl*cdc5 und flankierende Bereiche 131
7.1.1.2 Intronsequenzen des *Sl*cdc5 132
7.1.1.3 Aminosäuresequenz von *Sl*CDC5 133
7.1.2 Sequenzen des Tabak 133
7.1.2.1 Partielle cDNA-Sequenz von *Nr*cdc5 133
7.1.2.2 Partielle Aminosäuresequenz von *Nr*CDC5 134
7.1.3 Sequenzen der Kartoffel 134
7.1.3.1 Aminosäuresequenz von *St*CDC5 134
7.2 Längenmarker 135
7.2.1 DNA-Längenmarker 135
7.2.2 RNA-Längenmarker 135
7.2.3 Proteinmarker 135
7.3 Vektoren 136
7.3.1 Vektoren für die Klonierung von PCR- und RT-PCR-Produkten 136
7.3.2 Plasmid des Viroid-Klons pRW 58 137
7.3.3 Expressionsvektoren 137
7.3.4 Tri-Hybrid Vektoren 138
Danksagung **139**
Erklärung **141**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASBVd	"Avocado sunblotch viroid"
ASSVD	"Apple scar skin viroid"
At	*Arabidopsis thaliana*
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C-	Carboxy-
CCCVd	"Coconut cadang cadang viroid"
CChMVd	"Chrysanthemum chlorotic mottle viroid"
CDC	"Cell Division Cycle"
cDNA	"copy" Deoxyribonukleinsäure
CEVd	"Citrus exocortis viroid"
CSVd	"Chrysanthemum stunt viroid"
cv.	"cultivar", Kultursorte
DEPC	Diethylpyrocarbonsäure
Dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
GTC	Guanidinthiocyanat
his	Histidin
HSVd	"Hop stunt viroid"
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton

LB	Luria Bertani
Le	*Lentinula edodes*
leu	Leucin
Lsg.	Lösung
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
N-	Amino-
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NLS	"Nuclear localisation signal" Kern-Lokalisations-Sequenz
Nr	*Nicotiana rustica*
nt	Nukleotid
NTP	Ribonukleotide
ORF	"Open Reading Frame", offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLMVd	"Peach latent mosaic viroid"
PSTVd	"Potato spindle tuber viroid"
RACE	"Rapid Amplification of cDNA Ends"
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Sc	*Schizosaccharomyces cerevisiae*
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sl	*Solanum lycopersicum* L.
Sp	*Schizosaccharomyces pombe*
SSC	Standard Salz Citrat
St	*Solanum tuberosum* L.
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TP-reich	Threonin/Prolin-reich
trp	Tryptophan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	"Unit", Enzymeinheit
upm	Umdrehung pro Minute

v/v	Volumen / Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indodyl-β-D-Galactopyranosid

1. Einleitung

1.1 Viroide

1.1.1 Geschichtliche Einführung

1922 wurde in Nordamerika eine Erkrankung der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) beschrieben, deren Phänotyp sich durch Stauchung der Internodien sowie spindelartige Verformungen der Kartoffelknolle auszeichnete. Da die als Spindelknollensucht bezeichnete Erkrankung nicht mit Bakterien oder anderen Mikroorganismen in Verbindung gebracht werden konnte, galt es als wahrscheinlich, dass ein Virus das kausale Agens sein müsste. Im Jahre 1962 wurde gezeigt, dass sich der Erreger der Spindelknollensucht mechanisch auf junge Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum* L.) übertragen ließ, wobei charakteristische Symptome wie Stauchung, epinastische Verformungen der Blätter sowie Nekrosen bereits nach zwei Wochen an den Indikatorpflanzen zu beobachten waren (Raymer & O'Brian, 1962). In den späten sechziger Jahren konnten Raymer und Diener durch Dichtegradienten-zentrifugation und Enzymtests feststellen, dass es sich bei dem Erreger um "nackte" RNA handelt, die im Gegensatz zu Viren nicht von einer Proteinhülle umgeben ist (Diener & Raymer, 1967; Raymer & Diener; 1969). Gelelektrophoretische Untersuchungen ergaben zudem, dass das RNA-Molekül mit einem Molekulargewicht von ca. 130 000 im Verhältnis zu einem Virus sehr klein ist (Diener, 1971; Diener 1973). Da sich der Erreger der Spindelknollensucht erheblich von den Viren unterschied, schlug Diener 1971 vor, eine neue unter den Viren stehende Klasse von Krankheitserregern einzuführen und diese "Viroide" (virusähnlich) zu nennen (Diener, 1971).

1.1.2 Symptome und wirtschaftliche Bedeutung von Viroidinfektionen

In den folgenden Jahren konnte eine Vielzahl von Infektionskrankheiten auf Viroide als kausales Agens zurückgeführt werden. Hierbei zeigt sich, dass das Wirtsspektrum der Viroide ausschließlich auf höhere Pflanzen beschränkt ist. Auch bei Menschen und Tieren konnte bisher keine Übertragung von Viroiden beobachtet werden. Besonders landwirtschaftliche Nutzpflanzen wie Kartoffeln, Tomaten, Hopfen, Kokosnuss, Weintrauben, verschiedene Obstgehölze wie Zitrus, Avocado, Pfirsich, Apfel, Birne und Pflaume, Zierpflanzen wie Chrysanthemen und das Buntblatt (*Coleus blumei*) sind von Viroiderkrankungen betroffen (Flores *et al.*, 1998). Krankheitssymptome treten an Blätter (Chlorosen, epinastische Verformungen, Nekrosen), Spross (Stauchung der Internodien), Rinde (Wucherungen, Bruch), Blüten (Reduktion der Größe, Verblassen der Färbung), Früchte (Verblassen der

Färbung, Deformationen, Rissbildung), Saat (Reduktion in Größe, vergrößerte Steine) sowie an Speicherorganen auf (Deformationen) (Abb. 1.1). Des Weiteren können an Pflanzen deutliche Verzögerungen in der Blattentwicklung, der Blüte sowie der Reifung von Früchten beobachtet werden. Die Symptomausprägung bei unterschiedlichen Pflanzenspezies variiert von "severe", über "intermediate" und "mild" bis hin zum völligen Ausbleiben von phänotypisch erkennbaren Symptomen.

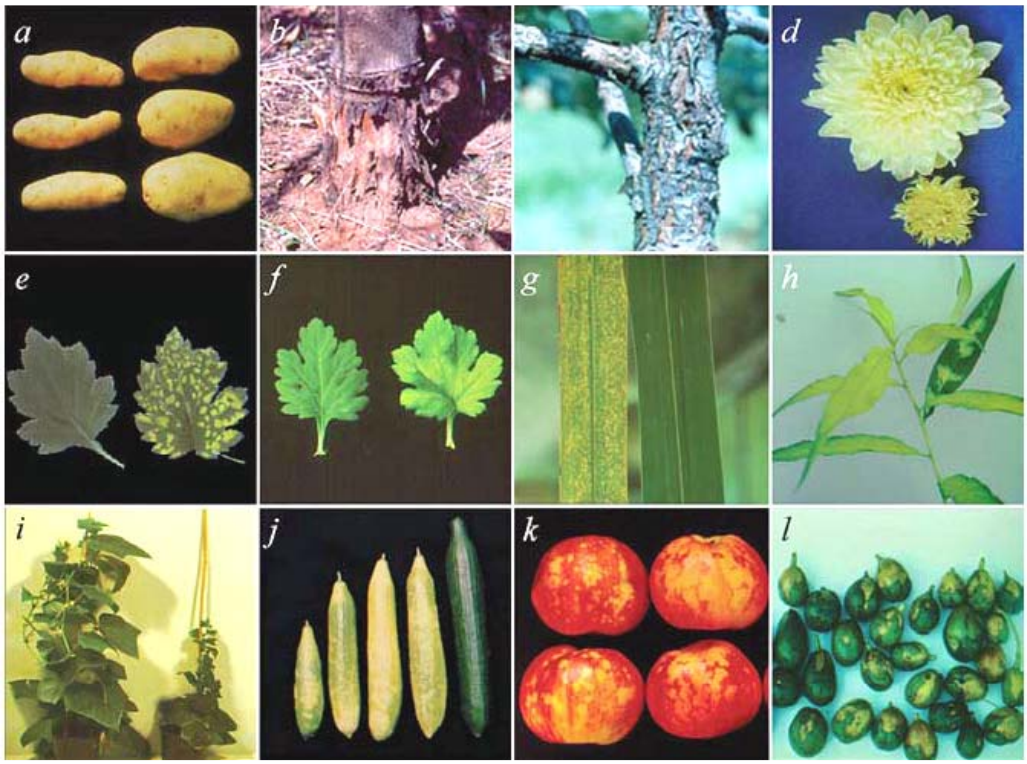


Abb. 1.1: Symptomausprägung nach einer Viroidinfektion (Flores *et al.*, 2005). a) Spindelartige Verformung der Kartoffelknolle nach Infektion mit PSTVd (links), und Knollen gesunder Kontrollpflanzen (rechts). **b)** Symptome einer CEVd-Infektion am Wurzelstock einer Orange. **c)** Auswirkungen einer PBCVd-Infektion am Pfirsich A20. **d)** Symptome an Blüten der Chrysantheme nach Infektion mit CSVd (unten), und Blüte einer gesunden Kontrollpflanze (oben). **e)** Symptome an Blättern von Chrysanthemen nach Infektion mit CSVd (rechts), Blatt einer gesunden Kontrollpflanze (links). **f)** nach einer Infektion mit CChMVd auftretende Symptome an Blättern der Chrysantheme (rechts), Blatt einer gesunden Kontrollpflanze links. **g)** Blattsymptome nach Infektion mit CCCVd an Kokospalmen (links), Blatt einer gesunden Kontrollpflanze (rechts). **h)** Blattchlorosen nach Infektion von Pfirsichpflanzen mit PLMVd. **i)** Stauchung der Internodien an Gurkenpflanzen nach Infektion mit HSVd (rechts), gesunde Kontrollpflanze (links). **j)** Auswirkung einer HSVd-Infektion auf Gurken, gesunde Kontrolle (rechts). **k)** Symptome an Äpfeln nach Infektion mit ASSVd. **l)** ASBVd-Symptome an Avocadofrüchten.

Durch Reduktion von Qualität und Quantität können Viroiderkrankungen zu erheblichen Ertragseinbußen führen, wodurch der signifikante Einfluss dieser Erreger auf die weltweite Agrarwirtschaft deutlich wird (Mühlbach, 1987; Garnsey & Randles, 1987).

So entwickelte sich in den USA die Stauchekrankheit von Chrysanthemen, ausgelöst durch das "Chrysanthemum stunt viroid" (CSVd), in der Zeit von 1945 - 1947 zu einer ernsthaften Epidemie (Hollings & Stone, 1970). Ein weiterer Ausbruch 1987 in Australien bereitete

darüber hinaus der nationalen Chrysanthemen-Industrie einen Verlust von über 3 Millionen AU-$. Als noch verheerender sind die Auswirkungen nach einer Infektion von Kokospalmen mit dem "Coconut cadang cadang viroid" (CCCVd) und "Coconut tinangaja viroid" (CTiVd) zu bezeichnen (Abb. 1.2), die seit mehr als 85 Jahren auf den Philippinen und Guam beobachtet werden. Seit 1950 starben aufgrund dieser Infektionen jährlich 200.000 - 500.000 Kokosnusspflanzen, welches einer Gesamtzahl von 4 x 10^7 seit Beginn der Aufzeichnungen entspricht (Randles, 2003).

Abb. 1.2: Phänotypisch erkennbare Symptome an Kokospalmen und Nüssen nach Infektion mit CCCVd (aus Randles & Rodriguez, 2003). a) Links: asymptomatisches Blatt, rechts: gelb gepunktete Blätter charakteristisch nach Infektion mit CCCVd. **b)** "Brooming"-Symptom, resultierend aus limitierter Lamina-Entwicklung. **c)** Links: Reduktion der Hülse, sowie Rundung und äquatoriale Vernarbung der Nuss als Folge der CCCVd-Infektion, rechts: asymptomatische Nuss.

Da eine infizierte Pflanze bereits 5 Jahre vor dem vollständigen Absterben die Produktion von Kokosnüssen beendet und eine Ersatzpflanze erst im Alter von 5 bis 8 Jahren volle Produktivität erreicht, entsteht eine Produktionslücke von 10 - 13 Jahren. Pro infizierter Pflanze entspricht dieses einem Verlust von ca. 100 US-$ und einem jährlichen Gesamtverlust von 20 - 50 Millionen US-$ (Randles, 1987). Hierbei ist zu beachten, dass neue, alternative Nutzungen von Kokospalmen nicht in dieser Berechnung berücksichtigt worden sind,

wodurch diese Zahlen als "Minimalverlust" zu verstehen sind, schließlich ist der Wert einer Kokospalme als Zierpflanze in Alleen und Parkanlagen mit 700 - 1000 US-$ notiert.
Eine Erhebung in Nord-Amerika zeigte, dass der durch PSTVd hervorgerufene Ernteverlust, bei Kartoffelpflanzen jährlich 1 % entspricht. Auf den ersten Blick scheint dieses ein geringer Prozentsatz zu sein, wird allerdings die Wichtigkeit der Kartoffel als Grundnahrungsmittel berücksichtigt, so sind die Ertragseinbußen doch erheblich (Randles, 2003). In Zahlen gesehen wurde somit für den Zeitraum 1988 - 1990 in den USA ein Verlust von 197.850 Tonnen verzeichnet (Oerke, 1994).

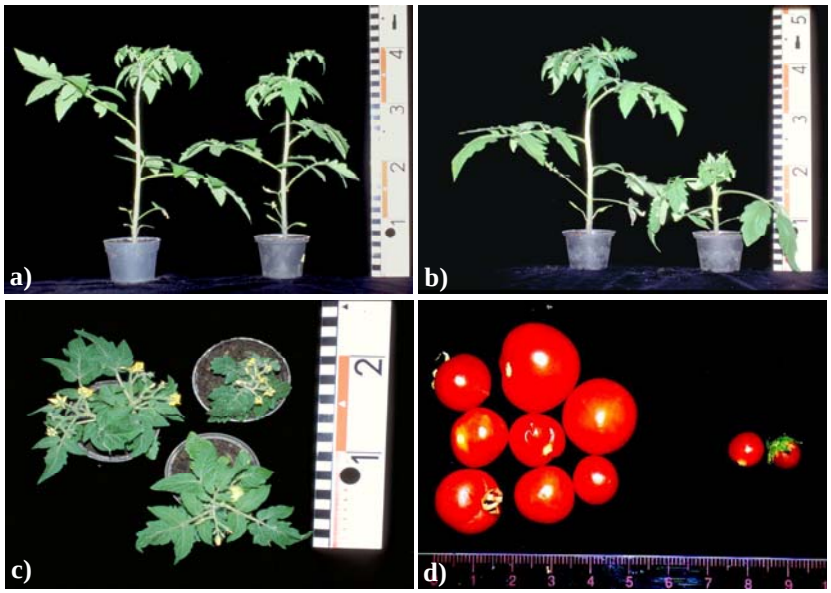


Abb. 1.3: Phänotypisch erkennbare Symptome einer PSTVd-Infektion an Tomaten. a) Tomatenpflanzen der symptomtoleranten Kultursorte Goldkugel 20 Tage (p.i.). Links: scheininfizierte Kontrollpflanze, rechts: PSTVd-infizierte Pflanze. **b)** Tomatenpflanzen der symptomsensitiven Kultursorte Rutgers 20 Tage (p.i.). Links: scheininfizierte Kontrollpflanze, rechts: PSTVd-infizierte Pflanze. **c)** Tomatenpflanzen der symptomsensitiven Mutante "Micro-Tom" 40 Tage (p.i.). Oben: PSTVd-infizierte Pflanze, links: scheininfizierte Kontrollpflanze, unten: unbehandelte Pflanze. **d)** Früchte der symptomsensitiven Tomatenmutante "Micro-Tom". Links: Früchte der scheininfizierten Kontrollpflanze, rechts: Früchte der PSTVd-infizierten Pflanze.

Nicht nur bei Kartoffeln, sondern auch bei Tomaten (siehe Abb. 1.3) und Zierpflanzen ist das PSTVd eine aktuelle Bedrohung. So trat im Juni 2006 das PSTVd in den Niederlanden erstmals an Zierpflanzen der Familie der *Solanaceae* auf. Zunächst handelte es sich um *Solanum jasminoides* später auch um *Brugmansia*-Arten. Ein flächendeckendes "Monitoring" aller Betriebe in den Niederlanden, die *Solanum jasminoides*, *S.* (*Lycianthes*) *rantonnetii* und *Brugmansien* produzieren, ergab, dass PSTVd weit verbreitet ist. In der Zwischenzeit wurde auch in anderen EU-Mitgliedstaaten PSTVd an *Solanaceen*-Zierpflanzen festgestellt. Bei den PSTVd-infizierten Zierpflanzen handelt es sich stets um latenten, d. h. symptomlosen Befall, jedoch kann eine Übertragung des PSTVd von symptomlosen Zierpflanzen auf Kartoffel- und

Tomatenbestände nicht ausgeschlossen werden. Obwohl Deutschland als PSTVd-frei gilt (nur drei Ausbrüche in den letzten Jahren), muss in Anbetracht der Vorkommnisse in anderen EU-Staaten von einer prekären Lage ausgegangen werden (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft 2006, www.lfl.byern.de). Als Antwort hierauf ist die Veröffentlichung der Kommissionsentscheidung 2007/410/EG des Berliner Pflanzenschutzamtes vom 15.06.07 zu sehen (www.bba.bund.de). Hierin wurde festgelegt, dass zur Anpflanzung bestimmte Pflanzen der Gattung *Brugmansia spp.* und der Art *Solanum jasminoides* sowie deren Saatgut nur in die Gemeinschaft eingeführt oder innerhalb der Gemeinschaft verbracht werden dürfen, wenn sie von einem Pflanzengesundheitszeugnis (PGZ) oder einem Pflanzenpass begleitet sind.

1.1.3 Ursprung der Viroide

Die Frage der Herkunft bzw. Abstammung von Viroiden konnte bis zum heutigen Tag nicht aufgeklärt werden. Erste Annahmen bezüglich der Verwandtschaft zu Viren, d.h. Viroide könnten als primitive Vorläufer von Viren (Diener, 1979 a, b; Diener, 1999) oder als hoch degenerierte virale RNAs angesehen werden (Diener, 1971; Matthews, 1992), scheinen unwahrscheinlich. Fehlende Sequenzhomologien zu Viren, die völlig neuartige molekulare Struktur und der Mangel an Protein-kodierender Kapazität, implizieren eine deutlich größere phylogenetische Distanz (Diener, 1996). Die Hypothese einer *de novo* Synthese in Pflanzenkulturen, z.B. hervorgerufen durch Mutationen von zellulären RNAs scheint ebenfalls kritisch, da keine Viroid-homologen Sequenzen im Genom der verschiedenen Wirtspflanzen identifiziert werden konnten (Zaitlin *et al.*, 1980; Branch & Dickson, 1980; Hadidi *et al.*, 1981).

Seit der Entdeckung von Introns wurde über eine strukturelle, funktionelle und evolutionäre Verbindung zwischen Viroiden und Introns spekuliert (Diener, 1971). Da PSTVd zu dem damaligen Zeitpunkt als einziger Vertreter zirkuläre RNA bekannt war, postulierte Roberts und später Crick, dass Introns und Viroide als Regulatoren in der Zelle fungieren (Roberts, 1978; Crick, 1979). Aufgrund von Sequenzhomologien zwischen PSTVd und dem 5'-Terminus der snRNA U1 (Bestandteil des Spliceosomens) stellte Diener daher 1981 die Behauptung auf, dass es sich bei den Viroiden um "escaped" Introns handeln könnte (Diener, 1981). Darüber hinaus wurde nach der Entdeckung von autokatalytisch "splicenden" Introns deutlich, dass eine Vielzahl von Viroiden Sequenzen beinhalten, die konservierten Bereichen der Introngruppe I ähneln (Dinter-Gottlieb, 1986). Obwohl mittlerweile auszuschließen ist, dass den Intron I homologen Sequenzen eine funktionelle Rolle während der Prozessierung

von Viroiden zukommt, kann eine mögliche evolutionäre Verbindung von Viroiden und Introns nicht ausgeschlossen werden (Diener, 1996).

Kiefer vertrat 1983 die Ansicht, dass Viroide über Deletion interner Bereiche von transponierenden Elementen oder retroviralen Proviren abstammen (Kiefer *et al*., 1983). Diese Annahme wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass Sequenzbereiche von Mitgliedern der PSTVd-Gruppe große Ähnlichkeit mit den Enden von Transposons aufweisen (Kiefer *et al*., 1983). Allerdings könnten auch diese Übereinstimmungen 1. rein zufällig, 2. die Konsequenz einer konvergenten Evolution resultierend aus ähnlicher Funktion und 3. auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen sein (Diener, 1996). Jedoch, betrachtet man die geringe Größe von Viroiden, ihre zirkuläre Struktur und vor allem die Fähigkeit einiger Vertreter zur autokatalytischen Prozessierung, kann nicht außer Beachtung gelassen werden, dass es sich bei Viroiden möglicherweise um molekulare Fossilien der RNA-Welt handelt, welche vermutlich vor dem zellulären Leben auf der Erde existierten (Diener, 1989; Flores, 1998).

1.1.4 Struktur

Viroide bestehen aus kovalent geschlossenen, zirkulären RNA-Molekülen, deren Kettenlänge sich zwischen 246 und 401 Nukleotiden (nt) bewegen (Daròs *et al.*, 2006). Intramolekulare Basenpaarungen, die aus der hohen Selbstkomplementarität des Viroidmoleküls resultieren, lassen alle Viroide in doppelsträngiger Gestalt erscheinen (Sänger *et al*., 1976). Allerdings grenzen sich Viroide in struktureller Hinsicht deutlich voneinander ab, sodass eine Einteilung ihrer Vertreter in zwei Familien, den P*ospiviroidae* und den *Avsunviroidae,* erfolgte (siehe 1.1.5).

Da sich diese Arbeit experimentell ausschließlich mit dem "Potato spindle tuber viroid" befasst, dem Hauptvertreter der *Pospiviroidae*, soll im Folgenden der Schwerpunkt in der Betrachtung dieser Viroidfamilie liegen.

Pospiviroidae

1978 wurde von Hans J. Gross und Mitarbeitern die vollständige Sequenz des Potato spindle tuber viroids aufgeklärt, die aus 359 nt besteht (Abb. 1.4). Hierbei zeigte sich, dass das RNA-Molekül kein eukaryotisches AUG-Startcodon, lediglich ein prokaryotisches GUG-Startcodon aufwies. Alle vorkommenden offenen Leserahmen (ORFs) sind durch das Auftreten von mehreren Stopcodons sehr klein, wodurch man zu der Schlussfolgerung gelangte, dass Viroide keine Protein-kodierende Kapazität besitzen (Gross *et al.*, 1978). PSTVd wie alle

Pospiviroidae nimmt aufgrund der Ausbildung von doppelsträngigen Helices, die zwei bis neun Basenpaare enthalten, eine unverzweigte stäbchenförmige Struktur ein, die nur durch kurze ungepaarte Bereiche ("loops") unterbrochen wird.

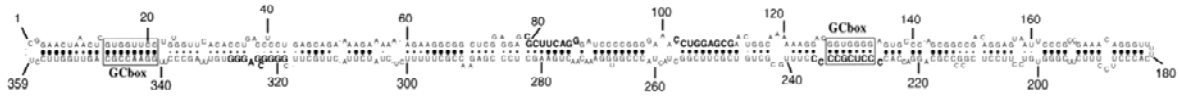


Abb. 1.4: Nukleotidsequenz und Sekundärstruktur des Potato spindle tuber viroids (aus Steger & Riesner, 2003, modifiziert).

Darüber hinaus verleiht der hohe Anteil an G/C-Paarungen dem Molekül eine hohe thermodynamische Stabilität (Steger & Riesner, 2003).

Nach Charakterisierung von verschiedenen PSTVd-ähnlichen Viroiden, wurde über vergleichende Analyse von Kees und Symons 1985 ein Modell vorgeschlagen, welches das hantelförmige Molekül in fünf strukturelle / funktionelle Domänen unterteilt (Kees & Symons, 1985). Da diese Domänen in Korrelation mit wichtigen biologischen Funktionen stehen, soll hier eine nähere Betrachtung erfolgen (Abb. 1.5).

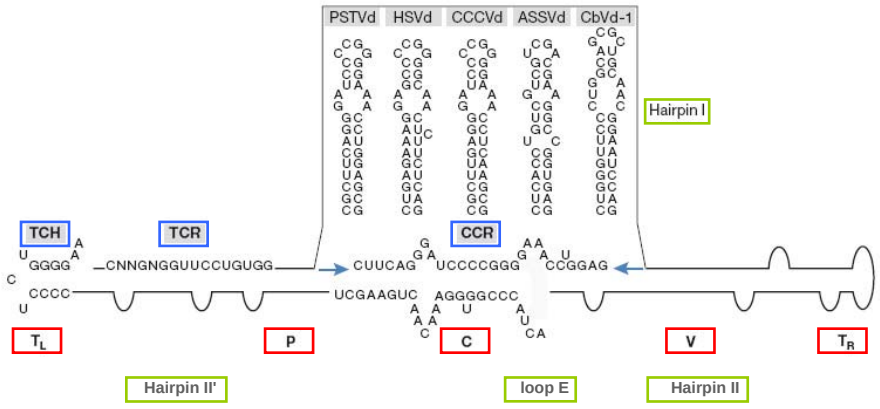


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der genomischen Struktur von *Pospiviroidae* (aus Daròs *et al.*, 2006, modifiziert). Rot: fünf charakteristische Domänen. **T_L:** linke terminale Domäne. **P:** Pathogenitäts Domäne. **C:** Zentrale Domäne. **V:** variable Domäne. **T_R:** rechte terminale Domäne. **Blau:** konservierte Sequenzbereiche. **TCH:** "terminal conserved Hairpin". **TCR:** "terminal conserved region". **CCR:** "central conserved region". **Grün**: Strukturelemente wie das loop E-Motiv und die Hairpins I + II.

Linke terminale Domäne (T_L)

Für PSTVd konnte 2006 gezeigt werden, dass sich der Transkriptionsstart im "Hairpin-loop" der linken terminalen Domäne befindet, wie es bereits von Goodman 1984 postuliert wurde (Goodman *et al.*, 1984). Über "site-directed"-Mutagenese und Infektionsstudien an Tomaten konnte der Startpunkt auf die Nukleotide U359 und C1 eingeschränkt werden (Kolonko *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2006). Des Weiteren beinhaltet die linke terminale Domäne die

Sequenzmotive TCH (bei allen Mitgliedern des Genus *Pospi*- und *Apscaviroid* zudem bei CbVd2 und CbVd3 des Genus *Coleviroid*) sowie TCR (bei HSVd und allen Mitgliedern des Genus *Cocadviroid*), welche in Bezug auf die Klassifizierung von Bedeutung sind (Flores *et al*., 2003).

Pathogenitäts-Domäne (P)

Die Pathogenitäts-Domäne der meisten *Popiviroidae* beinhaltet im oberen Strang eine Oligopurin-Folge und hierzu korrespondierend eine Oligopyrimidin-Folge im unteren Strang. Aus dieser Paarung resultiert eine strukturelle Region, welche eine relativ niedrige thermodynamische Stabilität aufweist, daher auch die Bezeichnung "premelting" (PM) Region (Steger *et al*., 1984). Nach Sequenzierung mehrerer PSTVd-Isolate wurde deutlich, dass leichte Sequenzvariationen im Bereich der P-Domäne anscheinend die Pathogenität des Viroides beeinflussen, wodurch diese Domäne auch als "pathogenicity modulating" (PM) Region bezeichnet wurde (Schnölzer *et al*., 1985). Ein möglicher Zusammenhang der Sequenzvariationen auf die räumliche Struktur dieser Domäne und die daraus möglichen Auswirkungen auf die Pathogenität der verschiedenen PSTVd-Stämme kann darüber hinaus nicht außer Betracht gelassen werden (Owens *et al*., 1996; Schmitz & Riesner, 1998). Allerdings sollte darauf hingewiesen werden, dass Pathogenitäts-modulierende Mutationen und / oder Regionen nicht auf die P-Domäne bei Viroiden beschränkt sind (Visvader & Symons 1985; Sano *et al*., 1992; Qui & Ding, 2003).

Zentrale Domäne (C)

Die zentrale Domäne ist die am stärksten konservierte Region innerhalb der Familie der *Pospiviroidae*. Sie beinhaltet im oberen und unteren Strang das Sequenzmotiv der zentralen konservierten Region (CCR), welches im oberen Strang durch "inverted repeats" flankiert ist. Bei *Pospi*-, *Hostu*- und *Cocadviroidae* ist der obere Strang während thermaler Denaturierung oder Replikation dazu befähigt die metastabile "Hairpin I"-Struktur auszubilden (siehe Abb. 1.5) (Henco *et al*., 1979; Riesner *et al*., 1979; Daròs *et al.*, 2006). Mögliche Funktionen dieser Struktur während der Prozessierung des Viroids oder während einer eventuellen Dimerisierung werden diskutiert (Diener, 1987; Tsagris *et al*., 1987; Gast *et al*., 1998). Innerhalb der CCR vieler *Pospiviroidae* befindet sich ein interner "loop" (nt 98 - 102 und 256 - 261 bei PSTVd), welcher hohe Homologie zum "loop E" der eukaryotischen 5 S rRNA aufweist (Branch *et al*., 1985; Wimberly *et al*., 1993). Da dem "loop E"-Motiv eine Rolle in der Synthese und im Transport der 5 S rRNA zukommt, wird bei Viroiden eine Funktion

während der Replikation, im Besonderen während der Prozessierung, und dem nuklearen Transport vom Nukleoplasma zum Nukleolus nicht ausgeschlossen (Daròs *et al*., 2006; Zhong *et al*., 2006; Owens & Baumstark, 2007). Darüber hinaus wurde PSTVd über einen einzelnen Nukleotid-Austausch (U257A) im "loop E"-Motiv dazu befähigt, den Nicht-Wirt *Nicotiana tabacum* zu infizieren (Wassenegger *et al*., 1996; Qi & Ding, 2002), welches die Vermutung zulässt, dass das bereits *in vivo* nachgewiesene "loop E"-Motiv mehrere entscheidende Rollen in der Viroid-Wirts-Beziehung spielt (Zhong *et al*., 2006; Owens & Baumstark, 2007; Eiras *et al*., 2007).

Variable Domäne (V)

Im Bereich der variablen Domäne herrscht eine geringe Sequenzhomologie von höchsten 50% zwischen den Viroiden vor, auch wenn es sich hierbei um nah verwandte Viroide handelt (Kees & Symons, 1985).

Rechte terminale Domäne (T_R)

2003 konnte von Maniataki über das Hefe Tri-Hybrid-System eine Interaktion des Viroid-RNA-Bindeproteins 1 (Virp1) aus Tomate mit der rechten terminalen Domäne von PSTVd nachgewiesen werden (Maniataki *et al*., 2003). Nähere Untersuchungen zeigten, dass innerhalb von T_R zwei asymmetrische interne "loops", als RY-Motif bezeichnet, für die spezifische Interaktion von Viroid-RNA und Protein verantwortlich sind (Gozmanova *et al*., 2003).

"Hairpin II"

Wie bereits für "Hairpin I" beschrieben, können Viroide aufgrund thermischer Denaturierung oder während der Replikation aus ihrer nativen Konformation dissoziieren und metastabile "Hairpins" ausbilden (Henco *et al*., 1979; Riesner *et al*., 1979; Randles *et al*., 1982; Steger *et al*., 1984). "Hairpin II" formiert sich bei PSTVd aus den Nukleotiden 227-236 / 319-328 des unteren Stranges, und konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Schröder & Riesner, 2002). Mutationsanalysen zeigten, dass "Hairpin II" eine essentielle Rolle während der Replikation zukommt, möglicherweise als Bindungsstelle für bisher unbekannte zelluläre Faktoren (Loss *et al*., 1991; Candresse *et al*., 2001; Zhong *et al*., 2006).

Avsunviroidae

Analog zu den *Pospiviroidae* erscheint auch der Hauptvertreter der *Avsunviroidae*, das "Avocado sunblotch viroid" (ASBVd) aufgrund intramolekularer Basenpaarungen in einer nahezu hantelförmigen Struktur, mit Ausnahme der linken terminalen Domäne, welche eine Y-förmige Verzweigung aufweist (Abb. 1.6).

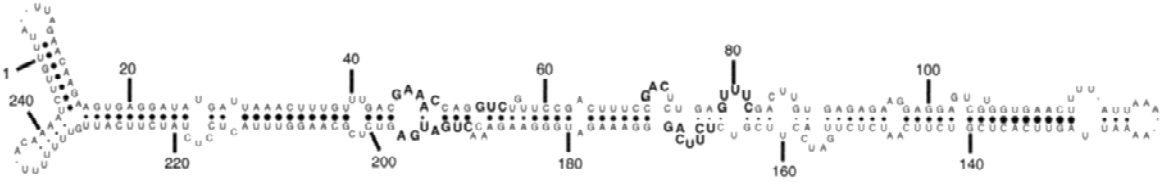


Abb. 1.6: Nukleotidsequenz und Sekundärstruktur des "Avocado sunblotch viroid" (aus Steger & Riesner, 2003, modifiziert).

Eine nähere Charakterisierung von ASBVd zeigte zudem, dass dieses Viroid, wie alle Vertreter der *Avsunviroidae*, keine zentrale konservierte Region aufwies (Hutchins *et al.*, 1986), sondern statt dessen die Fähigkeit besaß, unter proteinfreien Bedingungen in Strängen beider Polarität 5'OH und 2',3'-Phosphodiester Termini zu erzeugen. Dieses führte zum ersten strukturellen Modell des zur autokatalytischen Prozessierung befähigten Motivs: dem "Hammerhead"-Ribozym (Hernández & Flores, 1992; Flores *et al.*, 1999). Viroide des Genus *Pelamoviroid* besitzen ebenfalls ein "Hammerhead"-Ribozym, unterscheiden sich allerdings deutlich vom Genus *Avsunviroid* (Abb. 1.7).

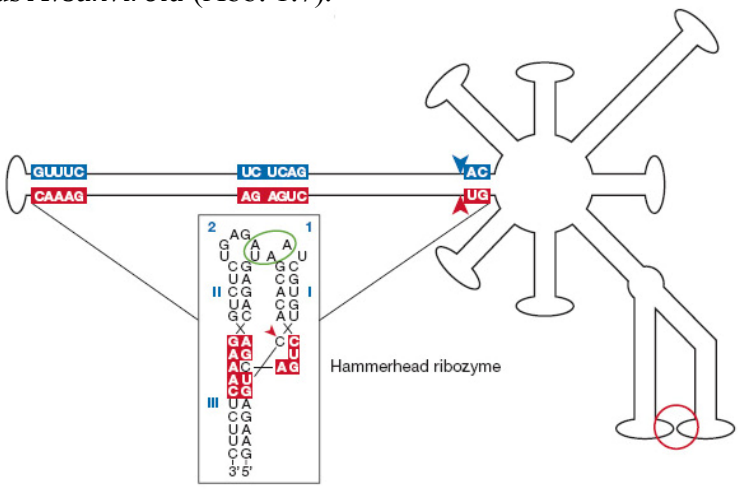


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der genomischen Struktur des "Peach latent mosaic viroid" (aus Darós *et al.*, 2006, modifiziert). Konservierte Sequenzbereiche des "Hammerhead"-Ribozyms sind **rot** und **blau** für (+) und (-) Polarität unterlegt. Die Struktur des (+)-Strang "Hammerhead"-Ribozyms ist im eingefügten Kasten zu beobachten, wobei **I - III** Helices und **1 und 2** "loops" darstellen. Prozessierungsstellen sind durch Pfeile markiert. **Grün:** tertiäre Interaktion zwischen den "loops" 1 und 2, welche die katalytische Aktivität verstärkt. **Rot umkreist:** Struktur der "Kissing-loops".

Das "Peach latent mosaic viroid" (PLMVd) sowie das "Chrysanthemum chlorotic mottle viroid" (CChMVd) treten *in vivo* und *in vitro* in einer stark verzweigten Konformation auf (Abb. 8), welche durch die Interaktion von zwei "kissing loops" stabilisiert wird (Hernánde & Flores, 1992; Bussière *et al*., 2000; Gago *et al*., 2005; Daròs *et al*., 2006).

1.1.5 Klassifizierung

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten 28 Viroidspezies und über 100 Sequenzvarianten charakterisiert werden. Die Einteilung der Viroide in zwei Familien erfolgte unter Berücksichtigung von drei Hauptkriterien (Flores *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2003):

1. Präsenz einer "Central Conserved Region" (CCR)
2. Fähigkeit zur autokatalytischen Prozessierung über "Hammerhead"- Ribozym
3. Replikation über symmetrischen oder asymmetrischen "Rolling-Circle" Mechanismus

FAMILY	GENUS	SPECIES
POSPIVIROIDAE	POSPIVIROID	PSTVd (potato spindle tuber)
		TCDVd (tomato chlorotic dwarf)
		MPVd (mexican papita)
		TPMVd (tomato planta macho)
		CSVd (chrysanthemum stunt)
		CEVd (citrus exocortis)
		TASVd (tomato apical stunt)
		IrVd (iresine I)
		CLVd (columnea latent)
	HOSTUVIROID	HSVd (hop stunt)
	COCADVIROID	CCCVd (coconut cadang-cadang)
		CTiVd (coconut tinangaja)
		HLVd (hop latent)
		CVd-IV (citrus IV)
	APSCAVIROID	ASSVd (apple scar skin)
		CVd-III (citrus III)
		ADFVd (apple dimple fruit)
		GYSVd I (grapevine yellow speckle I)
		GYSVd 2 (grapevine yellow speckle 2)
		CBLVd (citrus bent leaf)
		PBCVd (pear blister canker)
		AGVd (Australian grapevine)
	COLEVIROID	CbVd I (coleus blumei I)
		CbVd 2 (coleus blumei 2)
		CbVd 3 (coleus blumei 3)
AVSUNVIROIDAE	AVSUNVIROID	ASBVd (avocado sunblotch)
	PELAMOVIROID	PLMVd (peach latent mosaic)
		CChMVd (chrysanthemum chlorotic mottle)

Abb. 1.8: Klassifizierung der Viroide nach Flores *et al.*, 2003. Hauptvertreter, von welchen sich Genus- und Familienname ableitet, sind unterstrichen.

Pospiviroidae, mit PSTVd als Hauptvertreter (Diener, 1971; Gross *et al.*, 1978), besitzen eine CCR in ihrer hantelförmigen Sekundärstruktur, sind nicht zur autokatalytischen Prozessierung befähigt und replizieren im Nukleus über den asymmetrischen "Rolling-Circle" Mechanismus. Mitglieder der *Avsunviroidae*, deren Hauptvertreter das "Avocado sunblotch viroid" (ASBVd) ist (Symons 1981; Hutchins *et al.*, 1986), besitzen keine CCR, sind im (+)- und (-)-Strang zur autokatalytischen Prozessierung über das "Hammerhead"-Ribozym befähigt und replizieren im Chloroplasten über den symmetrischen "Rolling-Circle" Mechanismus. Innerhalb der Familien erfolgte die Gruppierung der Viroide in Genera unter Berücksichtigung von zwei Kriterien:

1. die Sequenz der CCR
2. Präsenz der konservierten Bereiche "Terminal Conserved Region" (TCR) (Koltunow und Rezaian, 1988) und "Terminal Conserved Hairpin" (TCH) (Flores *et al.*, 1997).

Zwischen Spezies oder Viroid-Variante wurde ausschließlich über Sequenzdaten entschieden (Abb. 1.8).

1.1.6 Replikation

Bereits 1971 konnte Diener über konventionelle Zellfraktion und differentielle Zentrifugation zeigen, dass PSTVd hauptsächlich im Nukleus akkumuliert (Diener, 1971). Darüber hinaus wurde durch aufgereinigte Kernextrakte deutlich, dass PSTVd, später auch CCCVd, speziell im Nukleolus angereichert werden (Harders *et al*., 1989; Bonfiglioli *et al*, 1996). Im Gegensatz hierzu konnte das ASBVd, der Hauptvertreter der *Avsunviroidae* vorwiegend in der Thylakoid-Membran von Chloroplasten nachgewiesen werden (Mohamed & Thomas, 1980; Bonfiglioli *et al*., 1994). Obwohl die Akkumulierung eines Viroids in speziellen Organellen nicht notwendiger Weise für den Ort der Replikation spricht, konnte über die Lokalisierung von Komplementärsträngen, welche als Replikationsintermediate auftreten, bewiesen werden, dass PSTVd im Nukleus (Spiesmacher *et al*., 1983) und ASBVd im Chloroplasten (Bonfiglioli *et al*., 1994; Navarro *et al*., 1999) über den "Rolling-Circle"-Mechanismus replizieren (Branch & Roberson, 1984; Owens & Diener, 1982; Hutchins *et al.*,1985). Da Viroide keine Protein-kodierende Kapazität besitzen, wurde davon ausgegangen, dass die Replikation durch wirtseigene Enzyme erfolgen müsste. Den Beweis hierfür erbrachten Mühlbach & Sänger (1979), die zeigten, dass die Replikation von PSTVd in Tomatenprotoplasten bereits durch niedrige Konzentrationen von α-Amanitin inhibiert wird, einem Pilz-Toxin, welches die Funktion der DNA-abhängige RNA-Polymerase II (DdRP II) beeinflusst. Dieser Befund konnte in späteren Arbeiten mit isolierter DdRP II und

isolierten Zellkernen untermauert werden (Rackwitz *et al*., 1981; Spiesmacher *et al*., 1985; Schindler & Mühlbach, 1992). Die Replikation der *Avsunviroidae* hingegen erfolgt nach heutigen Erkenntnissen über eine Kern-kodierte DNA-abhängige RNA-Polymerase (NEP), wie durch Analysen mit Tegetitoxin gezeigt (Navarro *et al*., 2000).

Die Replikation der *Pospiviroidae* erfolgt im Nukleus gemäß dem asymmetrischen "Rolling-Circle" (Abb. 1.9). Hierbei dient das native zirkuläre RNA-Mokelül als Matrize für die Synthese eines oligomeren linearen (-)-Stranges im Nukleoplasma, wobei der Transkriptionsstart auf die Nukleotide U359 und C1 eingeschränkt werden konnte (Kolonko *et al*., 2006; Zhong *et al*., 2006). Das oligomere (-)-Strang- Intermediat dient wiederum als Matrize für die Synthese eines oligomeren (+)-Stranges, welcher anschließend durch bisher unbekannte, wirtseigene Enzyme im Nukleoplasma sowie Nukleolus prozessiert und zirkularisiert wird (Qi & Ding, 2003).

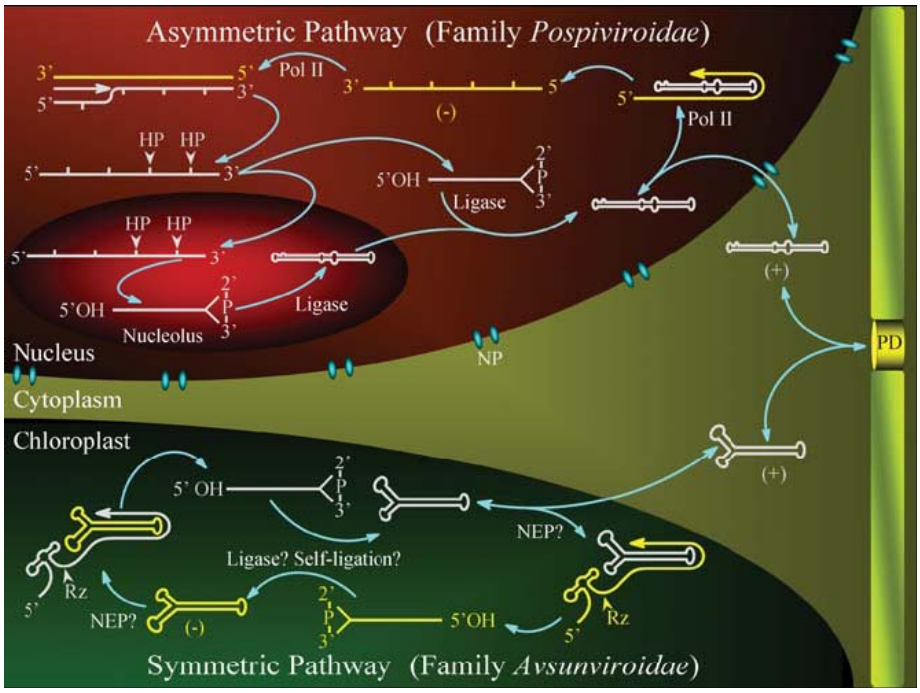


Abb. 1.9: "Rolling-Circle"-Mechanismus der Viroid-Replikation (aus Flores *et al*., 2005). Weiße und gelbe Linien stellen (+)- und (-)-Strang dar. Orte der Prozessierung sind durch Pfeile gekennzeichnet, wobei **HP** für eine Prozessierung durch Wirtsproteine und **Rz** für autokatalytische Prozessierung durch "Hammerhead"-Ribozym stehen. **Pol II** bezeichnet die DNA-abhängige RNA-Polymerase II, **NEP** die Kern-kodierte Polymerase. Als **PD** wurden die Plamodesmata, als **NP** die Kernporen bezeichnet.

Für PSTVd konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine Konformationsänderung der zentralen Domäne, und zwar vom "GNRA-Tetraloop" zu der bereits beschriebenen "loop E"-Struktur, den Wechsel von Prozessierung zu Ligation befähigt (Baumstark & Riesner, 1995; Baumstark *et al*., 1997; Schrader *et al*., 2003; Owens & Baumstark, 2007).

Die Replikation der *Avsunviroidae* erfolgt im Chloroplasten über den symmetrischen "Rolling-Circle". Hierbei dient das native Viroid als Matrize für die Synthese eines oligomeren (-)-Stranges, welcher durch autokatalytische Prozessierung über das "Hammerhead"-Ribozym in monomere, lineare (-)-Stränge überführt wird. Der Mechanismus der nachfolgenden Ligation ist noch unverstanden, da 1. die Existenz einer Chloroplasten-RNA-Ligase für *Avsunviroidae* nicht bewiesen ist, und 2. eine autokatalytische Reaktion nicht ausgeschlossen werden kann (Flores *et al*., 2005).
In einem zweiten "Rolling-Circle" dient das monomere, zirkuläre (-)-Strang-Intermediat als Matrize für die Synthese eines linearen oligomeren (+)-Stranges. Nach autokatalytischer Prozessierung über das "Hammerhead"-Ribozym erfolgt die Ligation in native Viroid-Moleküle.

1.1.7 Transport

Die systemische Infektion einer Wirtspflanze und der hiermit verbundene Transport des Erregers vom Ort der Inokulation in alle Pflanzengewebe kann als Multi-Phasen-Prozess bezeichnet werden. Im Gegensatz zu Viren, die für eigene "Movement"-Proteine kodieren, müssen Viroide auf verschiedenen Ebenen direkt mit Wirtsfaktoren interagieren, um eine Mobilität zu gewährleisten.
Zur Charakterisierung des intrazellulären Transportes, speziell dem Import der Viroid-RNA in den Nukleus, konstruierten Woo *et al.*, (1999) infektiöse Fluorescein-markierte PSTVd-Konstrukte, welche in permeabilisierten Tabak-Protoplasten zum Nukleus transportiert wurden, wodurch ein Cytoskelett-abhängiger Prozess ausgeschlossen werden konnte. Die Hypothese, dass PSTVd ein spezifisches Sequenzsignal oder Strukturelement beinhaltet, wodurch es zum Kern geleitet wird, konnte durch Zhao *et al*. (2001) bekräftigt werden. Zhao und Mitarbeiter inserierten zum einen ein unmodifiziertes Intron zum anderen ein Intron mit eingebetteter PSTVd-RNA in den kodierenden Bereich des "Green fluorescent protein" (GFP). Eine Inokulation mit diesen im Cytoplasma viral exprimierten Konstrukten resultierte ausschließlich in einer GFP-Expression unter Verwendung der rekombinanten RNA mit PSTVd-Intron. Dieses wies darauf hin, dass die PSTVd-Sequenz für den Kerntransport verantwortlich schien, wodurch eine Prozessierung zu einer funktionsfähigen mRNA ermöglicht wurde (Zhao *et al*., 2001). Im Zusammenhang mit dem Kerntransport scheint darüber hinaus ein Bromodomänen-Protein aus Tomate von Interesse, welches *in vivo* und *in vitro* an PSTVd bindet (Martínes de Alba *et al*., 2003). Dieses Viroid-RNA-bindende Protein 1 (Virp1) gehört einer Familie von transkriptionellen Regulatoren an, welche mit Chromatin

"remodelling" assoziiert sind. Wie erwartet besitzt VirP1 ein NLS und interagiert spezifisch mit dem bereits beschriebenen in der rechten terminalen Domäne lokalisierten RY-Motiv von PSTVd (Gozmanova *et al*., 2003; Maniataki *et al*., 2003). Mutationen im RY-Motiv führten zur vollständigen Aufhebung der Infektiösität, wodurch dessen biologische Relevanz deutlich wird. Die hohe Komplexität des intrazellulären Transportes von Viroiden wird noch deutlicher, wenn man auf die Ebene der Organellen blickt. Wie bereits erwähnt, verbleiben (-)-Strang Replikationsintermediate im Nukleoplasma, wohingegen multimere (+)-Stränge in den Nucleolus transportiert werden. Dieses deutet auf die Existenz einer hoch spezialisierten Maschinerie in eukaryotischen Zellen hin, welche zwischen RNA unterschiedlicher Polarität unterscheiden kann und somit Einfluss auf die Genregulation und Infektion durch Pathogene ausübt (Flores *et al*., 2005). Der Export von Viroiden aus dem Zellkern sowie der intrazelluläre Transport von *Avsunviroidae* in den Chloroplasten sind bis zum heutigen Zeitpunkt unverstanden. Der interzelluläre Transport von Proteinen und Nukleinsäuren, endogener oder viraler Herkunft, erfolgt über Plasmodesmata (PD), welches ebenfalls für Viroide postuliert wird. Über Mikroinjektion konnten Ding *et al*. (1997) zeigen, dass sich PSTVd in symplastisch verbundenen Mesophyllzellen schnell ausbreitete, wogegen keine Ausbreitung in symplastisch isolierten "Guard"-Zellen zu beobachten war (Ding *et al*., 1997). Diese Ergebnisse, sowie die Tatsache, dass eine nicht-mobile RNA durch die Fusion an PSTVd zum Transport durch Plasmodesmata befähigt wurde, führen zu der Vermutung, dass PSTVd ein Motiv für den PD-Transport beinhaltet (Flores *et al*., 2005). Für eine systemische Infektion, welche den Transport des Viroides von der Epidermis zum Phloem und von hieraus zu den einzelnen Pflanzenorganen bedeutet, muss das Viroid verschiedene zelluläre Grenzen überwinden. So konnten Zhong *et al.* kürzlich zeigen, dass ein Strukturmotiv an Position U43/C318 der PSTVd-RNA wichtig für den Übergang des Viroides von den Bündelscheidenzellen in das Gefäßsystem zu sein scheint (Zhong *et al.*, 2007). Ein C318 A Nukleotidaustausch führte zum Schließen des U43/C318 "loop" von PSTVd, jedoch ohne die hantelförmige Sekundärstruktur zu verändern. Nach Inokulation von *Nicotiana benthamiana* mit diesen Mutanten konnte beobachtet werden, dass zwar der Transport von PSTVd aus Epidermiszellen zu Mesophyllzellen statt fand, aber der Übergang von PSTVd aus den Bündelscheidenzellen in das Phloem unterbunden wurde (Zhong *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnte ein weiteres Strukturmotiv von PSTVd charakterisiert werden, welchem eine Rolle im Transport des Viroides von den Bündelscheidenzellen in die Mesophyllzellen, aber nicht in entgegen gesetzte Richtung zukommt (Qi *et al*., 2004).

Der Langstreckentransport des Viroides im Phloem erfolgt analog den Photoassimilaten, welche von den photosynthetisch aktiven "source"- zu selektiv ausgewählten "sink"-Geweben bzw. Organen transportiert werden (Palukaitis, 1987; Zhao *et al*., 2001; Zhu *et al*, 2002). Die am Phloem-vermittelten Transport postulierte Beteiligung von Wirtsproteinen konnte bisher nur für das HSVd in der Gurke bewiesen werden. *In vitro* und *in vivo* konnte die Bildung eines Ribonukleoprotein-Komplexes des HSVd mit einem dimeren Lektin, dem Phloem Protein 2 (PP2), beobachtet werden (Gómez & Pallás, 2001; Owens *et al*., 2001; Gómez & Pallás, 2004). Faktoren, welche am Übergang des Viroides aus dem Phloem in die Bündelscheidenzellen beteiligt sind, konnten bisher nicht identifiziert werden. Es ist allerdings davon auszugehen, dass eine Kombination von Strukturmotiven, verschiedenen Mechanismen und einer Vielzahl von zellulären Faktoren am Transport der Erreger beteiligt sind (Flores *et al*., 2005).

1.1.8 Pathogenität

Da Viroide nicht für eigene Proteine kodieren, die für die Ausbildung von Krankheitssymptomen verantwortlich sein könnten, wurde deutlich, dass ihre Pathogenität nur aus einer Interaktion mit Wirtsfaktoren (HF), wie Proteinen oder Nukleinsäuren, resultieren kann (Diener, 1979a; Conejero *et al*., 1979; Semancik & Conejero, 1987). Verschiedene Hypothesen diesbezüglich wurden aufgestellt, wobei zum einen zelluläre RNA als primäre Zielgruppe einer Interaktion vorgeschlagen wurde. Eine mögliche Wechselwirkung des Viroides mit der Wirts-RNA (HF, siehe Abb. 1.10) könnte in einer Störung der rRNA-Reifung oder der mRNA-Prozessierung resultieren, welches nach bewiesener Interaktion von Viroid-RNA mit der U3B snRNA (Kiss *et al*., 1983) sowie der snRNA U1 (Dickson, 1981) diskutiert wurde. Darüber hinaus könnte eine Interaktion der Viroid-RNA mit der 7S RNA zu einem fehlerhaften Aufbau des "Signal recognition particle" führen (Haas *et al*., 1988).

Eine aktuell diskutierte Hypothese zur Pathogenität von Viroiderkrankungen stellt die Beeinflussung der Wirts-Gen-Expression auf Ebene der Transkription und auf post-transkriptionellem Level dar, woraus indirekt eine Induktion von Krankheitssymptomen resultieren könnte (Flores *et al*., 2005) (Abb. 1.10).

Gestützt wird diese Annahme zum einen durch die Beobachtung, dass PSTVd eine *de novo* Methylierung homologer, genomischer Sequenzen auslösen kann (Wassenegger *et al*., 1994). Darüber hinaus führte die Expression doppelsträngiger RNA zu einer Methylierung sowie transkriptionellen Inaktivierung von homologen Promotorsequenzen (Mette *et al*., 2000), wobei bereits ein DNA-Sequenzbereich von 30 bp für eine RNA-gerichtete DNA-

Methylierung auszureichen schien (Pélissier & Wassenegger, 2000). Zum anderen konnten Viroid-spezifische siRNAs (short interfering RNA) bei Mitgliedern der *Pospiviroidae* (Itaya *et al*., 2001; Papaefthimiou *et* al., 2001; Markarian *et al*., 2004) sowie *Avsunviroidae* identifiziert werden (Martínez de Alba *et al*., 2002; Markarian *et al*., 2004), welche mit dem "transcriptional"- (TGS) und "post-transcriptional"- "gene silencing" (PTGS) assoziiert sind. Itaya *et al*. zeigten kürzlich, dass siRNAs von PSTVd (srPSTVd) vorwiegend auf Bereiche der rechten und linken terminalen Domäne sowie auf die variable Domäne zurückzuführen sind. Zudem wiesen über 90 % der charakterisierten srPSTVds eine (+)-Strang Polarität auf.

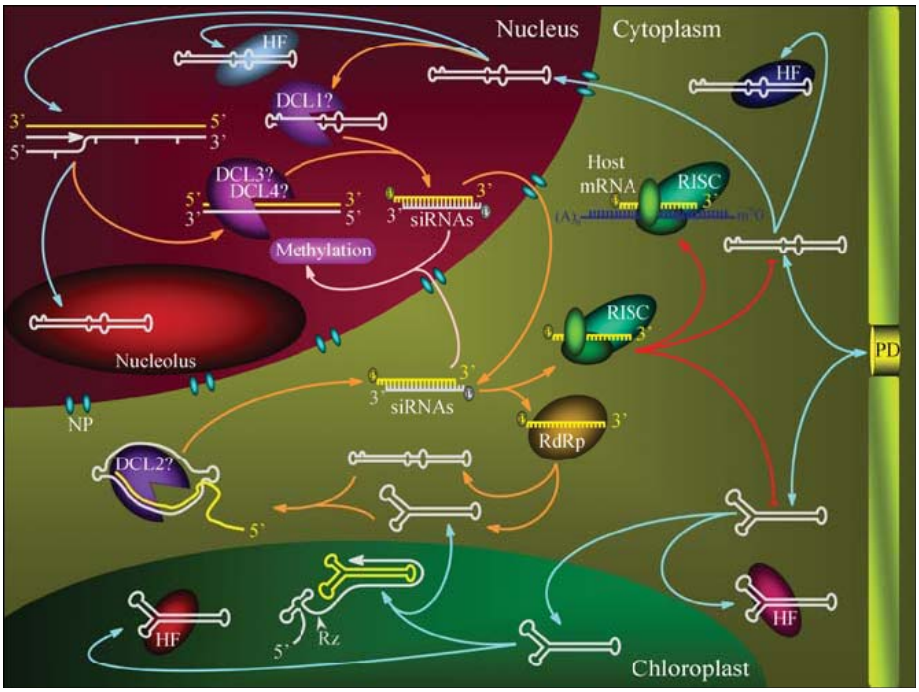


Abb. 1.10: Hypothetische Mechanismen einer Viroid Pathogenese (aus Flores, *et al.*, 2005). 1. Symptomausprägung über direkte Interaktion des Viroides mit Wirtsfaktoren (HF, Protein oder RNA) dargestellt mit blauen Pfeilen. **2.** Krankheitssymptome über "RNA Silencing". **a)** siRNA führt über den RISC-Komplex zur Degradation oder Suppression der Translation von Wirts-mRNA mit komplementären Sequenzbereichen (orange und rote Pfeile); **b)** siRNA bewirkt direkte Methylierung von Wirts-DNA (rosa Pfeile). **PD:** Plasmodesmata; **NP:** Kernporen; **DCL:** Dicer-like.

Als Resultat dieser Beobachtungen werden hauptsächlich monomere, lineare PSTVd-Moleküle mit spezifischer Sekundärstruktur als Substrat für die Prozessierung durch ein Enzym der RNase III Klasse (Dicer oder Dicer-ähnlich, DCL) zu 21 - 24 nt langen siRNAs diskutiert (Itaya *et al*., 2007). Eine nukleäre Herkunft der Viroid-spezifischen siRNAs scheint somit für Mitglieder der *Pospiviroidae* wahrscheinlich, vor allem nach Charakterisierung der vier bekannten DCL, welche verschiedene subzelluläre Lokalisierungen aufweisen. Mindestens für eines der nukleären DCL-Enzyme, nämlich für DCL-1, konnte eine Prozessierung endogener RNAs mit "Hairpin"-Konformation gezeigt werden, welche der

Sekundärstruktur von Viroiden ähnelt (Baulcombe, 2004). Im Gegensatz hierzu stehen Mitglieder der *Avsunviroidae*, deren siRNA nur im Cytoplasma erzeugt werden können, da bisher kein Chloroplasten-DCL identifiziert werden konnte (Flores *et al*., 2005; Daròs *et al*., 2006). In ihrem Fall wird die Beteiligung einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase angenommen (Sijen *et al*., 2001; Tang *et al*., 2003), welche siRNAs als Primer und das Viroid-Genom als Matrize für die Herstellung von doppelsträngigen RNAs verwendet (Vogt *et al*., 2004; Daròs *et al*., 2006). Über DCL-Prozessierung würden sekundäre siRNAs entstehen, wodurch es zu einer Amplifikation der Signal-Kaskade kommt, einem Prozess, welcher als "transitive silencing" bekannt ist (Vaistij *et al*., 2002; Van Houdt *et al*., 2003; Vogt *et al*., 2004). Generierte siRNAs formen mit bisher unbekannten Proteinen den "RNA-induced silencing complex" (RISC; Hammond *et al*., 2000), und nach Dissoziation von mindestens einem der siRNA-Stränge erfolgt die Degradation von komplementären RNA Molekülen (Nykänen *et al*., 2001), eine Repression der Translation oder die direkte Methylierung von Wirts-DNA (Flores *et al*., 2005). Obwohl das PTGS in Pflanzen ein Abwehrsystem gegen Viren (Ratcliff *et al*., 1999), Transposons (Ketting *et al*., 1999) sowie anderen Formen von eindringender RNA darstellt, scheint die Viroid-Replikation nicht betroffen. So konnte gezeigt werden, dass sogar erhöhte Mengen der siRNAs mit einer höheren Akkumulation von genomischer Viroid-RNA assoziiert sind (Itaya *et al*., 2001; Itaya *et al*., 2007). Eine Viroid-spezifische Resistenz gegenüber dem "Silencing"-Mechanismus wird auf die Struktur des nativen Viroid-Moleküls zurückgeführt, welche anscheinend Schutz für RISC-vermittelte Prozessierung bietet (Itaya *et al*., 2007).

In Bezug auf die Pathogenese von Viroiderkrankung kann eine differentielle Gen-Expression als Pathogenantwort nicht außer Betracht gelassen werden. Über die Verwendung von PCR-basierenden cDNA Subtraktions-Bibliotheken sowie Macro-Array-Analysen verglichen Itaya *et al.* verschiedene Gen-Expressions-Profile von Tomatenpflanzen nach Infektion mit unterschiedlichen PSTVd-Isolaten. Als Kontrolle dienten Tomatenpflanzen, welche mit dem Tabak Mosaik Virus (TMV) inokuliert wurden (Itaya *et al*., 2002). Der Autor identifizierte 55 Gene, welche differentiell nach einer Infektion mit PSTVd exprimiert wurden. Im Speziellen wurden sieben Gene nach Inokulation mit dem "Severe"-PSTVd-Isolat und ein Gen nach Infektion mit dem "Mild"-PSTVd-Isolat induziert (Itaya *et al*., 2002).

1.2 Mit PSTVd interagierende Proteine

In Anbetracht der Tatsache, dass Viroide während einer Vielzahl von Prozessen auf Proteine der Wirtszelle angewiesen sind (z.B. Replikation, Prozessierung und Transport), fanden vor

allem Bemühungen statt, Viroid-bindende Proteine zu identifizieren, die durch eine Interaktion in ihrer Funktion oder regulatorischen Eigenschaft beeinflusst werden, wodurch es zu einer Ausprägung von Krankheitssymptomen kommen kann (Wolff *et al*., 1985; Hiddinga *et al*., 1988; Klaff *et al*., 1989; Werner *et al*., 1995a; Daròs & Flores, 2002).

Über das "Screening" einer λgt11 cDNA Expressions-Bibliothek von Tomate konnten Werner *et al*., (1995a) verschiedene PSTVd-bindende Proteine identifizieren. Hierzu zählen ein ribosomales Protein, dem möglicherweise eine Rolle beim Transport des Viroids in den Zellkern zukommen könnte, sowie eine ß-Glucosidase und ein Cathepsin D Inhibitor (Werner *et al*., 1995b). Diese Proteine sind aber höchstwahrscheinlich nur mittelbar oder sekundär in den Prozess der Viroid-Pathogenese involviert. Viel eher ist damit zu rechnen, dass die unmittelbare pathogene Funktion einer Viroid-RNA sich über die Interaktion mit Proteinen ausdrückt, die maßgeblich an der Regulation der Gen-Expression beteiligt sind, womit sich die beobachteten Effekte auf das Wachstum und die Morphogenese der Pflanzen nach einer Viroidinfektion am besten erklären ließen. So war es von großem Interesse, dass einer der von Werner *et al*. (1995c) über seine carboxyterminale Bindung an PSTVd isolierten Klone (pRW 19.5) eine hohe Sequenzhomologie zu einem Myb-ähnlichen Transkriptionsfaktor aus *Arabidopsis thaliana At*CDC5 zeigte (Hirayama & Shinozaki, 1996). Über einen Vergleich mit weiteren Vertretern des "Cell-division-cycle-5"-Proteins (Ohi *et al*., 1994) wurde deutlich, dass es sich bei dem 1,5 kb großen Klon pRW 19.5 wahrscheinlich nur um einen Teilklon handelt, da bekannte cdc5-homologe Sequenzen deutlich größer waren und die charakteristische myb-Domäne nicht identifiziert werden konnte. Zudem zeigten Northern-Blot-Analysen mit diesem Teilklon ein deutliches Hybridisierungssignal für eine ca. 4 kb lange mRNA in Blättern junger PSTVd-infizierter Pflanzen (Werner *et al*., 1995c).

Abb. 1.11: Postulierte Organisation des Teilklones pRW 19.5 nach Ableitung der Aminosäuresequenz. Türkis: Kernlokalisationssequenz. **Orange:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung. Unbekannter Bereich ist schraffiert dargestellt.

Über genauere Analysen der cDNA konnten das 3‘-Ende sowie der 3‘-nichtkodierenden Bereich identifiziert werden. Darüber hinaus wies die abgeleitete Aminosäuresequenz eine Kernlokalisationssequenz sowie zwei sich wiederholende Sequenzmotive mit bisher unbekannter Funktion auf (Abb. 1.11).

1.3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten, unter Verwendung des experimentellen Modellsystems Tomate (*Solanum lycopersicum* L.), Untersuchungen zur Pathogenese des "Potato spindle tuber viroids" (PSTVd) durchgeführt werden. Da verschiedene Kultursorten deutliche Variationen in der Ausbildung von Krankheitssymptomen nach einer PSTVd-Infektion aufweisen, und diese schon zwei Wochen nach Inokulation mit dem Viroid beobachtet werden können, findet die Tomate bereits seit 1962 Gebrauch in der Viroidforschung (Raymer & O'Brian, 1962).

So konnte Werner unter Verwendung dieses Modellsystems verschiedene PSTVd-bindende Proteine isolieren, zu welchen der Klon pRW 19.5 zählt (Werner *et al.*, 1995 a, c), ein Proteinfragment mit Homologie zum CDC5 von *Arabidopsis thaliana* sowie *Schizo-saccharomyces pombe*. Da CDC5-Proteinen eine wesentliche Rolle im Zellzyklus zukommt (Burns *et al*., 1999), schien eine nähere Analyse des Klones pRW 19.5 sinnvoll.

Über die Verwendung von "RACE"-Verfahren sowie "Genome-Walks" sollte daher die physikalische Charakterisierung des putativen cdc5-homologen Gens der Tomate erfolgen. Da eventuell auftretende Sequenzunterschiede ausschlaggebend für verschiedene Bindungs-affinitäten der Viroide mit dem Transkriptionsfaktor sein könnten, sollten die erhaltenen Sequenzen der Viroid-sensitiven Tomatenkultursorten cv. Rutgers und Micro-Tom mit Sequenzen der symptomtoleranten Kultursorte cv. Goldkugel vergleichend betrachtet werden.

Des Weiteren sollte ein Vergleich des putativen *Sl*cdc5-Gens aus Tomate mit cdc5-Genen aus natürlichen Viroid-Wirts- und Nicht-Wirts-Pflanzen durchgeführt werden.

Im Anschluss hieran sollte nach sequenzieller Charakterisierung des putativen *Sl*cdc5-Promotors, dessen Funktion über Expression des Reportergens GFP in Mesophyllprotoplasten analysiert werden.

Obwohl das putative CDC5-Protein aus Tomate über seine Bindung an PSTVd von Werner *et al*., (1995c) isoliert wurde, bestand noch keine Klarheit über die strukturelle Spezifität dieser Bindung. Für genauere Analysen dieser Bindung sollte daher das "Tri-Hybrid"-System nach Putz *et al*. (1996) angewandt werden, um hiermit eine *in vivo* Rekonstruktion der spezifischen RNA-Protein-Interaktionen zu erzeugen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Als Versuchspflanzen dienten verschiedene Vertreter der Familie der Solanaceen.

a) Tomaten (*Solanum lycopersicum* L.)

Bezogen wurde das Saatgut der Kultursorte Rutgers von W. Atlee Burpee & Co. (Philadelphia, USA), das Saatgut der Kultursorten Goldkugel von Hild Samen GmbH (Marbach) und das Saatgut der Kultursorte Rentita von Samen Hoffmann (Forchheim). Das Saatgut der Tomatenmutante Micro-Tom wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Avraham Levy vom Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt und selbst vermehrt.

b) Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.)

Das verwendete Blattmaterial der Kartoffelkultursorte "Linda" wurde vom Botanischen Garten in Klein Flottbek zur Verfügung gestellt.

c) Tabak (*Nicotiana rustica* L.)

Das Saatgut des Bauerntabaks wurde aus dem Saatgutbestand des Botanischen Gartens in Klein Flottbek bezogen.

Das Pflanzenmaterial wurde frisch eingesetzt oder bis zur Verwendung bei - 70°C gelagert.

2.1.2 Bakterienstämme

Chemisch kompetente Zellen des *E.coli*-Stammes DH5α dienten zur Standarttransformation von Klonierungsprodukten.

Für Expressionsanalysen eines rekombinanten Proteins wurden chemisch kompetente Zellen des *E.coli*-Stammes Rosetta (DE3) von Novagen/Merck Biosciences (Schwalbach) verwendet.

2.1.3 Hefestämme

Sämtliche Transformationen für das Hefe Tri-Hybrid-System wurden mit dem Hefestamm (*Saccharomyces cerevisiae*) CG-1945 von BD Biosciences Clontech (Mannheim) durchgeführt.

2.1.4 Chemikalien und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad "zur Analyse" und wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Calbiochem (Schwalbach am Taunus), Carl Roth (Karlsruhe), Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden mit Wasser aus einer Ionenaustauscheranlage (Milli-Q-Water-Systems, Millipore) angesetzt. Bei Bedarf wurden die Lösungen durch Autoklavieren für 20 min bei 120°C und 1,2 bar oder durch Filtration (0,45 µm Porendurchmesser) sterilisiert.

Um bei Arbeiten mit Ribonukleinsäuren einen Abbau durch RNasen zu verhindern, wurden alle verwendeten Lösungen mit dem RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, oder sie wurden mit DEPC-behandeltem deionisierten Wasser angesetzt. Die DEPC-Behandlung erfolgte nach Sambrook *et al*. (2001) mit 0,1% (v/v) DEPC unter Rühren für mindestens fünf Stunden und anschließender Inaktivierung des DEPC durch Autoklavieren.

2.1.5 Enzyme

Enzyme wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen BD Biosciences Clontech (Mannheim), MBI-Fermentas (St.Leon-Roth), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim) und Takara Bio Europe S.A. (Gennevilliers, Frankreich) bezogen.

2.1.6 Kits

Für die Elution von PCR-Produkten und Vektoren wurde das "Montage - DNA Gel Extraction Kit" von Millipore (Bedford, USA) verwendet.

PCR-Produkte wurden vor Sequenzierung mit dem "High Pure PCR Product Purification Kit" von der Firma Roche (Mannheim) aufgereinigt.

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden folgende Kits verwendet:

- TA Cloning® Kit
- TOPO TA Cloning®
- TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing

} Invitrogen (Karlsruhe)

- pGEM® T Easy Vector System I von Promega (Mannheim)

Die Isolierung von "mid-copy" und "low-copy" Plasmiden erfolgte mit dem "NucleoBond® PC 100" Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren).

DNA aus unterschiedlichen Pflanzenmaterialien wurde entweder mit Hilfe des "E.Z.N.A.® Plant DNA Mini Kit" von Peqlab (Erlangen) oder mit dem "Plant DNA Isolation Kit" von Roche (Mannheim) isoliert.
Das "Universal Genome Walker™ Kit" von BD Bioscience Clontech (Mannheim) diente zur Durchführung eines "Genome Walk" bei Tomate und Kartoffel.
Die Aufreinigung von mRNA aus Gesamt-RNA-Isolationen wurde mit dem "NucleoTrap® mRNA Mini Kit" von der Firma Macherey-Nagel (Düren) durchgeführt.
Für die "Primer-Extension"-Experimente wurde das "Dig Taq DNA Sequencing Kit for Standard and Cycle Sequencing" der Firma Roche verwendet.

2.1.7 Vektoren

Für die Klonierung von PCR und RT-PCR Produkten, "GenomeWalk"-Fragmenten und RACE-Produkten wurden die Vektoren pCR® 2.1-TOPO, pCR® 4-TOPO und pCR® II von Invitrogen (Karlsruhe), sowie pGEM®- T Easy von Promega (Mannheim) verwendet.
Promotorfunktionsanalysen wurden mit Hilfe des GFP-Vektors pmon30049 von Monsanto (Düsseldorf) durchgeführt, der freundlicherweise von Dr. Stefan Scholten (Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt wurde.
Im Tri-Hybrid-System wurden der Vektor pACT2 von BD Biosciences Clontech (Mannheim) sowie der Vektor pRevRX verwendet, der von Prof. Dr. Dietmar Kuhl (Universität Berlin) hergestellt worden war und mir freundlicherweise überlassen wurde.
Für weitere Expressionsanalysen wurde der Vektor pET-30a der Firma Novagen / Merck Biosciences (Schwalbach) genutzt, der von Prof. Dr. Wienand (Universität Hamburg) bereitgestellt wurde.
Zur Gewinnung von Viroid-cDNA, verwendet bei Versuchen zum Tri-Hybrid-System sowie für die Herstellung von Viroid-Hybridisierungssonden, wurde der PSTVd-cDNA-Klon pRW 58 verwendet, der von Dr. Ralf Werner zur Verfügung gestellt wurde. Als Vektor für diesen Klon diente das Plasmid phT3T7 lac (Roche), in dessen "multiple cloning site" PSTVd-cDNA in doppelter Länge (718 bp) inseriert wurde. Die Transkription dieses Plasmids führt *in vivo* zu PSTVd (+)-RNA.
Karten der verwendeten Vektoren befinden sich im Anhang unter Punkt 7.3.

2.1.8 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten sequenzspezifischen Primer wurden mit Hilfe der Programme "Oligo", Molecular Biology Insight (Cascade, USA) und dem Lasergene-

programm "Primer Select 5.05" von DNAStar (Madison, USA) abgeleitet. Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) bezogen.

Tab. 2.1: Spezifische Daten der verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz [5' > 3']	Tm [°C]
cdc5 ORF Primer		
myb-386	GGG AGG AGT ATG GAA GAA CA	57,3
myb-519	GTG GGC TCG TAT TTC TTC TTT A	56,5
myb-R557	GTT TTT CAT CCT CCT CTC TA	53,2
myb-R845	CCT TCT TGC CTC TTG TGT TG	57,3
myb-851	AAG AGG CAA GAA GGC TAA AAG	55,9
myb-1226	AGA AGC AGT GAG GAA GAG GT	57,3
myb-R1892	TCT CCC TGG CAA TCC TAT CA	57,3
myb-1930	AGC GAC AAG CAT TAC TCC	53,7
myb-36	ACT TGT GTC CTT GCC TAG AAC	57,9
myb-R207	TCC CAT TGC CAC ACG AAG AA	57,3
myb-2273/207	CTT TCT TCG TGT GGC AAT GG	57,3
myb-R302	GAG AGA CCA TAA GCA TTT CG	55,3
myb-R2858	TCT GCC ATT TCT GCC TTC	53,7
myb-2858	GAA GGC AGA AAT GGC AGA	53,7
myb-R1170	CTG TGT TAC TCT CTT CTC CTG	57,9
myb-R3365	TCTCGGTAG AAC CTT ACA TG	55,3
cdc5 5' UTR Primer		
myb-909	ATC TGC CTA CCC TCT TAC AAT	55,9
myb-421	CCT GTC TTC TTC TGC TTG TGA	57,9
myb-194	CTC CGT TAT TCA TTT GTA T	48,0
myb-463	TCA TCG CAT CTT ATT ACA G	50,2
myb-R572	GGT TTT TCC AGC CTA TTT A	50,2
myb-3411	CAG AGA TAC CAT AGA CAT AGG	55,9
myb-R1188	CGC CGC CCT CCC ATC TAA CTC	65,7
myb-3672	AGC CCA GCC CAC CAC CCT AAA	63,7
myb-3702	CCC AAA TTC CAA AAC AAG T	50,2
myb-3720	TCG AAT TTG GAG AAC TCA T	50,2
myb-3740	GAA AGG TTA CAC TAA TGG A	50,2

myb-3776	GCT AAA AAC CGA TTC CGA	51,4
myb-3803	TCG TCG GAG CGG AAA AAC	56,0
myb-3830	GCC TGA ATC TAC TCT ACC	53,7
cdc5 3' UTR Primer		
myb-3231	CAA AAC CCA GGA GAA GAG AGT AAC AC	63,2
myb-3283	CAG TAG CAG CAG GTG ACG TGG ATG TT	66,4
myb-R3550	AAA CAT AGA AGT AAG TAG CCA CAG AA	58,5
Primer für Primer-Extensions-Experimente		
myb-R4002Dig	Dig-AAT CTC ATC CTC CGT GTT CTT	55,9
myb-R3044Dig	Dig-GCT GTC AAA ATA GGT TAG TCC	55,9
myb-R3425Dig	Dig-TAA CTC GCC ACT CTC CTA TGT	57,9
Tri-Hybrid-System Primer		
3H-2858NcoI	ATG CCA TGG AGA AGG CAG AAA TGG CAG AA	66,7
3H-1226NcoI	ATG CCA TGG AGG AAG CAG TGA GGA AGA GGT	69,5
3H-1930NcoI	ATG CCA TGG AGA AGC GAC AAG CAT TAC TC	66,7
3H-851NcoI	ATG CCA TGG AGA GAG GCA AGA AGG CTA AAA G	68,2
3H-3365NcoI	ATG CCA TGG TCT CGG TAG AAC CTT ACA TG	66,7
H-3830NcoI	ATG CCA TGG AGC CTG AAT CTA CTC TAC CG	68,1
3H-ATGNcoI	ATG CCA TGG AGA TGA GGA TTA TGA TAA AGG GA	65,6
3H-T3NotI	AAA GCG GCC GCA TTA ACC CTC ACT AAA GGG A	69,5
3H-T7NotI	AAA GCG GCC GCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G	69,5
RevRXSeq	TTG GTT TTG GGA GAG TAG C	54,5
pRev7464	CTG TGG AAA GAT ACC TAA A	50,2
pRev7986	GAG AAA GCA ACC TGA CCT A	54,5
pRev7380	ATT TGC TGA GGG CTA TTG	51,4
Matchmaker5AD	CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC C	66,9
Matchmaker3AD	GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT ACG A	66,9
Gal4ADRp	TGG GGT ATC TTC ATC AT	48,0
Gal4ADFp	TAA CAA CTC AAA CAA AT	40,7
Primer für Funktionsanalysen des Promotors		
pmonFp	TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AA	58,9
pmonRp	GGC ATC ACC TTC ACC CTC TCC	63,7
myb-2557Hind	TTT TAA GCT TTT TTT CCG TTC ATT TTT CTA A	57,6
myb-2725/1Hind	TTT TAA GCT TAT ATA AGA TCA AGA AAG GGA GAA	60,8

myb-2725Hind	TGC AAG CTT ATA TAA GAT CAA GAA AGG GAG AAA	63,3
myb-3056Hind	TGC AAG CTT TCG CCA TGG ACT AAC CTA TT	65,3
myb-3634Hind	TGC AAG CTT ATC CCA TGC AAA CAA TCC	63,4
myb-3716Bam	TGG ATC CGT TTT GGA ATT TGG GTT TGG ATA G	65,5
myb-3896Bam	TGG ATC CGC CTG TAA ATG AGC TGA AAT CTA T	65,5
5' und 3' "RACE" Primer		
O-ANK	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA $C(T)_{16}V$ - Wobbles	
SMART	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG (O-methyl Ribose)	
HC	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT	
HS	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	
"GenomeWalk" Primer		
AP1	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	59,0
AP2	ACT ATA GGG CAC GCG TGG T	71,0
myb-R440-5'	TAC GAG CCC ACT GAT TCT TCC CAT AC	64,8
myb-R393-5'	ATC TCA TCC TCC GTG TTC TTC CAT AC	63,2
myb-3231-3'	CAA AAC CCA GGA GAA GAG AGT AAC AC	63,2
myb-3283-3'	CAG TAG CAG CAG GTG ACG TGG ATG TT	66,4
vektorspezifische Primer		
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	53,2
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	53,2
T7-Terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	56,7
Sp6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA	49,1
M13-Forward	GTA AAA CGA CGG CCA G	50,0
M13-Reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	50,0
zusätzliche Primer		
OligodT	TTT TTT TTT TTT TTT TV - Wobbles	34,0
myb-519Linker	TAA AGA AGA AAT ACG AGC CAC C	56,5
myb-Linker-dT	GGTGGC TCG TAT TTC TTC TTT $A(T)_{17}V$ - Wobbles	63,0

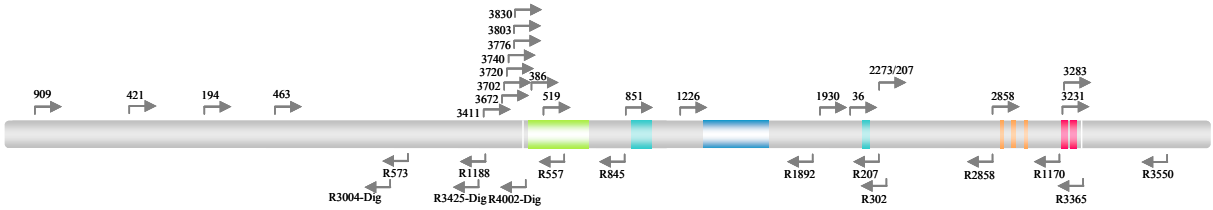


Abb. 2.1: Lage der verwendeten cdc5-Primer auf genomischer DNA. Grün: myb-DNA-Bindedomäne. **Türkis:** Kernlokalisationssequenz (NLS). **Blau:** Threonin-Prolin (TP) reiche Domäne. **Orange:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung.

2.1.9 Antikörper

Zum Nachweis eines Gal4-AD-Fusionsproteins wurde als primärer Antikörper der Gal4-AD-spezifische monoklonale Antikörper der Firma BD Biosciences Clontech (Mannheim) verwendet. Als secundärer Antikörper diente ein Alkalische-Phosphatase konjugierter Ziege-Anti-Maus-IgG der Firma Dianova (Hamburg).

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht der Versuchspflanzen

Die Versuchspflanzen wurden im Gewächshaus bei einer Lichtphase von 13 Stunden und einer Dunkelphase von 11 Stunden angezogen. Während der Lichtphase herrschte eine Temperatur von 25°C, während der Dunkelphase eine Temperatur von 21°C.

2.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

2.2.2.1 Phenol / Chloroform-Extraktion

Die Phenol / Chloroform Extraktion ist die Standard-Extraktionsmethode, um Proteine aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen, und wurde in Anlehnung an Sambrook & Russel (2001) durchgeführt.

Lösung mit 1 Vol. Phenol / Chloroform versetzen und gründlich gemischt

Phasentrennung durch Zentrifugation bei 13.000 upm und 15°C für 10 min

↓

Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß

↓

Wiederholung der genannten Schritte bis zum Ausbleiben einer Interphase

↓

einmaliges Ausschütteln der Lösung mit 1 Vol. Chloroform

↓

Phasentrennung durch Zentrifugation bei 13.000 upm und 15°C für 10 min

↓

Nach Überführung der wässrigen Lösung in ein neues Reaktionsgefäß Durchführung einer Nukleinsäurefällung

2.2.2.2 Nukleinsäurefällung

Die Nukleinsäurefällung dient der Konzentrierung von Nukleinsäuren, ihrer Überführung in andere Puffersysteme und der Abtrennung von niedermolekularen Verunreinigungen aus einer Nukleinsäurelösung. Die Fällungen wurden nach den von Sambrook & Russel (2001) beschriebenen Methoden durchgeführt.

Isopropanolfällung

Die Nukleinsäurelösung wird mit 1/5 Vol. 5 M NaCl und 1 Vol. Isopropanol (- 20°C) versetzt. Nach sorgfältigem Mischen wurden die Proben bei 4°C und 14.000 upm für 30 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein Waschen des Sedimentes mit 70% Ethanol. Nach Zentrifugation bei 4°C und 14.000 upm für 20 min wurde die Nukleinsäure in der SpeedVac getrocknet und in geeignetem Volumen H_2O aufgenommen.

Ethanolfällung

Die Proben wurden mit 2,5 Vol. Ethanol abs. und wahlweise mit 1/10 Vol. 4 M LiCl oder 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5.2) versetzt und gut gemischt. Nach einer Inkubation über Nacht bei - 20°C oder für mindestens einer Stunde bei - 70°C wurden die Proben bei 4°C und 14.000 upm 30 min zentrifugiert. Der erhaltene Niederschlag wurde nach Entfernen des Überstandes mit 70% Ethanol gewaschen und wiederum bei 14.000 upm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Das Sediment wurde nach dem Trocknen in der SpeedVac in geeigneten Volumen H_20 gelöst.

2.2.2.3 Isolierung genomischer DNA

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden zur DNA-Isolation aus verschiedenen Pflanzengeweben angewandt. Hierfür wurde sowohl frisches als auch bei -20°C gelagertes Material verwendet.

Isolierung mit dem "E.Z.N.A® Plant DNA Mini Kit"

Sollte die isolierte DNA als Matrize einer PCR dienen, wurde das "E.Z.N.A® Plant DNA Mini Kit" ausgewählt. In Abweichung des Herstellerprotokolls wurden die Schritte zur Homogenisierung und Lyse modifiziert (Dr. Stephanie Weitnauer, pers. Mitteilung) und wie hier beschrieben durchgeführt:

150 - 200 mg Blattmaterial im Eppendorf-Gefäß unter flüssigem Stickstoff mörsern

↓

Pulver in 100 µl H_2O_{DEPC} resuspendieren

↓

Zugabe von 300 µl SDS-EB-Puffer (2% SDS, 400 mM NaCl, 40 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0) mehrfaches Invertieren

↓

Zugabe von 140 µl P2-Puffer, mischen

↓

Zentrifugation bei 14.000 upm für 10 min, Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß

↓

weitere Durchführung gemäß Herstellerprotokoll

Isolierung mit dem "Plant DNA Isolation Kit"

Als Ausgangsmaterial für den "GenomeWalk" ist eine besonders hochmolekulare DNA notwendig. Diese wurde nach Angaben des Herstellers mit dem "Plant DNA Isolation Kit" isoliert.

2.2.2.4. RNA-Extraktion aus pflanzlichen Geweben

Die RNA-Extraktion erfolgte nach Chirgwin *et al.* (1979), modifiziert nach Marie-Christin Guitton (pers. Mitteilung). Als Ausgangsmaterial diente schockgefrorenes Blattmaterial unterschiedlicher Pflanzenspezies.

50 mg Blattgewebe unter flüssigen N_2 in einem Mörser pulverisieren

↓

Zugabe von 800 µl Denaturierungspuffer (4 M Guanidinthiocyanat (GTC), 0,2 M β-Mercaptoethanol), homogenisieren

↓

Überführen des Homogenisats in ein steriles Reaktionsgefäß,

5 min Zentrifugation bei 13.000 upm und RT

↓

Isopropanolfällung der RNA aus Überstand

↓

Sediment in 200 µl H_20_{DEPC} aufnehmen

↓

Phenol / Chloroform Extraktion

↓

Ethanolfällung der RNA aus Überstand

↓

Sediment nach Trocknung in SpeedVac in 20 µl H_20_{DEPC} aufnehmen

↓

Lagerung bei - 20°C

2.2.2.5 DNA-Verdau

Um eine eventuelle Verunreinigung der isolierten Gesamt-RNA mit DNA zu vermeiden, erfolgte vor weiterer Nutzung der RNA teilweise ein DNA-Verdau. Dieser wurde mit DNase I von Fermentas nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

TBE-Gele

Je nach erwarteter Größe der aufzutrennenden DNA wurden 0,8 bis 2,0 % Agarose in 1 x TBE-Puffer (1 x TBE-Puffer: 90 mM Tris, 90 mM Borat, 2 mM EDTA, pH 8,0) durch Aufkochen gelöst. Nach Zugabe von 0,5 µg / ml Ethidiumbromid wurde die Agarose-Lösung in den Gelträger gegossen. Die Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit dem 6-fach konzentrierten Probenpuffer LB III nach Sambrook & Russel (2001) (0,25 % Bromphenol-blau, 0,25 % Xylencyanol FF, 30 % Glycerol in H_2O_{DEPC}) versetzt. Eine Auflistung der verwendeten Längenstandards befindet sich im Anhang unter Punkt II. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet, dem 0,5 µg / ml Ethidiumbromid hinzugefügt wurde. Die Elektrophorese erfolgte, je nach Größe der verwendeten Kammer, bei 80 - 120 V konstanter Spannung. Die Auftrennung wurde mit Hilfe einer Video-Dokumentationsanlage analysiert (GelVue UV Transilluminator, Syngene).

Modifizierte TAE-Gele

Sofern DNA-Fragmente aus dem Gel eluiert werden sollten, wurden modifizierte TAE-Gele (1 x TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 0,1 mM Na_2EDTA, pH 8,0) nach dem Montage - DNA Gel Extraction Kit" von Millipore angewendet und nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Proben wurden ebenfalls mit dem LB III versetzt. Die Elektrophores erfolgte unter Verwendung eines 1 x TAE Puffers und unter gleichen Voraussetzungen wie bei TBE-Gelen beschrieben.

Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

RNA wurde in denaturierenden 1,5 %igen 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)-Agarose-Formaldehydgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Für ein Minigel (8,0 x 6,5 cm) wurden 0,75g Agarose in 5 ml 10 x MOPS und 44 ml H_2O_{DEPC} durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 65°C erfolgte die Zugabe von 0,9 ml 37 % Formaldehyd und die sofortige Überführung in den Gelträger. Das ausgehärtete Gel wurde anschließend für 30 min im Laufpuffer äquilibriert. Die Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit 5 x Probenpuffer versetzt. Als Längenstandard wurde entweder ein RNA Marker aus eigener Herstellung oder die im Anhang dargestellten DNA-Marker verwendet. Folgte der elektrophoretischen Auftrennung eine Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden (2.2.3.16), so wurde zusätzlich der Digoxigenin-markierte RNA-Längenstandard II (Roche) eingesetzt (Anhang 7.2.2).

Die Elektrophorese wurde bei 50 V konstanter Spannung durchgeführt und die Auftrennung mit Hilfe einer Video-Dokumentationsanlage festgehalten.

10 x MOPS	5 x Probenpuffer 10 ml Ansatz	Laufpuffer 1 l
200 mM MOPS	16 µl Bromphenolblau (mg/ml)	100 ml 10 x MOPS
50 mM Na-Acetat	80 µl 500 mM EDTA	20 ml 37 % Formaldehyd
10 mM EDTA	100 µl EtBr (10 mg/ml)	880 ml H_2O_{DEPC}
pH 7,0, DEPC behandelt	720 µl 37 % Formaldehyd	
autoklaviert	2 ml 100 % Glycerol	
	3084 µl deionisiertes Formamid	
	4 ml 10 x MOPS	

2.2.2.7 mRNA-Isolation aus Gesamt-RNA

Die mRNA-Isolation aus Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des "NucleoTrap® mRNA Mini Kit" von der Firma Macherey-Nagel (Düren) durchgeführt und erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.3 Genom-Analysen

2.2.3.1 PCR (Polymerase-Chain-Reaction)

In dieser Arbeit wurde die PCR für verschiedene Zwecke eingesetzt. Zum einen diente sie der Amplifizierung von spezifischen DNA- oder cDNA-Sequenzen, zum anderen der Überprüfung von Klonierungen. Sofern nicht anders vermerkt, wurde standardmäßig folgender Ansatz verwendet:

X µl	Template oder einzelne Bakterienkolonien
1 µl	10 mM dNTP-Mix
20 pmol	"Forward-Primer"
20 pmol	"Reverse-Primer"
5 µl	10 x PCR-Puffer
2,5 U	Taq-Polymerase

ad 50 µl ddH_2O

Je nach Größe der zu amplifizierenden Nukleinsäure sowie nach "Annealing"-Temperatur der verwendeten Primer wurde ein geeignetes PCR-Programm erstellt:

Denaturierung	2 min	94°C
30 - 35 Zyklen:		
"Annealing"	0,5 min	X°C (primerspezifisch)
Elongation	X min (1 min / 1 kb)	72°C
Denaturierung	0,5 min	94°C
finaler Zyklus:		
"Annealing"	3 min	X °C (primerspezifisch)
Elongation	6 min	72°C

Die PCR-Produkte wurden anschließend in einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert und gegebenenfalls bei -20°C gelagert.

2.2.3.2 RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)

Erststrangsynthese:

Zur Herstellung von cDNA-Erststrängen wurden in dieser Arbeit verschiedene Enzyme verwendet, deren Auswahl nach unterschiedlichen Parametern erfolgte. Für sehr lange RNA Templates (> 2 kb) wurde die M-MuLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus (Fermentas) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Fehlen der RNase H Aktivität verhindert das Degradieren von Template-RNA bei langen Inkubationszeiten, die bei der Herstellung von längeren cDNAs benötigt werden. Die Herstellung von cDNA bis zu 2 kb wurde entweder mit der AMV Reversen Transkriptase (Promega) oder der M-MulV Reversen Transkriptase (Fermentas) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Allerdings wurde in einigen Versuchen die Synthesetemperatur von 42°C auf 50°C angehoben, wodurch unspezifische Produkte zum größeren Teil eliminiert werden konnten.

Bei Versuchen zum Tri-Hybrid-System sollten ausgehend von der hergestellten cDNA eine Transkription und Translation erfolgen. Daher wurde für diese Erstrangsynthese die SuperScript II Reversen Transkriptase von Invitrogen verwendet, die sich vor allem durch ihre niedrige Fehlerrate auszeichnet.

Zweitstrangsynthese:

2 - 5 µl des oben hergestellten Erstranggemisches wurden als Template in eine PCR (2.2.3.1) mit sequenzspezifischen Primern eingesetzt.

2.2.3.3 "RACE" (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Zur Analyse des unbekannten 5'-cDNA-Bereiches von cdc5 wurde, ausgehend von bekannten Sequenzen eine 5'-"RAC"E mit dem SMART-System (verbessert nach Matz *et al*., 1999) durchgeführt. Als sequenzspezifischer Primer wurde hierfür myb-R302 abgeleitet.

Erstrangsynthese:

2 µg	Gesamt-RNA
1 µM	Oligo-Anker Primer
1 µM	SMART "template switch primer"

ad 11 µl H_2O_{DEPC}

↓

2 min 72°C, anschließend bei RT abkühlen lassen

↓

Zugabe von:

4 µl	5 x Transkriptions-Puffer
2 µl	10 mM dNTP-Mix
2 µl	100 mM DTT
1 µl	SuperScript II Reverse Transkriptase (200 U)

↓

1 - 1,5 h bei 42°C inkubieren

↓

Zugabe von 30 µl 0,5 x TE und Inkubation bei 72°C für 7 min

Zweitstrangsynthese 5'-"RACE":

2 µl	Erststrang
0,1 µM	"Heel Carrier Primer"
0,3 µM	"Heel Specific Primer"
0,5 µM	myb-R302 Primer
1 µl	10 mM dNTP-Mix
5 µl	10 x PCR-Puffer (1,75 mM $MgCl_2$)
2 U	Taq-Polymerase

ad 50 µl H_2O_{DEPC}

Die PCR erfolgte für 30 Zyklen, bei einer "Annealing"-Temperatur von 55°C und einer Elongationszeit von 3 min. Die erhaltenen Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert.

2.2.3.4 "Genome-Walk"

Mit Hilfe des "Universal Genome Walker™ Kit" der Firma Clontech sollten fehlende DNA-Sequenzen aus 5'- und 3'-Bereich vervollständigt werden. Das Prinzip dieses Kits, welches nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde, liegt zunächst in der Herstellung von DNA-Bibliotheken, bestehend aus unklonierten, Adaptor-ligierten genomischen DNA-Fragmenten. Die Adaptoren beinhalten zwei Adaptor-Primer-Bindungsstellen, so dass mit den entsprechenden Adaptor-Primern sowie den spezifischen Primern eine PCR und eine nachfolgende "Nested-PCR" durchgeführt werden kann. Die Produkte der "Nested-PCR" wurden anschließend kloniert und sequenziert (2.2.3.6 und 2.2.3.11). Für den "5'-Walk" wurden die cdc5-spezifischen Primer myb-R440-5' ("Gen specific primer 1", GSP1) und myb-R393-5' als GSP2 abgeleitet. Der "3'-Walk" wurde mit den Primern myb-3231-3' (GSP1) und myb-3283-3' (GSP2) durchgeführt.

2.2.3.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, welche direkt für eine Sequenzierung eingesetzt werden sollten, wurden zuvor mit dem "High Pure PCR Product Purification Kit" von Roche nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.3.6 Klonierungsstrategien

"TA-Cloning"

Eine ungerichtete Klonierung von PCR-Produkten erfolgte über das "TA-Cloning", welches mit den folgenden Kits weitestgehend nach Angaben der Hersteller durchgeführt wurde:

TA Cloning® Kit
TOPO TA Cloning® Kit
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing
} Invitrogen (Karlsruhe)

pGEM® T Easy Vector System I von Promega (Mannheim)

Abweichend von den Herstellerangaben wurde jeweils nur 0,5 µl des Vektors für die Ligation eingesetzt.

Direkte Klonierung über Restriktionsschnittstellen

Die Klonierung von cdc5-Fragmenten und der PSTVd-cDNA in die Vektoren des Tri-Hybrid-Systems (pACT2 und pRevRX) sowie von cdc5-Fragmenten in den pET 30a(+)-Expressionsvektor erfolgte direkt über die Verwendung einer einzelnen Schnittstelle. Eine gerichtete Klonierung war nicht möglich, da sich unter Berücksichtigung der cdc5-Sequenz jeweils nur eine Schnittstelle der Vektoren zur Klonierung eignete. Für die Vektoren pACT2 und pET 30a(+) wurde die Restriktionsschnittstelle Nco I, für pRevRX die Restriktionsschnittstelle Not I ausgewählt. Der Versuchsablauf war wie folgt:

Herstellung der Klonierungsprodukte:

Die für die Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen wurden über PCR an die jeweiligen Sequenzen angefügt. Als Template dienten cdc5-cDNA sowie der Viroid-Klon pRW 58. Als Primer wurden im Fall der cdc5-Produkte sequenzspezifische Primer verwendet, die um die Sequenz von Nco I verlängert wurden. Im Fall der Viroid-cDNA wurden vektorspezifische T3 und T7 Primer um die Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms Not I verlängert. Die so synthetisierten PCR-Produkte wurden mit dem entsprechenden Restriktionsenzym restringiert und im Anschluss hieran über ein TAE-Agarose-Gel aufgereinigt. Spezifische Banden wurden eluiert und durch Ethanolfällung konzentriert.

Vorbereitung des Klonierungsvektors:
Der Klonierungsvektor wurde mit entsprechendem Restriktionsenzym restringiert und anschließend mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um die Religation des Vektors zu verhindern. Nach anschließender Phenol-Chloroformextraktion wurde der Vektor einer Ethanolfällung unterzogen und in geeignetem Volumen ddH_2O aufgenommen.

Ligation der DNA-Fragmente:
Die Ligation erfolgte im nachstehenden Ansatz bei 16°C über Nacht.

ca. 100 ng	restringiertes PCR-Produkt
ca. 50 ng	restringierter Vektor
2 U	T4-DNA-Ligase
2 µl	10 x Ligase-Puffer

ad 20 µl ddH_2O

Gerichtete Klonierung
Die Klonierung vermuteter cdc5-Promotorfragmente in den GFP-Vektor pmon30049 musste gerichtet erfolgen. Hierzu eigneten sich die Schnittstellen HindIII und BamHI.

Herstellung der Klonierungsprodukte:
Für die Herstellung der Klonierungsprodukte wurden die sequenzspezifischen "Forward-Primer" um die Sequenz von HindIII verlängert, die sequenzspezifischen "Reverse-Primer" um die Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms BamHI. Die Restriktion mit beiden Enzymen konnte in einem Ansatz unter der Verwendung des MBI-Puffers R^+ erfolgen. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte nach der unter "direkte Klonierung" beschriebenen Methode.

Vorbereitung des Vektors:
Da unter Verwendung der Restriktionsenzyme HindIII und BamHI der vektoreigene 35S-Promotor sowie ein HSP70 Intron aus dem Vektor entfernt werden, erfolgte nach der Restriktion eine Aufreinigung über ein TAE-Gel. Die vektorspezifische Bande wurde aus dem Gel eluiert, einer Ethanolfällung unterzogen und in geeignetem Volumen ddH_2O aufgenommen.

Ligation der DNA-Fragmente:
Die Ligationen erfolgten nach der unter "direkte Klonierung" beschriebenen Methodik.

2.2.3.7 Transformation von *E.coli* mit Klonierungsprodukten
Für die Transformation der Ligationsansätze wurden 100 µl chemisch kompetente Zellen des *E.coli*-Stammes DH5α verwendet. Der Versuchsablauf war wie folgt:

Auftauen der chemisch kompetenten Zellen auf Eis
↓
Zugabe von 5 - 10 µl Ligationsansatz und Inkubation für 30 min auf Eis
↓
30 sec bei 42°C inkubieren und sofortige Abkühlung auf Eis
↓
250 µl SOC (RT) hinzufügen und den Ansatz im Eppendorf-Gefäß horizontal bei 37°C und 150 upm für 1 h inkubieren
↓
50 - 200 µl auf LB-Agar-Platten ausplattieren

Die Anzucht der transformierten Bakterien erfolgte auf LB-Agar-Platten, die je nach vektorspezifischer Resistenz mit 150 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin versetzt wurden. Eine Selektion der Rekombinanten erfolgte, wenn möglich, über das Blau-Weiss-"Screening" für welches die LB-Agar-Platten zuvor mit jeweils 40 µl X-Gal (40 mg/ml) und IPTG (100 mM) bestrichen wurden.

2.2.3.8 PCR-Analyse rekombinanter Plasmide
Kolonien rekombinanter Plasmide wurden mittels PCR-Analyse auf die Insertgröße hin überprüft. Einzelne Kolonien wurden hierfür, nach Überimpfen auf eine "Masterplate", direkt als Template in eine PCR mit vektorspezifischen Primern eingesetzt.

2.2.3.9 Isolierung von Plasmid-DNA
Bakterienkultur
Zum Erhalt einer Reinkultur wurden Bakterien aus Glycerol-Stammkulturen mittels einer sterilen Impföse dünn auf LB-Festagarplatten ausgestrichen (Luria-Bertani-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, pH7,3, 15 g Agar, H_2O ad 1000 ml, autoklaviert). Die LB-Agarplatten sowie LB-Flüssigmedium erhielten Antibiotika in

folgenden Konzentrationen: Ampicillin 150 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml. Nach Ausstrich der Klone erfolgte eine Inkubation bei 37°C. Resultierende Einzelkolonien oder Kolonien von "Masterplates" wurden in einen Erlenmeyer-Kolben mit 10 - 100 ml LB-Flüssigmedium (+ Antibiotikum) überführt und über Nacht im Thermoschrank bei 37°C und 150 upm kultiviert.

Für die Plasmidisolierung wurde je nach der Kopienzahl die Mini-Präparation nach Holmes & Quigley (1981) ("high-copy"-Plasmide) und das "Nucleo Bond PC100"-Kit ("low und midcopy"-Plasmide) eingesetzt.

Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli (Holmes & Quigley, 1981)
Die Isolationsmethode wurde nach Transformation des DH5α mit den Vektoren pCR® 2.1-TOPO, pCR® 4-TOPO, pCR® II sowie pGEM®- T Easy durchgeführt.

1,5 ml einer *E.coli* Übernachtkultur 15 sec bei 13.000 upm und RT zentrifugieren

↓

Überstand verwerfen, Sediment in 250 µl TELT-Puffer (50 mM Tris / HCL pH 7.5, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 0,4 % Triton X-100) resuspendieren, auf Eis lagern

↓

Zugabe von 25 µl einer 1 %igen frischen Lysozym-Lsg., 5 min auf Eis inkubieren

↓

Erhitzen der Probe für 2 min auf 95°C, anschließend auf Eis für 5 min

↓

Zentrifugation bei 4°C und 13.000 upm für 10 min

↓

schleimiges Sediment verwerfen

↓

Überstand mit Phenol / Chloroform extrahieren

↓

wässrige Phase mit 1 Vol. Isopropanol (- 20°C) versetzen und mischen, Zentrifugation bei 4°C und 13.000 upm für 20 min

↓

Niederschlag mit 70 %igen Ethanol waschen, anschließend in SpeedVac trocknen

↓

Plasmid-DNA in 10 µl H_2O aufnehmen

↓

Restriktionsanalyse (2.2.3.10)

↓

Lagerung bei - 20°C

Plasmid-DNA Isolation mit dem Nucleo Bond PC 100 Kit

Diese Methode wurde nach Transformation von DH5α mit den Vektoren pmon30049, pET30a und den Vektoren des Tri-Hybrid-Systems nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Auch nach einer Transformation der Rosettazellen mit pET30a erfolgte die Isolation der Plasmide mit Hilfe dieser Methode.

2.2.3.10 Restriktionsanalyse isolierter Plasmid-DNA

Zum Größenabgleich und zur Mengenabschätzung wurde 1 µl der isolierten Plamid-DNA mit 10 U Restriktionsenzym und 2 µl 10 x Restriktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl linearisiert. Die Restriktion erfolgte für eine Stunde bei geeignetem Temperaturoptimum. 10 µl des Restriktionsansatzes wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und anhand des verwendeten Längenmarkers analysiert.

2.2.3.11 Sequenzierung von rekombinanten Plasmiden und PCR-Produkten

Die Sequenzierungen wurden unter Verwendung des "Big Dye-Terminator-Kits" (Applied Biosystems) durchgeführt.

Reaktionsansatz:

X µl	Template (Plasmide: 500 ng, PCR-Produkte: 100 ng / 400 bp)
2 µl	"Big Dye"
6 µl	2,5 x Puffer (PE Biosystem)
15 pmol	Primer

ad 20 µl ddH_2O

Die PCR-Sequenz-Reaktion erfolgte nach dem Programm für "Big Dye"-Sequenzierungen:

Denaturierung	3 min	94°C
25 Zyklen:		
"Annealing"	20 sec	X°C (primerspezifisch)
Elongation	4 min	60°C
Denaturierung	20 sec	96°C
finaler Zyklus:		

"Annealing"	20 sec	X°C (primerspezifisch)
Elongation	4 min	60°C

Im Anschluss an die Sequenzreaktion erfolgte eine Alkoholfällung des Produktes, indem 45 µl Ethanol absolut (RT) hinzugefügt wurden. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 14.000 upm und RT wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat 5 min in der SpeedVac getrocknet. Die Analyse erfolgte im Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurologie der Universität Hamburg unter Verwendung des ABI-Sequenator 377 (Applied Biosystems).

2.2.3.12 Computerauswertung der Sequenzen

Sämtliche Auswertungen der Sequenzen (z.B. Alignments, Translation, Restriktionsschnittstellen, "Editing") wurden mit der Software "DNA Star" der Firma Lasergene durchgeführt. Für Datenbankrecherchen wurde die Internet-Datenbank BLAST des NCBI verwendet. Putative RNA-Bindedomänen wurden über die Software "RNABindR" der "Iowa State" Universität (Terribilini *et al.*, 2006) erhalten. Phosphorylierungsstellen in der vorgeschlagenen CDC5-Proteinsequenz wurden über "Pattern Search" des "PIR-Protein Information Resource" sowie über "Prosite" von ExPASy zugewiesen. Zur Analyse des cdc5-spezifischen Promotors wurde "Promotor 2.0 Prediction Server" des "Centers for Biological Sequence Analysis" Lynghy (Dänemark) verwendet.

2.2.3.13 Herstellung von RNA-Hybridisierungssonden

In dieser Arbeit wurden über *in vitro*-Transkription verschiedene Digoxigenin (DIG)-markierte Antisense-RNA-Hybridisierungsonden hergestellt:

a) (+)-Strang-spezifische PSTVd-Sonde

Zum Nachweis einer Viroidakkumulation in Versuchspflanzen sowie zum Nachweis des Viroids im Tri-Hybrid-System wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt. Hierzu war es notwendig, eine (+)-Strang-spezifische PSTVd-Sonde herzustellen. Des Weiteren sollte mit Hilfe der PSTVd-Sonde der Nachweis des Viroides im "Gel-Shift" erfolgen. Als Template für die Viroid-Sonde wurde restringierte Plasmid-DNA des Viroid-cDNA-Klones pRW 58 verwendet.

b) cdc5-spezifische Sonde

Die cdc5-spezifische Sonde diente zum Nachweis von cdc5-mRNA in Norther-Blot-Experimenten, welche begleitend zum Tri-Hybrid-System durchgeführt wurden. Als

Template für die cdc5-Sonde wurde Plasmid-DNA des Klones 3858/R3365 eingesetzt. Als Vektor diente pGEM®-T Easy, in welchem das mit Hilfe der Primer myb-2858 und myb-R3365 synthetisierte cdc5-spezifische PCR-Fragment kloniert wurde.

c) Gal4-AD-spezifische Sonde

Im Tri-Hybrid-System wurden Fusionsproteine aus CDC5 und der Gal4-Aktivierungs-Domäne (Gal4-AD) hergestellt. Um in Southern-Blot-Experimenten die Fusions-cDNA nachweisen zu können, wurde eine Gal4-AD-spezifische Sonde synthetisiert. Als Template diente hier der Klon Gal4-AD 3-11. Zur Synthese dieses Klons wurden Gal4-AD-spezifische Primer hergestellt. Diese wurden anhand von Gal4-AD-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank abgeleitet. Nach PCR mit Gal4-AD-spezifischen Primern auf den Vektor pACT2, wurde das erhaltene Fragment in den Vektor pCR® II kloniert.

in vitro-Transkription

Die zuvor genannten RNA-Sonden wurden wie folgt hergestellt:

2 µg	restringierte Plasmid-DNA	
4 µl	5 x Transkriptionspuffer	
2 µl	10 x DIG-NTP-Mix (je 10 mM ATP, GTP, CTP; 6,5 mM UTP; 3,5 mM DIG-UTP)	
2 µl	RNA-Polymerase (20 U/µl):	T3-RNA-Polymerase → Viroid
		Sp6-RNA-Polymerase → cdc5
		T7-RNA-Polymerase → Gal4-AD
1 µl	RNase-Inhibitor (40U/µl)	

ad 20 µl H_2O_{DEPC}

Nach Inkubation für 2 Stunden bei 37°C wurde eine Ethanolfällung durchgeführt und die RNA anschließend in 100 µl H_2O_{DEPC} aufgenommen. Das Ergebnis der *in vitro*-Transkription wurde auf einem RNA-Gel überprüft.

Überprüfung der Sondenkonzentration

Um die Konzentration der durch *in vitro*-Transkription erhaltenen Sonden zu ermitteln, wurden "Spot-Blots" durchgeführt. Von den Dig-markierten Transkripten wurden jeweils 2 µl der folgenden Verdünnungen auf eine Nylonmembran (Hybond NX, Amersham Pharmacia) aufgebracht: 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}. Als Referenz diente eine Digoxigenin-markierte

Kontroll-RNA (Roche) folgender Konzentrationen: 20 ng, 200 pg, 20 pg, 2 pg, 200 fg. Die RNA wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht in einem UV-Stratalinker™ 1800 bei 120 mJ mit der Nylonmembran quervernetzt. Die Chemilumineszenz-Signale wurden anschließend detektiert (2.2.3.17) und durch einen Vergleich der Signalstärken bei Kontroll- und Sonden-RNA die Sondenkonzentration abgeschätzt.

2.2.3.14 Northern-Blot-Analysen

Die im Formaldehydgel aufgetrennte RNA wurde mit Hilfe einer TurboBlotter™ -Apparatur der Firma Schleicher & Schuell auf eine Nylonmembran (Hybond NX, Amersham Pharmacia) übertragen. Das Prinzip der Apparatur basiert auf dem von Chomczynski (1992) beschriebenen "Downwardblotting", bei dem neben den Kapillarkräften auch die Schwerkraft genutzt wird. Ein geeigneter Puffer (20 x SSC: 3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat, H_2O ad 1000 ml, pH 7,0, DEPC behandelt) wird durch die Kapillarkräfte von speziellen Membranen und Papieren durch das Gel gezogen. Dabei wird die RNA aus dem Gel auf die darunter liegende Nylonmembran übertragen. Um Formaldehyd zu entfernen, wurde das Gel 3 x 5 min in H_2O_{DEPC} gewaschen, anschließend 2 x 15 min in 20 x SSC äquilibriert. Die Membran wurden eine Minute in H_2O_{DEPC} benetzt, anschließend 5 min in 20 x SSC äquilibriert, bevor das Gel aufgelegt wurde. Der Transfer erfolgte über Nacht mit 20 x SSC. Der Erfolg des Transfers wurde unter UV-Licht und einer Video-Dokumentationsanlage überprüft. Nach Quervernetzung der RNA auf der Membran durch UV-"Crosslinking" konnte die Membran bis zur Hybridisierung bei 4°C gelagert werden.

2.2.3.15 Southern-Blot Analysen

cDNA-Fragmente wurden in einem 1 %igen TBE-Agarosegel aufgetrennt und ähnlich dem Northern-Blot mittels TurboBlotter™-Apparatur auf eine Nylonmembran transferiert. Die Durchführung war wie folgt:

Gel 5 min in H_2O_{DEPC} waschen

↓

Gel 2 x 15 min in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) vorsichtig schütteln

↓

kurzes Waschen des Gels in H_2O_{DEPC}

↓

Gel 2 x 15 min in Neutralisationspuffer (0,5 M Tris-HCl (pH 7,5), 3 M NaCl) schwenken

↓

Aufbau des Blots und Transfer der cDNA über Nacht mit 20 x SSC

↓

"Crosslinking" der cDNA und Videodokumentation des Transfers

↓

Lagerung der Membran bei 4°C

2.2.3.16 Hybridisierung

Zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuren folgt dem Northern- und Southern-Blot die Hybridisierung der Membranen mit ausgewählten Dig-markierten-RNA-Sonden. Die Membranen für den Northern-Blot wurden bei 68°C, die Membranen für den Southern-Blot bei 50°C für eine Stunde in Hybridisierungslösung prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte nach Zugabe von 20 - 100 ng denaturierter Sonde / ml Hybridisierungspuffer bei den oben beschriebenen Temperaturen über Nacht. Nach Hybridisierung wurde die verwendete Sonde in Hybridisierungslösung gesammelt und bei -20°C gelagert. Die Membranen wurden zunächst 2 x 5 min bei RT in Waschlösung 1 gewaschen (nicht-stringent). Anschließend erfolgte stringentes Waschen der Membranen bei 68°C in Waschlösung 2 für 2 x 15 min.

Hybridisierungslösung:	Waschlösung 1:	Waschlösung 2:
5 x SSC	2 x SSC	0,1 x SSC
50 % Formamid deionisiert	0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) N-Laurylsarcosid		
2 % (w/v) Blocking		
0,02 % (w/v) SDS		

2.2.3.17 Detektion

Im Anschluss an die Hybridisierung erfolgte die Detektion der Hybridisierungssignale nach dem "DIG Application Manual" für Filter Hybridisierung (Roche).

Membran 5 min in Maleinsäurepuffer äquilibrieren

(0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5)

↓

30 min Inkubation in Blockingpuffer (2% Blockingreagenz in Maleinsäurepuffer)

↓

Zugabe von Anti-Dig-AP Fab Fragmenten zum Blockingpuffer im Verhältnis 1:10.000)

↓

30 min Inkubation

↓

Membran 2 x 15 min in Waschpuffer waschen (Maleinsäurepuffer + 0,3 % Tween 20)

↓

5 min in Detektionspuffer äquilibrieren (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5)

↓

ca. 200 µl verdünnter CSPD-Stammlösung (1:100 in Detektionspuffer)
auf der Membran verteilen

↓

Membran in Folie einschweißen

↓

Detektion der Chemilumineszens-Signale durch Exposition gegen einen Röntgenfilm
(Hyperfilm™-ECL, Amersham oder Super RX, Medical X-Ray Film, Fuji)

Die Zeit der Exposition richtete sich nach der Stärke der auftretenden Signale und lag im Bereich von 1 min bis zu 16 Stunden.

2.2.3.18 "Stripping" - Entfernen einer Dig-markierten RNA-Sonde von Northern-Blot Membranen

Bei Versuchen zum Tri-Hybrid-System sollten die Transkripte von Viroid und cdc5 in einer Gesamt-RNA Isolation nachgewiesen werden. Dieses erfolgte mittels Northern-Blot Hybridisierung. Da sich die Hybridisierungssignale von Viroid und cdc5 überlagern können, war ein "Stripping" der Membran nach erster Hybridisierung notwendig.

Membran gründlich mit H_2O_{DEPC} waschen

↓

Membran 2 x 60 min bei 80°C in "Stripping"-Puffer inkubieren (50 % deionisiertes
Formamid, 5 % SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5))

↓

5 min mit 2 x SSC waschen

↓

erneute Hybridisierung

2.2.3.19 Primer-Extension

Die Primer-Extension diente der exakten Bestimmung des Transkriptionsstarts der cdc5-mRNA und der hieraus resultierenden Eingrenzung des putativen Promotorbereiches.

Ausgehend von einem Dig-markierten sequenzspezifischen "Reverse-Primer" werden eine cDNA-Erstrang-Synthese und eine Sequenzreaktion, nach der von Sanger *et al*. (1977) eingeführten "chain-termination" Methode eingeleitet. Beide Reaktionen werden anschließend gemeinsam in einer GATC-Direkt-Blotting-Apparatur gelelektrophoretisch aufgetrennt und während der PAGE direkt auf eine GATC-Nylon-Membran transferiert. Der Nachweis der Dig-markierten Fragmente erfolgte über eine Chemilumineszens-Detektion nach Roche. Über einen Vergleich des Terminationspunktes der cDNA-Synthese mit der daneben aufgetrennten Sequenzreaktion kann somit der exakte Transkriptionsstart identifiziert werden.

Sequenzreaktion

Die Sequenzreaktion wurde unter Verwendung des "Dig Taq DNA Sequencing Kit for Standard an Cycle Sequencing" (Roche) weitgehend nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Template diente der aus dem "Genome-Walk" resultierende Klon DL 3/ 15. Als Primer wurden die cdc5-spezifischen Dig-markierten Primer myb-R4402Dig oder myb-R3425 verwendet.

Reaktionsansatz:

1 - 2 pmol	Plasmid-DNA
3 pmol	Dig-markierter Primer
2 µl	10 x Reaktionspuffer
3 U	Taq-Polymerase

ad 20 µl ddH_2O

Jeweils 4 µl des Reaktionsansatzes werden mit 2 µl der jeweiligen Terminations-Mischung versetzt (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 25 µM, Didesoxy-Nukleotide ddATP (850 µM, 950 µM $MgCl_2$), ddCTP (400 µM, 500 µM $MgCl_2$) ddGTP (75 µM, 175 µM $MgCl_2$) und ddTTP (1275 µM, 1370 µM $MgCl_2$). Die Sequenzreaktion wurde unter Verwendung des unten beschriebenen Sequenz-Programmes für "Cycle Sequencing" durchgeführt.

Danaturierung	5 min	95°C
30 Zyklen:		
"Annealing"	30 sec	60°C
Elongation	1 min	70°C
Denaturierung	30 sec	95°C

Nach erfolgter Sequenzreaktion wurden die Reaktionen durch Zugabe von 2 µl Formamid-Proben-Puffer gestoppt und bis zur PAGE bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor dem Gellauf wurden die Proben nochmals 3 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gelagert.

Erststrangreaktion:

Die cDNA-Erststrang-Synthese wurde bei 50°C mit Hilfe der AMV Reversen Transkriptase von Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Template diente DNase I-behandelte RNA der Tomatenkultursorte Rutgers. Als Primer wurden entweder myb-R4002Dig oder myb-R3425Dig verwendet. 6 µl der Reaktion wurden ebenfalls mit 2 µl des Formamid-Probenpuffers versetzt und bis zum Gellauf bei -20°C gelagert.

Herstellung eines 6%igen PA-Sequenzgels

6 ml 30%ige Acrylamidstammlösung und 24 ml Harnstofflösung
(14 M Harnstoff in 1 x TBE-GATC; 10 x TBE-GATC: 1,2 M Tris, 0,4 M Borsäure, 20 mM EDTA-Dinatriumsalz) mischen

↓

Lösung durch Faltenfilter filtrieren

↓

filtrierte Lösung 5 min entgasen

↓

Zugabe von 114,8 µl APS und 25,5 µl Temed

↓

Gellösung zügig mit Hilfe einer 20 ml-Spritze zwischen die Glasplatten gießen

Nach einer Polymerisationszeit von ca. 3 Stunden konnte der Gelvorlauf bei 30 W (1600 V, 18 mA) unter Verwendung von entgastem 1 x TBE-GATC für 30 min durchgeführt werden. Anschließend erfolgte der Auftrag der Reaktionsansätze, deren Einlauf bei 500 V für 20 min durchgeführt wurde. Der Hauptlauf erfolgte bei 30 W (1800 V, 16 mA) für ca. 3,5 Stunden. Sobald die Bromphenolblaufront die Gelunterkante erreichte (nach ca. 55 min) wurde die 40 cm lange Membran mit einer Förderbandgeschwindigkeit von 12 cm/h entlang der Gelkante bewegt.

Detektion der Membran

Die Detektion der Dig-markierten Fragmente erfolgt nach dem "DIG Applicaiton Manual" für Filter Hybridisierung (Roche) und wurde wie unter Punkt 2.2.3.17 beschrieben durchgeführt.

2.2.4 Promotorstudien

2.2.4.1 Herstellung von cdc5-Promotor / GFP-Konstrukten

Wie unter Punkt 2.2.3.6 bereits beschrieben, wurden die unterschiedlichen cdc5-Promotor-Fragmente über die Schnittstellen HindIII und BamHI in den GFP-Vektor pmon30049 kloniert. Als Positivkontrolle wurde der vollständige pmon30049 Vektor verwendet, bei welchem das GFP unter der Kontrolle des 35S-Promotors vorliegt. Als Negativkontrolle diente pmon30049 ohne 35S-Promotor und HSP70 Intron.

Herstellung der Negativkontrolle

Nach Restriktion des Vektors mit den Enzymen HindIII und BamHI wurde der Vektor über ein TAE-Gel aufgereinigt. Die vektorspezifische Bande wurde eluiert, die DNA mit Ethanol gefällt und in geeigneten Volumen ddH_2O aufgenommen. Für eine Ligation des Vektors erforderliche "Blunt-Ends" wurden mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase nach folgendem Ansatz erzeugt:

1 µg	restringierter aufgereinigter Vektor
2 mM	dNTP-Mix
4 µl	5 x T4-DNA-Polymerase Puffer
1 U	T4 DNA-Polymerase

ad 20 µl ddH_2O

Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert und die Reaktion anschließend für 10 min bei 70°C gestoppt. Die Religation des Vektors erfolgte nach dem Protokoll für "Blunt-End"-Ligation der T4-Ligase (Fermentas):

50 ng	Vektor
5 µl	10 x Ligasepuffer
5 µl	50 % PEG 4000
5 U	T4 DNA-Ligase

ad 50 µl ddH_2O

Der Ansatz wurde 1 h bei 22°C inkubiert und die Reaktion anschließend bei 65°C für 10 min gestoppt. 5 µl des Ansatzes wurden direkt in 100 µl chemisch kompetente Zellen DH5α transformiert.

2.2.4.2 Anzucht von Tomatenpflanzen zur Protoplastenisolation

Für Versuche zur Analyse der Promotorfunktion mittels transientem Gentransfer von GFP-Konstrukten in Mesophyll-Protplasten war die Anzucht von sterilen Tomatenpflanzen notwendig.

Oberflächensterilisation der Samen

Die Samen der verschiedenen Tomaten-Kultursorten wurden 1 min in 70 % Ethanol geschüttelt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Samen unter Rühren in 5 %iger Natriumhypochloritlösung, die mit einem Tropfen Tween 80 versetzt wurde. Nach dreimaligem Waschen mit sterilem Wasser wurden die Samen zur Keimung gebracht.

Anzucht der Pflanzen

Für die Keimung wurden die oberflächensterilisierten Samen auf MS-Vollmedium (Murashige & Skoog, 1962) in einem sterilem Weckglas ausgelegt. Die Anzucht erfolgte im Dunkeln bei 26°C. Nach ca. 7 Tagen wurden die etwa 5 cm langen Keimlinge für weitere 7 Tage ins Licht gestellt. Die Keimlinge wurden anschließend 2 cm unterhalb der Keimblätter abgetrennt und auf neues MS-Vollmedium umgesetzt. Unter kontrollierten Wachstumsbediungungen wuchsen die Pflanzen ca. 3 Wochen auf ihre Verwendungsgröße heran (Photoperiode von 16 h, Beleuchtungsintensität 200µE (VHO-Leutstoffröhre Typ TL-D 58W/33-640, Philips), Tagestemperatur 26°C, Nachtabsenkung auf 21°C).

2.2.4.3 Isolation von Mesophyllprotoplasten

Die für die Protoplastenisolation bestimmten Pflanzen wurden vor Verwendung 16 h bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Blätter der Tomatenpflanzen in CPW-M-Medium (19 mM $CaCl_2$ x $2H_2O$, 0,2 mM KH_2PO_4, 1 mM KNO_3, 1 mM $MgSO_4$ x $7H_2O$, 10 mM MES, 1 mM Polyvinylpyrrolidon 10, 0,4 M Mannitol, pH 5,6, 480 mOsmol/kg) in 1 mm schmale Streifen geschnitten und für eine Stunde im Dunkeln vorplasmolysiert. Das Präplasmolytikum wurde anschließend durch die Enzymlösung (0,3 Mazerozym R10, 1% Cellulase R10 in CPW-M) ersetzt. Der Verdau der Zellwand erfolgte bei 26°C im Dunkeln über Nacht. Die Protoplasten wurden nach der Inkubation durch leichtes Schwenken (50 upm)

aus dem Zellverband freigesetzt. Die verdauten Blattreste wurden zusammen mit der Enzymlösung durch ein 65 µm Stahlsieb filtriert, und das Filtrat 5 min bei 700 upm zentrifugiert. Die sedimentierten Protoplasten wurden daraufhin in CPW-16S Medium überführt (10 mM $CaCl_2$ x $2H_2O$, 0,2 mM KH_2PO_4, 1mM KNO_3, 1 mM $MgSO_4$ x $7H_2O$, 10 mM MES, 1 MM Polyvinylpyrrolidon 10, 0,47 M Sucrose, pH 5,6, 660 mOsmol/kg). Der Ansatz wurde anschließend mit W5 Medium überschichtet (125 mM $CaCl_2$ x $2H_2O$, 155 mM NaCl, 5 mM Glucose, 10 mM KCl, pH 5,6 - 5,8, 580 mOsmol/kg) und 15 min bei 600 upm zentrifugiert. Intakte Protoplasten "floaten" unter diesen Konditionen an die Grenzlinie zwischen DPW-16S und W5 Medium und sind als deutliche Interphase zu erkennen. Die Interphase wurde in 8 ml W5 Medium überführt, und die Protoplasten 5 min bei 600 upm sedimentiert. Nach erneutem Waschen mit W5 Medium erfolgte die Aufnahme der Protoplasten in einer Zelldichte von 5 x 10^6 Zellen / ml MaMg-Präkonditionierungslösung (0,4 M Mannit, 25 mM $MgCl_2$, pH 5,5, 580 mOsmol/kg).

2.2.4.4. DNA-Transfer in Mesophyll-Protoplasten von *Solanum lycopersicum* L.

Das Verfahren für den direkten DNA-Transfer in Protoplasten basiert auf der Verwendung von Polyethylenglykol (PEG) als Membranfusion-stimulierendes Agens. Die Transfektion wurde in Anlehnung an die von Negrutiu *et al*. (1987) etablierte PEG /Salz-Behandlung und an die von Krüger-Lebus & Potrykus (1987) beschriebene Methode eines effizienten direkten Gentransfers in Protoplasten durchgeführt.

Die in Präkonditionierungslösung befindlichen Protoplasten wurden zu 0,3 ml Aliquots in sterile 10 ml-Greinerröhrchen aufgeteilt. Es folgte jeweils die Zugabe von 2 µg Plasmid DNA sowie 5 µg "Carrier"-DNA (Heringssperma-DNA, Roche). Die Heringssperma-DNA wurde zuvor zu einer Konzentration von 10 mg/ml in H_2O gelöst, autoklaviert und mit Ultraschall behandelt. Die Ansätze wurden mit MaMg-Präkonditionierungslösung auf ein Volumen von 390 µl gebracht und vorsichtig geschwenkt, um die DNA gleichmäßig zu verteilen. Durch die Zugabe von 210 µl PEG (PEG 6000, 40 %ige Stammlösung) wurde die optimale Endkonzentration von 14 % erreicht. Es erfolgte die Inkubation für 30 min auf einem Eppendorf-Schüttler, um die Tranfektionseffizienz zu erhöhen. Zur Auflösung von Protoplastenaggregaten wurde schrittweise in 3 minütigen Abständen erst 1 ml $CaCl_2$-Lösung (3 % $CaCl_2$ x $2H_2O$, pH 5,6, 540 mOsmol/kg), dann 2 x 2 ml $CaCl_2$-Lösung zugegeben. Die Ansätze wurden 5 min bei 600 upm zentrifugiert, und die Protoplasten in B5-Kulturmedium zur weiteren Kultivierung bei 28°C im Dunkeln aufgenommen.

2.2.4.5 Auswertung der Transformationsergebnisse

Einen Tag nach Transformation der Protoplasten mit den Promotor / GFP-Konstrukten wurde die Transformationseffizienz sowie die Funktionalität des cdc5-Promotors am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35 M (Zeiss) überprüft und statistisch ausgewertet. Das UV-Licht wurde über eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO, 50 W (Osram) erzeugt. Für das GFP-Leuchten wurde der Filtersatz 09 (Zeiss) gewählt mit einer Anregung bei 450 - 490 nm und einer Emission bei 470 nm. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte über eine CCD Kamera (Sony), welche mit einer Langzeitintegration ausgerüstet war (XL003-LZI, M. Sticksel, CCD, Kameratechnik GmbH). Die Bildverarbeitung konnte anschließend über die Software "Image-Pro Plus" (Media Cybernetics) durchgeführt werden.

2.2.5 Tri-Hybrid-Studien

Die Versuche zum Tri-Hybrid-System (3H) wurden in Anlehnung an Putz *et al*., (1996) durchgeführt. Neben den Tri-Hybrid-Vektoren wurden auch die für Kontrollen verwendeten Plasmide pADRevM10, pRevR2, pSE111 und pSE1112 freundlicherweise von Prof. Kuhl (FU Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Klonierung der unterschiedlichen cdc4-cDNA-Fragmente (2858, 1930, 1226, 851, ATG und 3830) erfolgte wie bereits unter Punkt 2.2.3.6 beschrieben über die Nco I-Schnittstelle des pACT2-Vektors. Die PSTVd-RNA doppelter Länge wurde über Not I in den pRevRX-Vektor inseriert.

2.2.5.1 Transformation des Hefestammes CG-1945

Die Hefetransformation wurde nach dem "Small Scale Transformation"-Protokoll aus dem "Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3" Benutzerhandbuch (Clontech) durchgeführt. Unter Verwendung von jeweils 4 µg Plasmid-DNA wurden folgende Co-Transformationen durchgeführt:

1.	PSTVd	+	2858	Viroid-cdc5 Bindungsstudien
2.	PSTVd	+	1930	
3.	PSTVd	+	1226	
4.	PSTVd	+	851	
5.	PSTVd	+	pADRevM10	Kontrolle Viroid
6.	pRevR2	+	2858	Negativkontrollen cdc5
7.	pRevR2	+	1930	
8.	pRevR2	+	1226	
9.	pRevR2	+	851	
10.	pRevR2	+	pADRevM10	Positivkontrolle 3H-System

Der grundsätzliche Versuchsablauf verlief folgendermaßen:

Hefestamm CG-1945 aus einer Glycerol-Dauerkultur auf YPD-Platten ausstreichen und für 2 Tage bei 30°C inkubieren

↓

5 ml YPD-Medium mit einer Impföse der gewachsenen Hefen beimpfen und über Nacht bei 250 upm und 30° inkubieren

↓

3,5 ml der Übernachtkultur in 46,5 ml YPD-Medium geben und bis zu einer $OD_{600} = 0,5 \pm 0,1$ bei 250 upm und 30°C inkubieren

↓

Hefen 4 min bei RT und 2500 upm zentrifugieren

↓

Sediment 2 x mit 20 ml ddH_2O waschen

↓

Niederschlag in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufnehmen und für 10 min bei 30°C und 250 upm inkubieren

↓

Hefen 5 sec bei 14.000 upm und RT zentrifugieren und das Sediment in 500 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendieren

↓

pro Transformationsansatz 50 µl der Hefesuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geben

↓

zum Hefesediment werden folgende Komponenten hinzugefügt: 240 µl PEG 4000 (50 %), 36 µl 1 M Lithiumacetat, 25 µl denaturierte Lachs-Sperma-DNA (2 mg / ml) sowie 2 x 4 µg der jeweiligen Plasmid-DNA gelöst in 45 µl ddH_2O

↓

Transformationsansatz 1 min mit Pipette mischen, dabei Schaumbildung vermeiden

↓

Transformationsansatz 30 min bei 30°C und 250 upm inkubieren

↓

Hitzeschock bei 42°C für 20 min dabei Gefäße alle 5 min invertieren

↓

Transformationsansatz 5 sec bei RT und 14.000 upm zentrifugieren

↓

Sediment in 1 ml ddH_2O aufnehmen

↓

2 x 200 µl der Hefesuspension auf TL-Platten (WA-Medium, - Tryptophyn, - Leucin) ausstreichen, Platten mit Parafilm verschließen und 2 Tage bei 30°C inkubieren

Die Selektion der Transformanden erfolgte über die Fähigkeit, die Aminosäuren Tryptophan und Leucin zu synthetisieren, wofür die genetische Information über die Vektoren pACT2 und pRevRX in die Hefezellen gelangt. Nur Hefezellen, welche beide Plasmide beinhalten, können auf dem Hefe-Mangelmedium (WA -trp -leu) wachsen.

Verwendete Hefemedien:

YPD-Vollmedium: 10 g Hefeextrakt, 10 g Bacto Pepton, 1 g Glucose, 20 ml Glycerin (23 g Agar), ad 1 l ddH_2O.

WA (-trp -leu) Medium (TL): 6,7 g "Yeast Nitrogen Base", 20 g Glucose, (17 g Agar), 936 ml H_2O, 10 mg Adenin, 50 mg Arginin, 80 mg Asparagin-Säure, 20 mg Histidin, 50 mg Isoleucin, 50 mg Lysin, 20 mg Methionin, 50 mg Phenylalanin, 100 mg Threonin, 50 mg Tyrosin, 20 mg Uracil, 140 mg Valin.

WA (-trp -leu -his): WA (-trp -leu) ohne 20 mg Histidin.

2.2.5.2 Analyse der RNA-Protein Interaktion

Eine Interaktion der Viroid-RNA mit dem CDC5-Protein kann im Tri-Hybrid-System über zwei Methoden nachgewiesen werden. Zum einen wird über die Bindung der Komponenten die Synthese des Reportergens His3 initiiert, welches für die Aminosäure Histidin kodiert. Ein Nachweis der Interaktion von RNA und Protein erfolgt hier über die Selektion der Transformanden auf WA-Medium (-trp -leu) ohne Histidin (TLH). Da Hefezellen allerdings selber befähigt sind, eine geringe Menge Histidin zu synthetisieren, wird dem Mangelmedium Tri-Amino-Triazol (3AT), ein Inhibitor für die Histidinsynthese, in verschiedenen Konzentrationen (10 mM, 30 mM, 50 mM) hinzugefügt, um ein Hintergrundwachstum zu vermeiden. Zum anderen wird über eine Interaktion von RNA und Protein die Transkription des lacZ Gens initiiert, welches über das Lactoseanalog X-Gal nachgewiesen werden kann.

Für die zehn oben genannten Transformationen wurden 2 TL-Platten und je 2 TLH-Platten mit 10 mM 3AT, 30 mM 3AT und 50 mM 3AT benötigt. Drei Hefekolonien eines Transformationsansatzes wurden auf jeweils eine der vier unterschiedlichen Platten ausgestrichen. Hierbei sollten möglichst immer die gleichen Kolonien verwendet werden. Die so ausgestrichenen Hefekolonien werden 2 - 3 Tage bei 30°C inkubiert.

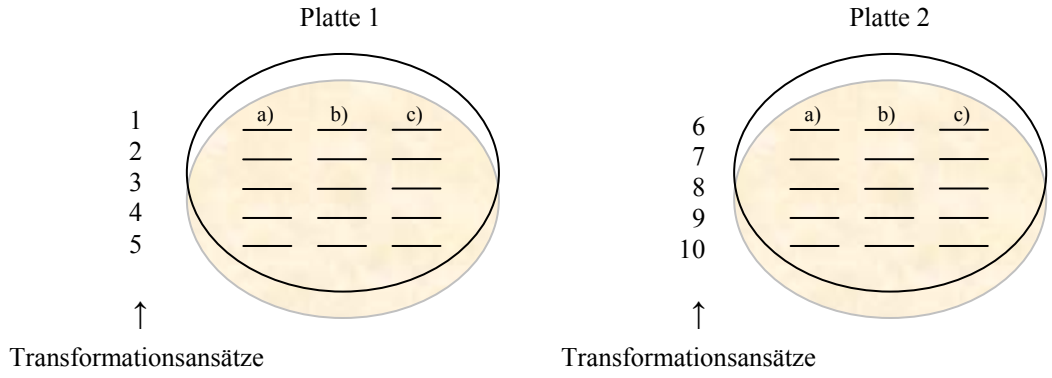


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Die Zahlen 1 - 10 bezeichnen die Transformationsansätze. a), b) und c) stellen die zufällig gewählten Hefekolonien dar.

Danach konnten die Hefen der TLH-3AT-Platten direkt über ein eventuelles Wachstum ausgewertet werden. Die X-Gal-Analyse erfolgte mit den auf TL-Platten ausgestrichenen Hefezellen nach folgendem Protokoll:

2 Petrischalen mit 2 - 3 Lagen Whatmanpapier auslegen

↓

5 ml Z-Puffer (60 mM Na_2HPO_4, 40 mM NaH_2PO_4, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$) mit 200 µl X-Gal (40 mg/ml DMSO) vermischen

↓

Whatmanpapiere vollständig mit Z-Puffer / X-Gal tränken, Flüssigkeit muss vollständig aufgenommen werden

↓

Nylonmembran vorsichtig für ca. 30 sec auf die Hefezellen der TL-Platten legen

↓

Membran mit anhaftenden Hefezellen zum Aufschluss kurz in flüssigen Stickstoff legen und anschließend auf steriler Fläche auftauen lassen

↓

Membran mit Zellen nach oben auf das vorbereitete Whatmanpapier geben, Petrischale mit Parafilm verschließen und bis zur Farbreaktion bei 30°C inkubieren

↓

nach Auftreten der Blaufärbung wird die Membran bei RT getrocknet und in einer neuen Petrischale gelagert

2.2.5.3 RNA-Extraktion aus Hefe

Zum Nachweis von cdc5- und Viroid-RNA in transformierten Hefezellen wurde eine Northern-Blot-Analyse (2.2.3.14) durchgeführt. Die hierfür verwendete RNA wurde nach Köhrer & Domdey (1991) extrahiert. Als Ausgangsmaterial wurden 100 ml einer Hefekultur von einer OD_{600} = 1 - 3 eingesetzt.

Zellen 5 min mit 5000 upm bei 4°C zentrifugieren

↓

Zellen mit 20 ml H_2O_{DEPC} waschen

↓

Zellen in 2,5 ml Na-Acetat-Puffer pH 5.0 (50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA) resuspendieren

↓

Zugabe von 250 µl 10 % SDS und 3 ml Phenol (65°C), sofort 4 min bei 65°C und maximaler Geschwindigkeit in Wasserbad-Schüttler schütteln

(alternativ: 5 min Inkubation bei 65°C und alle 30 sec mischen)

↓

Proben zügig auf RT bringen und 10 min bei 5000 upm und RT zentrifugieren

↓

untere organische Phase entfernen und verwerfen, Interphase und Sediment mit 3 ml Phenol (65°C) versetzen

↓

Proben zügig auf RT bringen und 10 min bei 5000 upm und RT zentrifugieren

↓

wässrige Phase in Falcon-Röhrchen überführen, 3 ml Chloroform zugeben und 2 min vortexen

↓

10 min Zentrifugation bei 5000 upm und RT

↓

wässrige Phase in Falcon-Röhrchen überführen, mit 3 ml Chloroform extrahieren

↓

10 min Zentrifugation bei 5000 upm und RT

↓

Überstand wird einer Ethanolfällung unterzogen

↓

Sediment wird nach Trocknung in 600 µl H_2O_{DEPC} aufgenommen

↓

Lagerung bei - 20°C

2.2.5.4 Proteinextraktion aus Hefe

Um CDC5-Protein-Fragmente in transformierten Hefezellen aus dem Tri-Hybrid-System nachweisen zu können, wurde eine Proteinextraktion nach Angaben von Yaffe & Schatz (1984) durchgeführt.

1 ml Hefekultur in 2 ml Reaktionsgefäß überführen

↓

Zugabe von 150 µl NaOH-β-Mercaptoethanol (1,85 M NaOH, 7,4 % β-Mercaptoethanol)

↓

3 - 4 x invertieren und 10 min auf Eis inkubieren

↓

150 µl TCA 50 % hinzufügen, mischen und 10 min auf Eis inkubieren

↓

2 min bei RT und 14.000 upm zentrifugieren

↓

Niederschlag 2 x mit 1,5 ml Aceton (- 20°C) waschen

↓

Sediment an der Luft trocknen lassen und in geeigneten Volumen SDS Probenpuffer suspendieren

↓

Proben 5 min bei 95°C inkubieren, anschließend kurz klar zentrifugieren

↓

falls sich Proteine nach der TCA-Fällung schlecht lösen, kann das Sediment in 1 Vol. 0,1 M NaOH gelöst werden und anschließend mit
1 Vol. 2 x SDS Probenpuffer (2.2.5.5) versetzt werden.

↓

gewünschtes Volumen auf ein SDS-Gel auftragen, restliche Probe bei -20°C lagern

2.2.5.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Rekombinanten Proteine und Hefe Proteinextrakte wurden in 12 %igen SDS-Polyacrylamid-(PAA)-Gelen aufgetrennt. Für ein Minigel (8 x 5 cm, 1,5 cm dick) wurde zunächst ein 12 %iges Trenngel gegossen, welches sofort mit Isopropanol beschichtet wurde, um eine gerade Gelkante zu erhalten. Nach Polymerisation des Gels (20 min) wurde das Isopropanol vorsichtig abgegossen, und die Gelkante mit ddH_2O gespült. Restliches Wasser wurde vorsichtig mit einem weichen Papiertuch aufgesogen. Anschließend wurde auf das Trenngel ein 4,5 %iges Sammelgel gegossen, und der Kamm gesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels (30 min) wurde das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Laufkammer gestellt, und der Kamm gezogen. Die Taschen wurden gründlich mit ddH_2O gespült, um Verunreinigungen zu entfernen. Die zuvor mit 2 x Probenpuffer versetzten und denaturierten Proben wurden in die Geltaschen gegeben. Als Längenstandard diente der "Prestained Protein Ladder" 10 - 180 kDa (Fermentas). Das Sammeln der Proben erfolgte bei 10 mA, der Probenlauf ab Erreichen des Trenngels bei 15 mA.

Trenngel 12 %: 4 ml 30 % PAA-Lösung (37,5 : 1), 2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris, 8 mM EDTA, 0,4 % SDS, pH 8,8), 3,4 ml ddH_2O, 10 µl Temed, 100 µl 10 % Ammoniumpersulfat (APS).

Sammelgel 4,5 %: 0,75 ml 30 % PAA-Lösung (37,5 : 1), 0,5 ml Sammelgelpuffer (0,625 M Tris, 20 mM EDTA, 1 % SDS, pH 6,8), 3,75 ml ddH_2O, 5 µl Temed, 50 µl 10 % APS.

Laufpuffer:	2 x SDS Probenpuffer nach Lämmli:	Sucrose-Bromphenolblau:
3 g Tris,	20 % Sammelgelpuffer	60 % Sucrose
14 g Glycin	20 % β-Mercaptoethanol	0,5 % Bromphenolblau
1 g SDS	25 % Sucrose-Bromphenolblau	2 % SDS
ad 1 l ddH_2O		

2.2.5.6 Färbung von SDS-PAA-Gelen

Sofern SDS-PAA-Gele nicht für Wester-Blot-Analysen eingesetzt werden sollten, erfolgt ein Nachweis der aufgetrennten Proteine über verschiedene Färbeverfahren. Die Wahl der Färbung richtete sich nach der zu erwartenden Konzentration der Proteine.

Coomassie-Blau Färbung

Die Färbung mit Coomassie erreicht eine Sensitivität von ca. 100 ng Protein und wurde somit zum Nachweis größerer Proteinmengen verwendet.

Die SDS-PAA-Gele wurden 30 min unter leichten Schütteln in Färbelösung inkubiert (0,25 % (w/v) Coomassie® Brillantblau R-250. 45,5 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure). Anschließend wurden die SDS-PAA-Gele bis zur gewünschten Bandenintensität leicht in Entfärbelösung geschüttelt (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure). Zum Stoppen der Entfärbung wurden die Gele mehrfach in H_2O gewaschen. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die Gele entweder fotografiert oder eingescannt.

Silber-Färbung

Zum Nachweis geringer Proteinmengen wurde die hochsensitive Silber-Färbung in Anlehnung an Heukeshoven & Dernick (1988) durchgeführt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln durchgeführt.

Gele über Nacht in 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure fixieren

↓

Gele 10 min in Inkubationslösung (30% Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,2 % Glutaraldehyd-Lösung, 13 mM Natriumthiosulfat) inkubieren

↓

4 x 3 min in ddH_2O waschen

↓

5 min in Färbelösung (6 mM Silbernitrat, 0,06 % Formaldehyd) schwenken

↓

kurz in Entwickler (250 mM Natriumcarbonat, 0,03 % Formaldehyd) inkubieren

↓

Zugabe von frischem Entwickler bis die Proteinbanden gewünschte Intensität aufweisen oder bei Bildung eines Silberschleiers

↓

stoppen der Reaktion mit 50 mM EDTA und 500 mM Natriumacetat, pH 7,4

↓

Dokumentation der Ergebnisse mittels Digitalkamera oder Scanner

Bei "Überfärbung" der Gele oder beim Auftreten von starkem Hintergrund wurde mit "Farmers-Reducer" (0,2 % Natriumthiosulfat, 0,01 % Kaliumhexacyanoferrat (III)) bis zur gewünschten Bandenintensität entfärbt. Die Reaktion wurde durch mehrfaches Waschen mit ddH_2O gestoppt.

2.2.5.7 Western-Blot-Analysen

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden nach Angaben des Herstellers mittels Elektroblot-Verfahren (Biorad Mini 2D-Apparatur) auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond-C extra, Amersham) transferiert. Hierfür wurden zunächst das SDS-Gel 1 h, die Membran 15 min, in Transferpuffer äquilibriert (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3). Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4°C und 40 mA.

Die Western-Blot Membranen wurden nach dem Transfer kurz in 1 x TBST Puffer gewaschen (10 x TBST: 0,5M Tris-HCl (pH 8,0), 1,5 M NaCl, 1 % Tween 20) und bis zur Detektion bei -20°C gelagert.

2.2.5.8 Ponceau-S-Färbung

Die Effizienz des Blotvorganges kann mit Hilfe von Reagenzien, die unspezifisch Proteine anfärben, überprüft werden. Bei Nitrocellulosemembranen ist die Ponceau-S-Färbung mit einer Nachweisgrenze von 5 - 15 ng Protein pro mm^2 eine weit verbreitete Methode, die unmittelbar vor der Immunodetektion durchgeführt wurde.

Die Membran wurde hierfür 30 min in der Ponceau-S-Lösung leicht geschüttelt (0,1 % (w/v) Ponceau-S, 5 % Essigsäure) und anschließend zum Entfärben in 5 %iger Essigsäure inkubiert. Je nach gewünschter Intensität der Proteinbanden wurde das Entfärben mit ddH_2O gestoppt, und die Membran fotografiert.

2.2.5.9 Immunodetektion

Der Nachweis des CDC5-GAL4-AD-Fusionsproteins über den Gal4-AD-Antikörper erfolgte mit Hilfe eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten sekundären Antikörpers. Als Substrat wurde ebenfalls CSPD verwendet.

Membran 10 min in 1 x TBST waschen (10 x TBST: 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0), 1,5 M NaCl, 1 % Tween 20)

↓

60 min in 5 % Blockingpuffer inkubieren (5 % (w/v) Magermilchpulver in 1 x TBST)

↓

60 min mit primären Antikörper inkubieren (nach Angaben des Herstellers 6 µg Gal4-AD-Antikörper in 10 ml Blockingpuffer)

↓

Membran 3 x 5 min in 1 x TBST waschen

↓

60 min mit sekundärem Antikörper inkubieren (verdünnt 1:3.333 in Blockingpuffer)

↓

4 x 5 min in 1 x TBST waschen

↓

2 x 5 min in Assay-Puffer inkubieren (0,1 M Diethanolamin, 1 mM $MgCl_2$, pH 9,5)

↓

ca. 300 µl Chemilumineszens-Lösung auf Membran tropfen (CSPD® "Ready-to-Use" mit "Nitro-Block™ Enhancer", Applied Biosystems)

↓

Membran in Folie einschweißen und Exposition gegen einen Röntgenfilm

Der primäre Antikörper wurde nach Verwendung mit 0,5 % (v/v) einer 10 x Natriumazidlösung versetzt, um dessen Haltbarkeit zu verlängern. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Der verwendete sekundäre Antikörper wurde nach einmaliger Nutzung verworfen.

2.2.6 "Gel-Shift"-Analysen

Eine weitere Methode, um Interaktionen von Proteinen mit RNA nachzuweisen, ist der "Gel-Shift"-Assay. Er basiert auf dem Prinzip der Gelretardation, die die Bindung eines Proteins an RNA bewirken kann.

2.2.6.1 Proteinexpression und Aufreinigung

Die cdc5-Konstrukte 2858 und 1930 wurden über Verwendung der Restriktionsschnittstelle Nco I aus dem Tri-Hybrid Vektor pACT2 in den pET 30a(+) Expressionsvektor umkloniert. Nach Überprüfung der Orientierung der Produkte wurden die rekombinanten Plasmide in *E.coli-Z*ellen des Stammes Rosetta tranformiert. 5 ml einer 10 ml Übernachtkultur in LB-Medium wurden in 45 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD_{600} = 0,5 bei 37°C und 150 upm inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte nach Angaben des Benutzerhandbuches für das pET-Expressions-System, indem IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM der Kultur beigefügt wurde. Eine Probennahme erfolgte direkt nach Zugabe des IPTGs nach 2 und 3 Stunden. 1 ml der letzten Probennahme wurde mit Hilfe des "MagneHis™ Protein Purification Systems" von Promega einer Proteinaufreinigung über Polyhistidin-Tag und magnetischen Nickelpartikeln unterzogen.

2.2.6.2 Ethanolfällung von Proteinen

Zur Überführung der aufgereinigten Proteine in "Binding"-Puffer wurde eine Präzipitation mit Ethanol durchgeführt. Hierbei wurden 1 Vol. der Proteinlösung mit 9 Vol. eiskaltem Ethanol abs. versetzt und für 60 min bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14.000 upm bei 4°C und 15 min wurde das Sediment vorsichtig bei RT getrocknet. Anschließend erfolgte einmaliges Waschen mit 90 %igen eiskalten Ethanol. Nachdem der Niederschlag bei RT getrocknet wurde, erfolgte die Aufnahme der Proteine in geeignetem Volumen "Binding"-Puffer (10 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 100 µM EDTA pH 7,9, 5 % Glycerol) nach Gozmanova *et al*., (2003).

2.2.6.3 Viroid-RNA-Isolation aus Gesamt-RNA von infizierten Pflanzen

Viroid-RNA wurde mit Hilfe einer Hochsalz-Fällung aus Gesamt-RNA isoliert. Hierfür wurde die isolierte Gesamt-RNA mittels Ethanolfällung präzipitiert. Der erhaltene Niederschlag wurde in 200 µl 2 M $LiCl_2$ resuspendiert und anschließend bei 4°C für 20 min zentrifugiert. Die kleinen RNAs, wie die Viroid-RNA und tRNAs, bleiben bei diesem Schritt in Lösung, während die ribosomalen RNAs und mRNAs präzipitieren. Der erhaltene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer Ethanolfällung unterzogen. Der Niederschlag bestehend aus Viroid-RNA und tRNA, wurde anschließend in geeignetem Volumen "Binding"-Puffer aufgenommen. Die von Viroid- und t-RNA getrennte ribosomale RNA wurde in 200 µl H_2O_{DEPC} aufgenommen und ebenfalls einer Ethanolfällung unterzogen.

Das Präzipitat wurde anschließend in 20 µl H_2O_{DEPC} aufgenommen und als Kontrolle verwendet.

2.2.6.4 "Gel-Shift"

Der "Gel-Shift" erfolgte nach dem Protokoll von Li *et al*. (2004), indem äquimolare Mengen von Viroid und CDC5-Protein (jeweils 100 pg) in "Binding"-Puffer (10 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 100 µM EDTA pH 7,9, 5 % Glycerol) für 30 min bei RT inkubiert wurden. Der Gellauf erfolgte in einem 1 %igen Agarose-Gel in 0,5 x TBE-Puffer für ca. 60 min bei 70 V und RT. Die im Gel aufgetrennten Fragmente wurden anschließend gemäß dem Protokoll für Northern-Blot Analysen (2.2.3.14) auf eine Nylon-Membran transferiert und einer Hybridisierung mit Dig-markierter PSTVd-Sonde unterzogen. Sofern die Bindungsstudien unter Verwendung einer Dig-markierten PSTVd-Sonde durchgeführt wurden, erfolgte nach dem Northern-Blot lediglich eine Detektion der Hybridisierungssignale.

3. Ergebnisse

3.1 Physikalische Charakterisierung des cdc5-homologen Gens der Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

3.1.1 5'-"RACE"-Analysen (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Zur Vervollständigung der cDNA-Sequenz des cdc5 homologen Teilklons pRW 19.5 wurde eine 5'-"RACE" nach dem SMART-System, verbessert von Matz *et al*. (1999), durchgeführt. Hierfür wurden ausgehend von der 1,5 kb langen cDNA-Sequenz des Klons pRW 19.5, der spezifische Reverse-Primer myb-R302 abgeleitet.

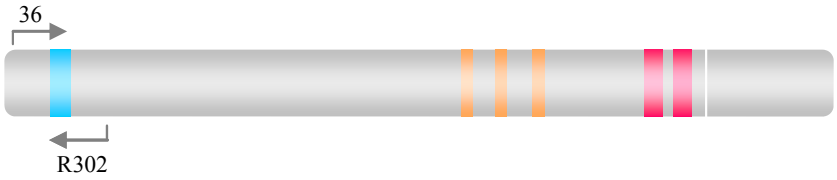


Abb. 3.1: Lage des für die 5'-"RACE" verwendeten Primers myb-R302 auf dem cdc5-homologen Teilklon pRW 19.5. Türkis: Kernlokalisationssequenz ("Nuclear lacalization signal", NLS). **Orange:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung.

Nach Prüfung des "RACE"-Primers in einer RT-PCR unter Verwendung des Forward-Primers 36 (nicht gezeigt) erfolgte die 5'-"RACE"-Analyse, für welche Gesamt-RNA der PSTVd-sensitiven Tomaten-Kultursorte Rutgers als Template verwendet wurde.

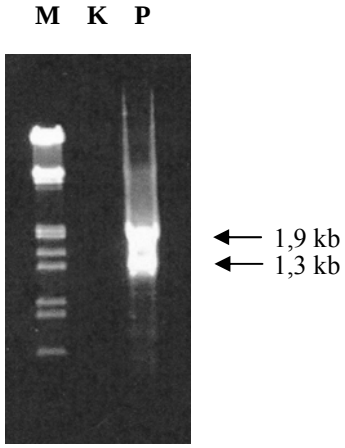


Abb. 3.2: Gelelektrophoretische Auftrennung des 5'-"RACE"-Produktes. M: DNA Molecular Weight Marker 3 (Roche). **K:** H_20-Kontrolle. **P:** 5'-"RACE"-Produkt.

Über das "RACE"-Verfahren konnten zwei deutliche Amplifikationsprodukte in den Größen von ca. 1,3 und 1,9 kb erhalten werden (Abb. 3.2, Spur P). 5 µl des Produktes wurden in den

pCR® 4-TOPO Vektor kloniert, mit dem anschließend *E.coli*-Zellen des Stammes DH5α transformiert wurden. 16 der gewachsenen Kolonien wurden zur Überprüfung des Inserts direkt in eine PCR mit den Vektor-spezifischen M13-Primern eingesetzt.

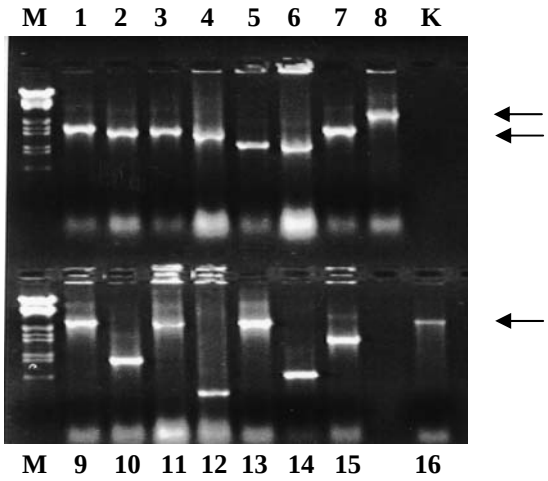


Abb. 3.3: Gelelektrophoretische Auftrennung der "RACE"-Klonierungsprodukte nach PCR mit Vektor-spezifischen M13-Primern. M: DNA Molecular Weight Marker 3 (Roche). **1 - 16:** Bezeichnung der Klone auf der Masterplate. **K**: H_2O-Kontrolle.

Wie in Abb. 3.3 deutlich zu erkennen ist, konnten PCR-Produkte verschiedener Größen kloniert werden, wobei vor allem Amplifikate aus den starken Banden (1,3 kb und 1,9 kb) in den Vektor aufgenommen wurden (Pfeile in Abb. 3.3).

Die Klone 1, 2, 3, 7, 8, 9, 11 und 13 wurden einer ersten Sequenzierung über die Vektor-spezifischen M13-Primer unterzogen. Wie in Abb. 3.4 dargestellt, waren die Klone 1, 2, 3 und 7 (ca. 1,3 kb) sowie die Klone 8, 9, 11 und 13 (1,9 kb) untereinander in den Endbereichen identisch. Zudem wiesen alle Klone am 3'-Ende den für pRW 19.5 spezifischen Sequenzbereich von 302 nt auf.

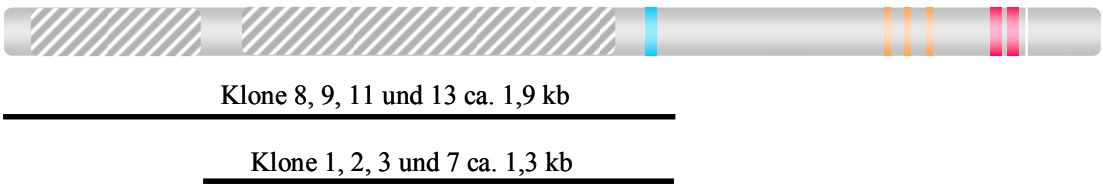


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der "RACE-Contigs" nach einer ersten Sequenzierung der "RACE"-Klone. Unbekannte Sequenzbereiche wurden gestreift dargestellt. **Türkis:** NLS. **Orange:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung.

Zur Verbindung der erhaltenen "Contigs" sowie zur Vervollständigung der Sequenz jedes "RACE"-Klons wurden in mehreren Abschnitten die in Abb. 3.5 dargestellten Primer abgeleitet und in verschiedenen Kombinationen verwendet.

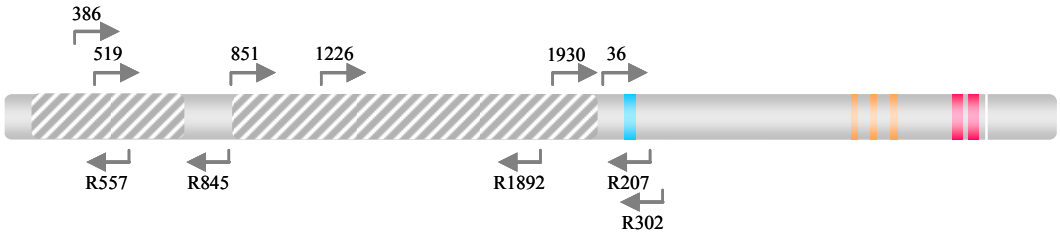


Abb. 3.5: Lage und Orientierung der verwendeten Primer auf dem hypothetischen Sequenzbereich des cdc5-Gens. Unbekannte Bereiche sind gestreift dargestellt. **Türkis:** NLS. **Oragne:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung.

Mit Hilfe der Computer-Software "DNA-Star" wurden die erhaltenen Einzelsequenzen zu einer 1,9 kb langen Consensussequenz zusammengefügt und anschließend mit der Sequenz des bekannten Teilklones 19.5 verbunden.

Die 3099 nt lange Gesamtsequenz wurde über blastx und blastn der NCBI-Datenbank einer Sequenzanalyse unterzogen. Die in Tabelle 3.1 dargestellten Ergebnisse zeigten auf Nukleotid- sowie Proteinebene eine 73 %ige Homologie zu dem myb-ähnlichen Transkriptionsfaktor cdc5 aus *Arabidopsis thaliana* (*At*cdc5). Zudem konnte in unterschiedlichen Sequenzbereichen eine bis zu 73 %ige Homologie zum cdc5 aus *S. pombe* (*Sp*cdc5) gezeigt werden.

Tab. 3.1: Datenbankanalyse der cDNA-Sequenz des putativen cdc5-Gens aus Tomate

Spezies	Bezeichnung	Identität	Vergleich mit	verwandte Aminosäuren	Publikation
Blastn: Vergleich der Nucleotidsequenz gegen Nucleotidsequenzen					
Arabidopsis thaliana Acc.-Nr. D58424	*A.t.* mRNA for Myb-like DNA binding protein	1726 nt von 2346 nt = **73 %**	gesamte mRNA		Hirayama & Shinozaki (1996)
Schizosaccharo-myces pombe Acc.-Nr. L19525	*S. p.* Cdc5 (cdc5+) gene	220 nt von 300 nt = **73 %** 191 nt von 282 nt = **67 %**	nt 52 - nt 351 nt 480- nt 752		Ohi *et al.* (1994)
Blastx: Vergleich einer Nucleotidsequenz mit Proteinsequenzen (autom. Translation)					
Arabidopsis thaliana Acc.-Nr. D58424	putative myb-DNA binding Protein	597 AS von 815 AS = **73 %**	gesamtes Protein	690 AS von 851 AS = **84 %**	Hirayama & Shinozaki (1996)
Schizosaccharom yces pombe Acc.-Nr. P39964	Cell Division Control Protein 5	155 AS von 229 AS = **67 %**	AS 2 - AS 243	179 AS von 299 AS = **77 %**	Ohi *et al.* (1994)

Durch die Datenbankanalyse wurde weiterhin deutlich, dass die Sequenz von *Solanum lycopersicum* L. den vollständigen offenen Leserahmen (ORF) von 2964 nt beinhaltete. Die

Translation des ORF zeigte zudem, dass wie bei allen bisher bekannten CDC5-Proteinen, auch bei dem putativen *Sl*CDC5 hoch konservierte N-terminale Bereiche wie eine myb-DNA-Bindedomäne und eine Domäne mit drei Kernlokalisationssequenz zu beobachten waren.

Abb. 3.6: Schematische Darstellung des putativen CDC5 Proteins mit den anzunehmenden typischen Strukturelementen. Grün: myb-DNA-Bindedomäne. **Türkis:** NLS. **Blau:** Threonin-Prolin (TP) reiche Domäne. **Orange:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung.

```
MRIMIKGGVW KNTEDEILKA AVMEYGKNHW ARISSLLVRK SAKQCKARWY  50
EWLDPSIKKT EWTREEDEKL LHLAKLMPTQ WRTIAPIVGR TPSQCLERYE 100
KLLDAACTKD ENYDPNDDPR KLKPGEIDPN PESKPARPDP VDMDEDEKEM 150
LSEARARLAN TRGKKAKRKA REKQLEEARR LASLQKRREL KAAGIDVRQR 200
KRKRRGIDYN AEIPFEKKPP PGFYDVTEED RPVDQPKFPT TIEELEGERR 250
VDKEARLRKQ DIARNKIAER QDAPTSILHA NKLNDPEAVR KRSKLNLPAP 300
QIPDHELEAI AKIGIASDLI GGDELSEGNA ATRALLANYA QTPQHAMTPM 350
RTPQRTPSTK QDAIMMEAEN QRRLTQSQTP LLGGDNPLLH PSDFSGVTPK 400
KREVQTPNPL LTPSATPGAT SLTPRIGMTP SRDSYGMTPK GTPMRDELRI 450
NEEMDMHSNA KLGQFNSKKE LLSGLKSLPQ PKNEYQIVIQ QPPEENEEPE 500
EKIEEDMSDR IAREKAEEEA KRQALLRKRS KVLQRELPRP PIASLELIKS 550
SLMRADEDKS SFVPPTLIEQ ADEMIRKELV SLLEHDNTKY PLDEKPEKEK 600
KKGVKRKIVA EPAIEDFEED ELKEADGLIK DEAHFLRVAM GHESESLDEF 650
VEIHKATLND IMYFPTRNAY GLSSVAGNME KLAALQNEFEN VKKKMDDDT 700
KKATKLEQKI KVLTNGYQMR AGKLWSQIES TFKKMDTAGTE LECFRALQK 750
QEQLAASHRI NNMWEEVQKQ KELERTLQKR YGDLIADTQK IQHLMDEYRI 800
QDQMQEEVAA KNRALELAKA EMAEKDSVPS ADDVEPSGTG QNSNTEENSA 850
SASHVPIEAD VHVEPSGTNQ CSNAEENSAS IEADNVHVEP SGTSQCPIAE 900
ETSASISHDT TPRDVDGQVQ VADVSTMDSE AISDHVPMEG QQNPGEESNT 950
VVTKTEDSTV AAGDVDVTKT DDSGVVAGDG EADPKNM.              988
```

Abb. 3.7: Abgeleitete Aminosäuresequenz des putativen CDC5-Proteins aus Tomate mit potentiellen Strukturelementen. Grün: myb DNA-Bindedomäne. **Türkis**: KLS. **Blau:** TP-reiche Domäne. **Orange**: VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung.

Im mittleren Bereich des *Sl*CDC5 ist eine hohe Anzahl von Thr-Pro Di-Aminosäure-Sequenzen auffällig, wie sie ebenfalls bei *At*CDC5 und *Sp*CDC5 auftreten. Häufig folgen diesen Arg/Lys oder Xaa-Arg/Lys, wodurch die Consensussequenz für Serin / Threonin-Proteinkinasen erfüllt wird. Eine C-terminale Kernlokalisationssequenz wie sie bei *Sl*CDC5 beobachtet wurde, konnte nur für *A. thaliana* bestätigt werden. Zudem machte ein Vergleich

der bis zu diesem Zeitpunkt bekannten CDC5-Proteine untereinander deutlich, dass die auffälligen Sequenzwiederholungen im C-terminalen Bereich nur bei *Sl*CDC5 auftreten und dass *Sl*CDC5 mit 988 AS als bisher größter Vertreter unter den CDC5-Varianten anzusehen ist.

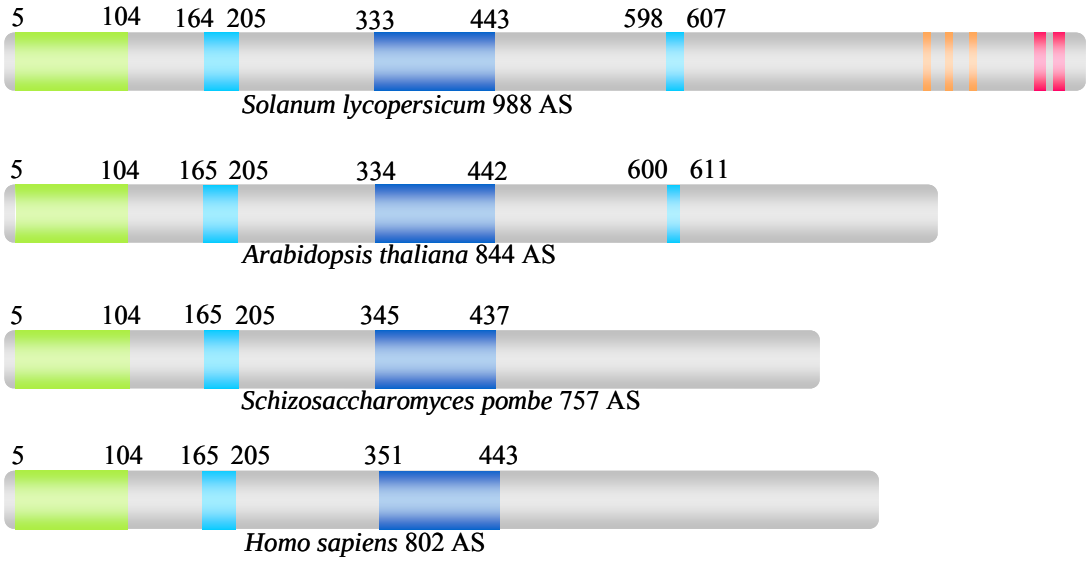


Abb. 3.8: Organisation des CDC-Proteins verschiedener Spezies mit Hervorhebung und Lage der konservierten Bereiche. Grün: myb DNA-Bindedomäne. **Türkis:** NLS. **Blau:** TP reiche Domäne. **Orange:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung.

3.1.2 Die cdc5-cDNA von *Sl* Goldkugel und *Sl* Micro-Tom

In Anbetracht einer möglichen Interaktion des CDC5-Proteins mit der PSTVd-RNA war es notwendig, verschiedene Kultursorten der Tomate zu analysieren, da bereits hier deutliche Unterschiede in der Symptomausprägung nach einer PSTVd-Infektion auftreten. Als Vertreter der symptomatischen Kultursorten sollte zusätzlich zur Sorte Rutgers die cdc5 cDNA-Sequenz der Tomatenmutante Micro-Tom untersucht werden. Als PSTVd-tolerante Kultursorte der Tomate wurde *Sl* Goldkugel ausgewählt. Anhand der bestehenden cdc5-Sequenz für Rutgers wurden zusätzlich Primer für den 3'-Bereich abgeleitet und auf ihre Eignung getestet.

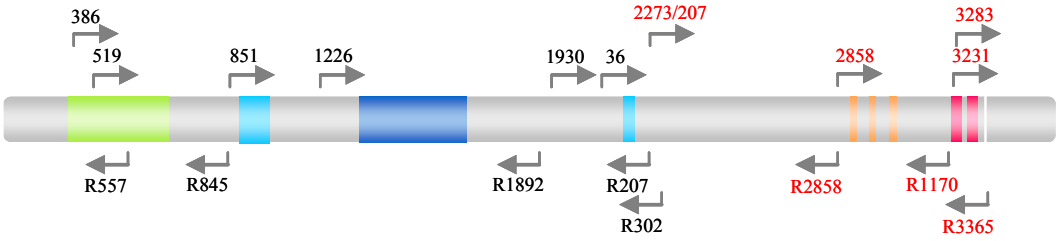


Abb. 3.9: Lage und Orientierung der *Sl*cdc5-Primer. Neu abgeleitete Primer wurden in rot dargestellt. **Grün:** myb DNA-Bindedomäne. **Türkis:** NLS. **Blau:** TP reiche Domäne. **Orange:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung.

Unter Verwendung von Gesamt-RNA von Goldkugel und Micro-Tom wurden RT-PCRs mit unterschiedlichen Primerkombinationen durchgeführt, um den gesamten Sequenzbereich abzudecken (nicht gezeigt). Die erhaltenen Produkte wurden kloniert und anschließend sequenziert.

Um auch den 3'-nicht-translatierten Bereich (3'-UTR) der unterschiedlichen Kultursorten miteinander vergleichen zu können, wurden 3'-"RACE"-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde der Erststrang über eine Reverse Transkription mit einem Oligo-dT-Anchor-Primer synthetisiert. Die anschließende Zweitstrang-Synthese erfolgte mit dem genspezifischen Primer 3231 (s. Abb. 3.9) und dem Anchor-Primer. Um eine höhere Spezifität der Produkte zu erhalten, wurde das Amplifikat der RT-PCR in eine weitere PCR mit dem "Nested-Primer" 3283 sowie dem Anchor-Primer eingesetzt.

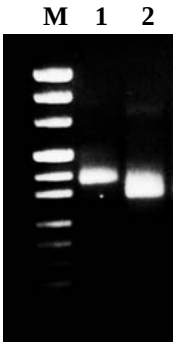


Abb. 3.10: 3'-"RACE" unter Verwendung von Gesamt-RNA der Kultursorte Goldkugel. M: pUC-Mix Längenmarker (Fermentas). **Spur 1:** PCR mit den Primern 3232 + Anchor. **Spur 2:** PCR auf des Produkt aus Spur 1 mit den Primern 3283 + Anchor.

Die erhaltenen Fragmente mit einer Größe von ca. 400 bp (Spur 1) und ca. 320 bp (Spur 2) stimmten mit den abgeleiteten Erwartungen aus der cDNA-Sequenz von Rutgers überein und wurden zur Sequenzanalyse kloniert.

Die Sequenzen jeder Kultursorte wurden über ein Alignment im Programm "DNA-Star" zu der jeweiligen Consensussequenz zusammengefügt und miteinander verglichen.

Die Consensussequenzen von Goldkugel und Micro-Tom wiesen zur cDNA-Sequenz von Rutgers in keinem Bereich Unterschiede auf. Die cdc5 cDNAs der unterschiedlichen Kultursorten sind somit zu 100 % identisch.

Die von Werner (1995c) postulierte Polyadenylierungssequenz auf mRNA-Ebene an Position + 168 nach dem Stopcodon konnte bei allen Kultursorten bestätigt werden.

3.1.3 Genomische Analyse von *Sl*cdc5

3.1.3.1 Genomische Sequenzierung von *Sl*cdc5 und Analyse der Introns

Nach Charakterisierung der cdc5 cDNA erfolgte die genomische Analyse von cdc5 bei allen Kultursorten. Die in Abb. 3.9 dargestellten Primer wurden wie zuvor in unterschiedlichen Kombinationen für PCR-Reaktionen eingesetzt. Hierbei war auffällig, dass die Produkte, aus denen in Tab. 3.2 dargestellten Primerkombinationen, auf genomischer Ebene deutlich größer waren als zuvor bei der cDNA beobachtet.

Tab. 3.2: Primerkombinationen und deren Produkte auf gDNA und cDNA

Primerkombination	Fragmentgröße auf cDNA	Fragmentgröße auf gDNA	Abweichung
519 + R845	411 bp	ca. 1300 bp	ca. 890 bp
1930 + R207	359 bp	ca. 1100 bp	ca. 740 bp
1930 + R302	455 bp	ca. 1200 bp	ca. 750 bp
1930 + R2858	910 bp	ca. 2000 bp	ca. 1100 bp
36 + R2858	738 bp	ca. 1700 bp	ca. 1000 bp

Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass sich zwischen der Sequenz der Primer 519 und R845 mindestens ein Intron befindet. Des Weiteren deutet ein Vergleich der Kombinationen 1930 + R302 und 1930 + R2858 auf das Vorhandensein von mindestens zwei Introns hin, da im Gegensatz zur ersten Kombination, bei welcher ca. 750 bp zusätzlich auftreten, nun ca. 1100 bp zusätzlich amplifiziert wurden. Für eine genauere Analyse wurden die erhaltenen PCR-Produkte kloniert und sequenziert.

Über die vollständige Sequenzierung der genomischen DNA bei Rutgers, Micro-Tom und Goldkugel konnte gezeigt werden, dass bei allen Kultursorten insgesamt drei Introns von identischer Sequenz und Lage auftreten.

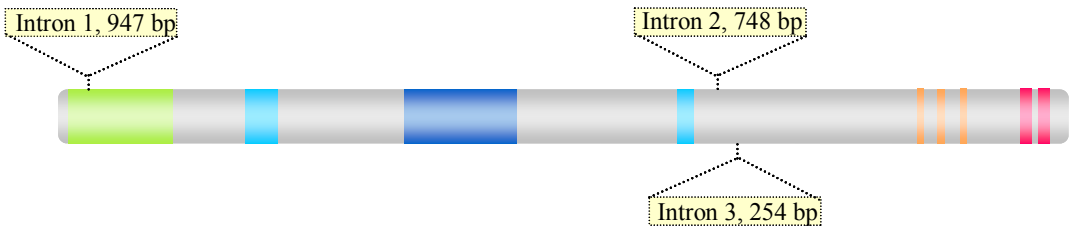


Abb. 3.11: Lage der Introns in der genomischen Sequenz von *Sl*cdc5. Grün: myb DNA-Bindedomäne. **Türkis:** NLS. **Blau:** TP reiche Domäne. **Orange:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung.

Tab.3.3: Charakterisierung der Introns des cdc5-Gens der Tomate

Intron	Lage des Introns	Größe des Introns	Intron-Exon Grenze
Intron 1	nt 177 + nt 178	947 bp	AG/GT - AG/GC
Intron 2	nt 1872 + nt 1873	748 bp	AG/GT - AG/AT
Intron 3	nt 2154 + nt 2155	254 bp	AG/GT - AG/AC

Die Intron-Exon-Grenzen der Introns folgen eindeutig der GT-AG Regel, lediglich die Di-Nukleotid-Sequenz des jeweils folgenden Exons variiert wie es in Tab. 3.3 dargestellt ist. Des Weiteren konnten keine Unterschiede in der genomischen Sequenz von *Sl*cdc5 bei den unterschiedlichen Kultursorten beobachtet werden.

3.1.3.2 Analyse des 5' und 3' nicht kodierenden Bereiches (UTR) über "Genome-Walk"

Über einen "Genom-Walk" sollten fehlenden Sequenzbereiche geschlossen werden und somit eine Charakterisierung des *Sl*cdc5-Promotors im 5'-UTR sowie eine Analyse möglicher Strukturelemente im 3'-Bereich ermöglicht werden. Der "Genome-Walk" wurde mit Hilfe des "Universal Genom-Walk™ Kit" von Clontech nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die hierfür verwendeten sequenzspezifischen Primer und deren Lage sind in Abb. 3.12 dargestellt.

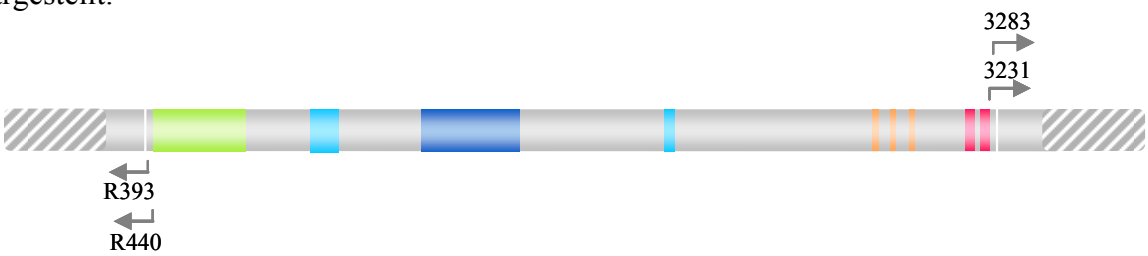


Abb. 3.12: Lage der "Genome-Walk"-Primer auf der gDNA von *Sl*cdc5. Unbekannte 5'- und 3'-Bereiche sind gestreift dargestellt. **Primer R393 und R440:** 5'-"Genome-Walk"-Primer. **Primer 3231 und 3283:** 3'-"Genome-Walk-Primer. **Grün:** myb DNA-Bindedomäne. **Türkis:** NLS. **Blau:** TP reiche Domäne. **Orange:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung.

Die verwendete hoch molekulare DNA (s. Abb. 3.13, Spuren 6 + 7) stammte von der Tomaten Kultursorte Rutgers und wurde mit Hilfe des "Plant DNA Isolation Kit" der Firma Roche isoliert.

Jeweils 25 µg DNA wurden mit den selten schneidenden Restriktionsenzymen Dra I (DNA-Library 1 = DL1), Eco RV (DL2), Pvu II (DL3), Sca I (DL4), und Stu I (DL5) verdaut. Als Positivkontrolle wurde *Homo sapiens* DNA des Kits mit Pvu II restringiert.

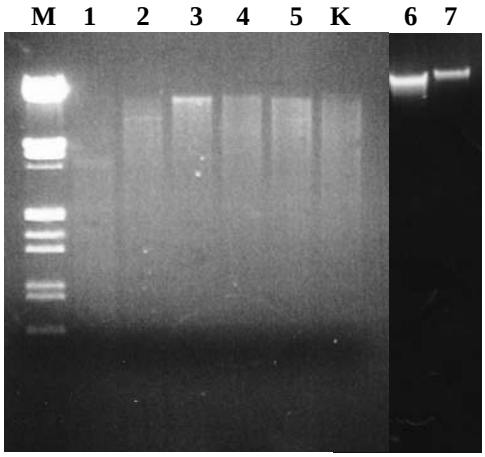


Abb. 3.13: Überprüfung des Restriktionsverdaus. M: DNA Molecular Weight Marker 3 (Roche). **Spur 1:** DL1-Dra I. **Spur 2:** DL2-Eco RV. **Spur 3:** DL3-Pvu II. **Spur 4:** DL4-Sca I. **Spur 5:** DL5-Stu I. **K:** Kontroll-DNA DL6-Pvu II. **Spuren 6 + 7:** unverdaute hochmolekulare DNA.

Zum Erhalt der DNA-Bank wurden nach erfolgreicher Restriktion (Abb. 3.13) die Adaptoren des "Universal Genom-Walk™ Kit" von Clontech an die DNA-Fragmente ligiert.

Die hergestellten DNA-Banken DL1-5 wurden unter Verwendung des Gen-spezifischen Primer R440 (GSP) und des adaptorspezifischen Primer 1 (ASP) als Template in eine erste PCR eingesetzt.

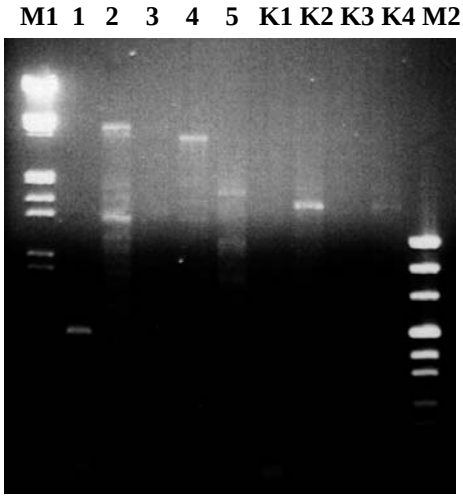


Abb. 3.14: Erste PCR des 5'-"Genome-Walks" mit den Primern R440 (GSP 1) und ASP 1. M1: DNA Molecular Weight Marker 3 (Roche). **M2:** pUC Mix Marker (Fermentas). **Spur 1:** PCR auf DL1. **Spur 2:** PCR auf DL2. **Spur 3:** PCR auf DL3. **Spur 4:** PCR auf DL4. **Spur 5:** PCR auf DL5. **K1:** Wasserkontrolle (ohne Tomaten-Bibliothek). **K2:** PCR auf eigens hergestellte Human-Bibliothek mit Human-Primer 1 und ASP1. **K3:** Wasserkontrolle (ohne Human-Bibliothek). **K4:** PCR auf mitgelieferte Human-Bibliothek mit Human-Primer 1 und ASP 1.

Wie in Abb. 3.14 zu erkennen, wurden in jeder PCR verschiedene Amplifikationsprodukte erhalten. Da allerdings keine eindeutigen Einzelprodukte vorlagen, wurden die erhaltenen

PCR-Produkte als Template in eine "Nested-PCR" mit den Primern R393 (GSP 2) und ASP 2 eingesetzt.

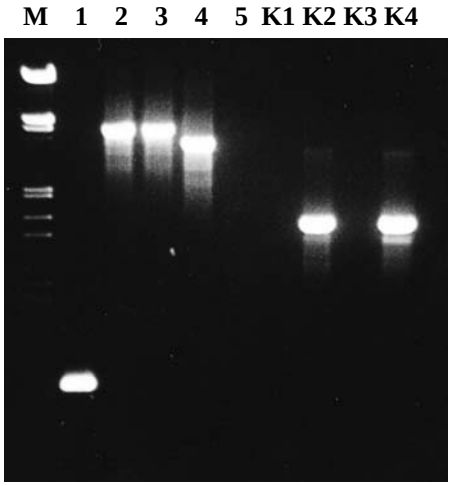


Abb. 3.15: "Nested-PCR" des 5'-"Genome-Walks" mit den Primern R393 (GSP 2) und ASP 2 unter Verwendung der Produkte aus PCR 1 als Template. M: DNA Molecular Weight Marker 3 (Roche). **Spur 1:** DL1. **Spur 2:** DL2. **Spur 3:** DL3. **Spur 4:** DL4. **Spur 5:** DL5. **K1:** Wasserkontrolle (ohne Tomaten-Bibliothek). **K2:** PCR auf eigens hergestellte Human-Bibliothek mit den Primern Human 2 und ASP 2. **K3:** Wasserkontrolle (ohne Human-Bibliothek). **K4:** PCR auf mitgelieferte Human-Bibliothek mit Human-Primer 2 und ASP 2.

Unter Verwendung der verschiedenen DNA-Banken konnten über die "Nested-PCR" eindeutige Amplifikate erzielt werden. Die in Abb. 3.14 zu beobachtenden Nebenbanden sind gänzlich verschwunden, welches auf eine hohe Spezifität der erhaltenen Produkte schließen lässt. Lediglich mit DL5 konnte kein Amplifikat erhalten werden. Die Produkte von DL1 ca. 500 bp, DL2 und DL3 ca. 4 kb sowie DL4 ca. 3,0 kb wurden anschließend kloniert und über die vektorspezifischen Primer einer ersten Sequenzierung unterzogen.

Die Sequenzierung zeigte, dass die Produkte von DL1 bis DL4 am 3'-Ende den bekannten 5'-Bereich von *Sl*cdc5 aufwiesen. Des Weiteren fanden sich bei den untersuchten Klonen aus DL2 und DL3 auch im 5'-Bereich ein überlappender Sequenzbereich. Die hieraus resultierende hypothetische Organisation der untersuchen Klone ist in Abb. 3.16 dargestellt.

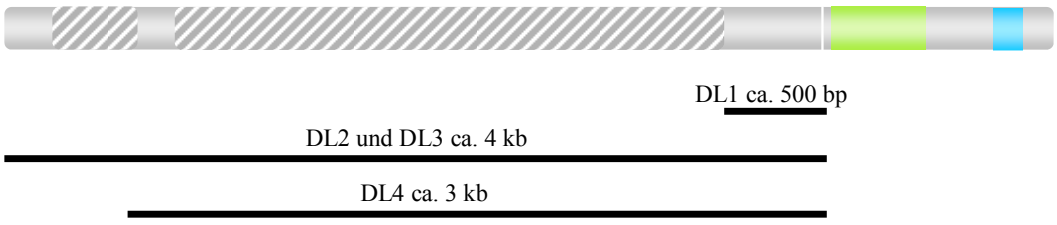


Abb. 3.16: Hypothetische Organisation der Klone aus dem 5'-"Genome-Walk" nach Sequenzierung mit vektorspezifischen Primern. Unbekannte Sequenzbereiche sind gestreift dargestellt. **Grün:** myb DNA-Bindedomäne. **Blau:** NLS.

Mit Hilfe der in Abb. 3.17 dargestellten Primer wurden in mehreren Schritten die jeweils erhaltenen "Contigs" verbunden. Ausgehend vom "Nested"-Primer wurde ein Sequenzbereich von 4018 bp vollständig sequenziert, welches abschließend einer neuen zusätzlichen Sequenzinformation des cdc5-Gens von 3900 bp entspricht.

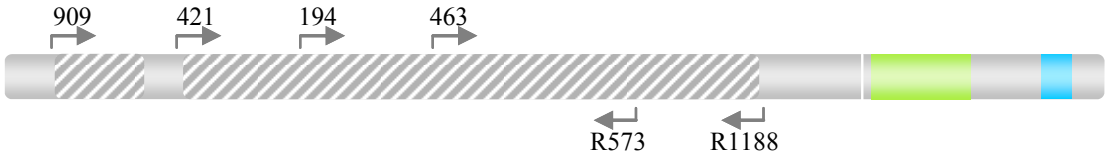


Abb. 3.17: Lage und Orientierung der Primer auf der hypothetischen 5'UTR von *Sl*cdc5. Unbekannte Bereiche sind gestreift dargestellt. **Grün:** myb DNA-Bindedomäne. **Blau:** NLS.

Für die Analyse des unbekannten 3'-nichtkodierenden Bereiches und Identifikation des Polyadenylierungssignals auf genomischer DNA erfolgte ein 3'-"Genome-Walk" ebenfalls unter Verwendung der bereits beschriebenen genomischen Tomaten-DNA-Banken. Als Primer für die erste PCR dienten 3231 als GSP1 und der ASP 1. In der "Nested-PCR" wurden die Primer 3283 als GSP2 und ASP2 verwendet.

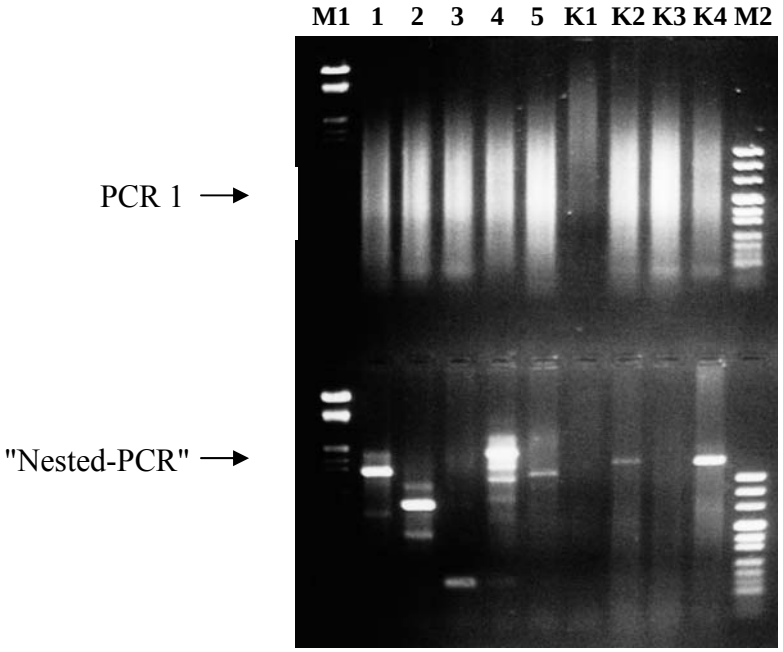


Abb. 3.18: PCR 1 und "Nested-PCR" des 3'-"Genome-Walks". M1: DNA Molecular Weight Marker 3 (Roche). **M2:** pUC Mix Marker (Fermentas). **Spur 1:** DL1. **Spur 2:** DL2. **Spur 3:** DL3. **Spur 4**: DL4. **Spur 5:** DL5. **K1:** Wasserkontrolle (ohne Tomaten-Bibliothek). **K2:** PCR auf eigens hergestellte Human-Bibliothek. **K3:** Wasserkontrolle (ohne Human-Bibliothek). **K4:** PCR auf mitgelieferte Human-Bibliothek.

Im Vergleich zum 5'-"Genome-Walk" zeigt der für die 3'-UTR ein deutlich heterogeneres Muster. Nur in den Spuren von DL3 und DL5 sind Einzelbanden zu beobachten, wobei die

Einzelbande von DL3 mit einer Größe von ca. 150 bp keine neuen Sequenzinformationen erwarten ließ. Allgemein sind die erhaltenen Produkte mit Größen zwischen ca. 700 und 1800 bp viel kleiner als diejenigen des 5'-"Genome-Walk". Die Produkte von DL1, DL2, DL4 und DL5 wurden in den Vektor pCR®4-TOPO kloniert und hieraus Klone verschiedener Größen über die vektorspezifischen Primer sequenziert. Ausgehend von der bekannten cDNA-Sequenz von *Le*cdc5 konnten über den "Genome-Walk" 750 bp zusätzliche Sequenzinformation erhalten werden, wodurch das Polyadenylierungssignal auf gDNA eindeutig an Position + 168 bp nach dem Stopcodon bestätigt wurde.

3.1.3.3 Analyse des *Sl*cdc5 Promotors durch "Primer-Extension"

Mit Hilfe von verschiedenen Promotor-Vorhersage-Programmen (s. Material u. Methoden) wurde der 5'-Nichtkodierungs-Bereich nach möglichen Promotor-Elementen untersucht. Hierbei wurden in dem durch den "Genome-Walk" erhaltenen 5' UTR etwa 25 mögliche Promotor-Regionen vorgeschlagen.

Um aus der Vielzahl von Möglichkeiten den wahrscheinlichsten Bereich festlegen zu können, sollte der Transkriptionsstart von *Sl*cdc5 ermittelt werden. Da das proximale Element eines Promotors bei Eukaryoten, die TATA-Box, in einem Bereich von etwa -35 Nukleotiden vom Transkriptionsstart entfernt positioniert ist, kann so die Identifikation des Promotors erfolgen. Hierfür wurde das Verfahren der Primer-Extension ausgewählt (Wu, 1994), für die zunächst Digoxigenin markierten Primer aus verschiedenen Positionen des zu untersuchenden Bereiches abgeleitet wurden.

Abb. 3.19: Lage und Orientierung der Primer-Extension-Primer auf der gDNA von *Sl*cdc5. Grün: myb DNA-Bindedomäne. **Blau:** NLS.

Ausgehend von diesen Primern wurde zum einen RNA revers transkribiert und zum anderen Sequenzreaktionen mit den verschiedenen Terminatoren A, G, C und T durchgeführt. Elektrophorese und Transfer der Nukleinsäuren wurden nach den Angaben zum "Direct Blotting Elektrophoresis System" (GATC) durchgeführt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten mit Hilfe des Digoxigenin-markierten Primers detektiert und auf einem Röntgenfilm dokumentiert werden.

Erwartet wurde, dass in der Spur der revers transkribierten RNA eine eindeutige Bande auf dem Röntgenfilm zu erkennen ist, welche die genaue Länge der synthetisierten cDNA und

damit den Transkriptionsstart der mRNA darstellt. Mit Hilfe der nebenher laufenden Sequenzreaktion kann dieser Punkt auf das Nukleotid genau bestimmt werden. Anschließend sollte dieser Bereich der bekannten 4 kb langen Sequenz zugewiesen und somit der Promotorbereich identifiziert werden.

Bei den "Primer-Extension"-Reaktionen konnte nur mit dem Dig-markierten Primer R4002-Dig ein Produkt bei der Reversen Transkription synthetisiert werden, jedoch nicht mit dem etwa 400 bp stromaufwärts gelegenen Primer R3425-Dig. Damit war bereits eine grobe Eingrenzung des Promotors auf die Region -400 bp vor dem Start des offenen Leserahmens möglich geworden. Allerdings traten bei dem Primer R4002-Dig mehrere Banden auf, wodurch eine genaue Zuordnung des Promotors über die Primer-Extension nicht möglich war.

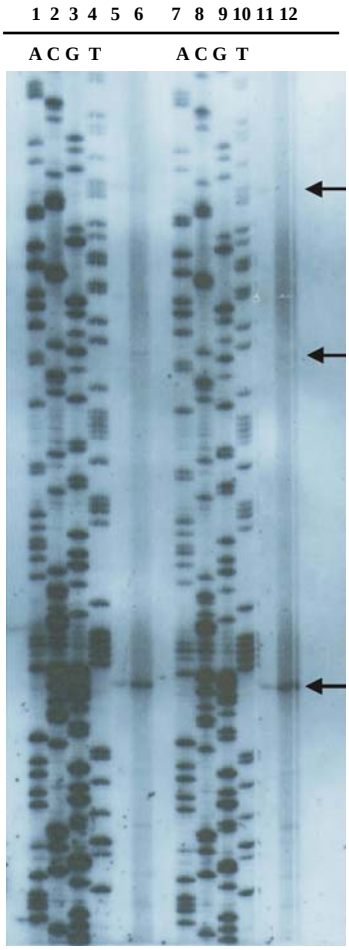


Abb. 3.20: Primer-Extension-Analyse mit dem Dig-markierten Primer R4002-Dig. Die Pfeile deuten auf die Terminationspunkte der Reversen Transkription. **Spur 1 + 7:** Terminator A. **Spur 2 + 8:** Terminator C. **Spur 3 + 9:** Terminator G. **Spur 4 + 10:** Terminator T. **Spuren 5 + 11:** revers transkribierte RNA. 4 µl des Reaktionsansatzes aufgetragen. **Spuren 6 + 12:** revers transkribierte RNA, 8 µl des Reaktionsansatzes aufgetragen.

Daher wurde für eine genaue Zuordnung des Transkriptons-Startpunktes eine RT-PCR mit jeweils für jede mögliche Startstelle selektiv abgeleiteten Primerpaaren durchgeführt.

Abb. 3.21: Lage und Orientierung der Primer für eine Transkriptionsstartpunkt-Analyse. Grün: myb DNA-Bindedomäne. **Türkis:** NLS.

Die reverse Transkription wurde unter Verwendung von Gesamt-RNA der Tomatenkultursorte Rutgers durchgeführt, ohne zuvor einen DNA-Verdau durchzuführen. Dieses diente als direkte PCR-Kontrolle, da mit den R845 oder R557 Primer ausgewählt wurden, die auf genomischer Ebene hinter Intron 1 liegen und somit pro Versuchsansatz genomische sowie cDNA-Amplifikate unterschiedlicher Größe zu erwarten waren. Eine detaillierte Auflistung der erhaltenen Ergebnisse ist in Tab. 3.4 aufgeführt. Exemplarisch ist in Abb. 3.22 die RT-PCR mit den verwendeten Primern 3720 und R845 bzw. 3720 und R557 dargestellt.

Tab. 3.4: Ergebnisse der RT-PCRs zur Analyse des Transkriptionsstartpunktes

1. Strang-Primer	PCR-Primer	Fragmentgröße DNA	erwartete Fragmentgröße bei RNA	cDNA vorhanden
R845	3830	1586	636	ja
R845	3803	1613	663	ja
R845	3776	1640	690	ja
R845	3740	1675	725	ja
R557	3740	1387	437	ja
R845	3720	1695	745	nein
R557	3720	1407	458	nein
R845	3702	1713	763	nein
R557	3702	1425	475	nein

Wie in Tab. 3.4 und zu erkennen, wurden über eine RT-PCR der Primerkombinationen 3720 und 3702 mit R845 und R557 keine Produkte auf Höhe der erwarteten cDNA-Bande amplifiziert. Da allerdings unter Verwendung der Primerkombination 3720 mit R845 und R557 die genomischen Fragmente in erwarteter Höhe synthetisiert wurden (s. Abb. 3.22 b), ist davon auszugehen, dass die Primer 3720 und 3702 tatsächlich nicht mehr auf der mRNA

binden. Über eine sequenzielle Analyse des erhaltenen Fragmentes von 850 bp konnte darüber hinaus eine cdc5-Spezifität dieses Produktes ausgeschlossen werden. Über die Verwendung der Primerkombination 3740 mit R845 in einer reversen Transkription wurden hingegen die erwarteten Fragmente auf Höhe von 1695 bp (DNA) sowie 725 bp (cDNA) amplifiziert. Somit konnte der Transkriptionsstartpunkt zwischen oder in dem Bereich der Primer 3720 und 3740 lokalisiert werden.

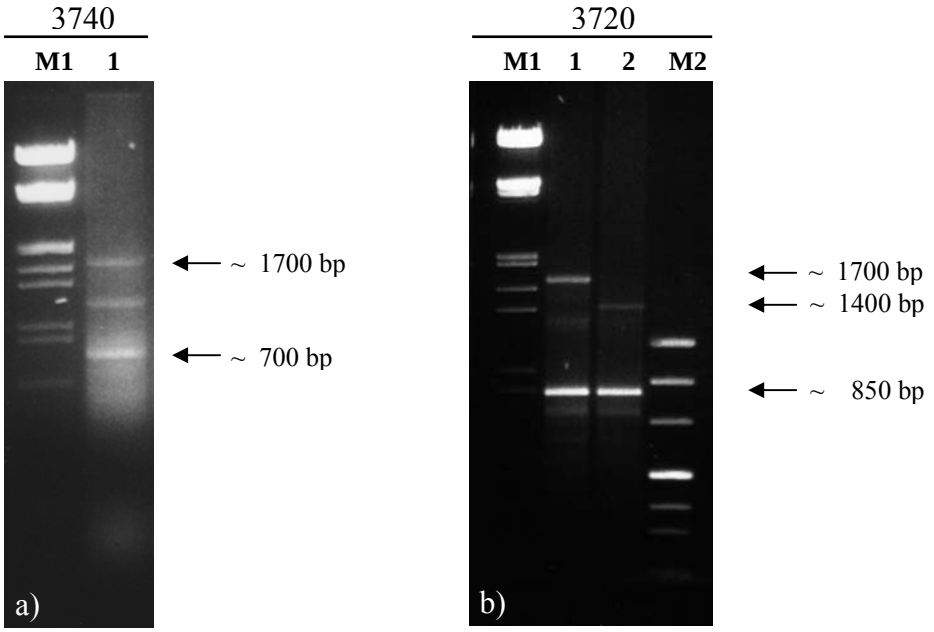


Abb. 3.22: RT-PCR zur Analyse des Transkriptionsstartpunktes. M1: DNA molecular weight markter 3 (Roche). **M2:** pUC Mix Marker (Fermentas). **a) Spur 1:** RT-PCR der Primer 3740 + R845. **b) Spur 1:** RT-PCR der Primer 3720 + R845. **Spur 2**: RT-PCR der Primer 3720 + R557.

Über einen Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit den Resultaten aus der "Primer-Extension"-Analyse konnte der Transkriptionsstart 231 Nukleotide stromaufwärts vom Initiationscodon identifiziert werden. Nach Charakterisierung der regulatorischen Promotorelemente kann somit folgende Promotororganisation vorgeschlagen werden.

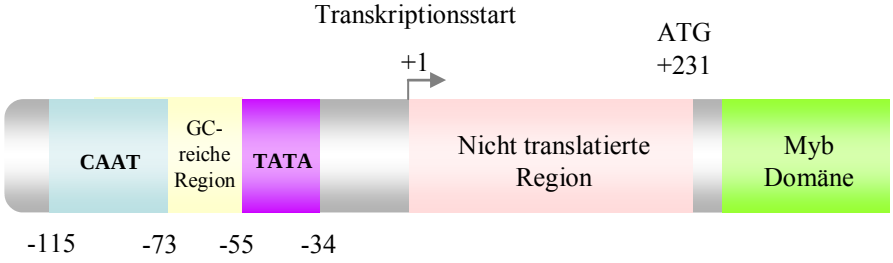


Abb. 3.23: Vorgeschlagene Promotororganisation des cdc5-Gens der Tomate.

3.1.4 Vergleichende Betrachtung der cdc5-Gene von *Nicotiana rustica* L. und *Solanum tuberosum* L.

Um die Bedeutung der carboxyterminalen Region des CDC5-Proteins für die Anfälligkeit verschiedener Pflanzenspezies gegenüber einer Viroidinfektion zu untersuchen, sollten verschiedene Vertreter der *Solanaceae* vergleichend betrachtet werden. Im Rahmen einer in diese Untersuchungen eingebundenen Diplomarbeit (Bolle, 2004) wurde das cdc5-Gen von *Solanum tuberosum* vollständig sequenziert und charakterisiert. Für *Nicotiana rustica* konnte innerhalb der Diplomarbeit nur eine Teilsequenz von *Nr*cdc5 erhalten werden. Von dieser wurden die Primer Tabak-1035 und Tabak-1255 abgeleitet und in 3'-"RACE"-Experimenten eingesetzt. Die Erststrang-Synthese erfolgte unter Verwendung des Oligo-dT-Anchor-Primers mit Gesamt-RNA von *Nicotiana rustica*. Die folgende PCR wurde mit den Primern Tabak-1035 und dem Anchor-Primer durchgeführt. Für eine höhere Spezifität der Produkte wurde anschließend, analog zu Tomate das Amplifikat in eine "Nested-PCR" mit den Primern Tabak-1255 und dem Oligo-dT-Primer, eingesetzt.

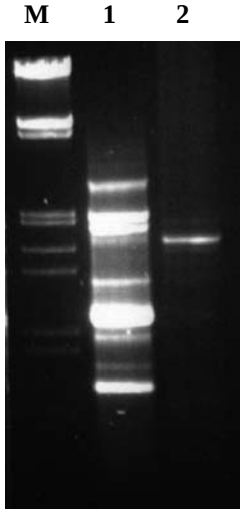


Abb. 3.24: 3'-"RACE" des cdc5-Gens von *Nicotiana rustica*. M: DNA Molecular Weight Marker 3 (Roche). **Spur 1:** RT-PCR mit den Primern Tabak-1035 + Anchor. **Spur 2:** "Nested-PCR" mit den Primern Tabak-1255 + Oligo- dT unter Verwendung des Produktes aus Spur 1 als Template.

Wie in Abb. 3.24 deutlich zu erkennen ist, konnte über die "Nested-PCR" ein Einzelprodukt in der Größe von ca. 1600 bp amplifiziert werden, welches anschließend kloniert und sequenziert wurde. Aufgrund der hohen Homologie zu *Sl*cdc5 ließ sich die erfolgreiche Klonierung des 3'-Bereiches des cdc5-Gens von *Nicotiana rustica* bestätigen.

Des Weiteren konnte, unter Verwendung der von Bolle (2004) erstellten Tabak-Banken, ein 3'-"Genome Walk" durchgeführt werden, über welchen die fehlenden 3'-Sequenzbereiche auf

genomischer Ebene geschlossen wurden. Hierdurch war nunmehr ein Vergleich der carboxyterminalen Region der cdc5-Gene von Tomate, Kartoffel und Tabak möglich.

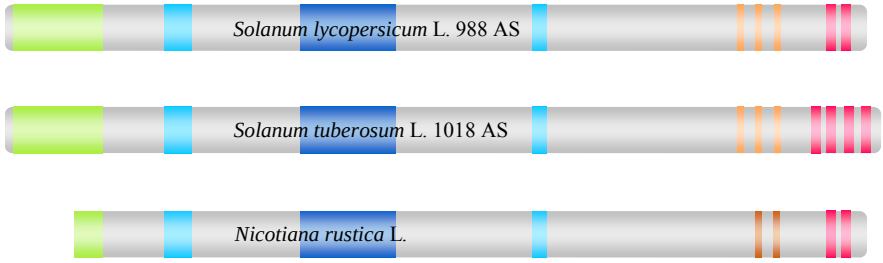


Abb. 3.25: Vergleich der abgeleiteten CDC5-Proteinsequenzen von Tomate, Kartoffel und Tabak. Grün: myb DNA-Bindedomäne. **Türkis:** NLS. **Blau:** TP reiche Domäne. **Orange:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung. **Braun:** VESSET-Wiederholung.

Hieraus wird deutlich, dass das CDC5-Protein der Kartoffel um 30 Aminosäuren länger ist als das CDC5-Protein der Tomate. Am C-terminalen Ende tritt die VTKT-Wiederholung bei Kartoffel, der ursprünglichen PSTVd-Wirtspflanze, sogar viermal auf. *Nicotiana rustica* hat eine mit Tomate vergleichbare Sequenz in der VTKT-Wiederholung, weist aber eine abweichende Sequenz im Bereich der VEPS-Wiederholung auf. Hier findet sich eine zweimalige Wiederholung der Aminosäuresequenz VESSET.

Die erhaltenen *Sl*cdc5-spezifischen Sequenzen sind in der NCBI-Datenbank unter den "Accession"-Nummern EU095495 und EU095496 eingetragen.

3.2 Funktionsanalysen des cdc5 Promotors

Wie dargestellt, konnte über verschiedene Versuchsansätze wie "Genomewalk" und "Primer-Extensions-Experimente" der putative Promoter des cdc5-Gens der Tomate identifiziert werden.

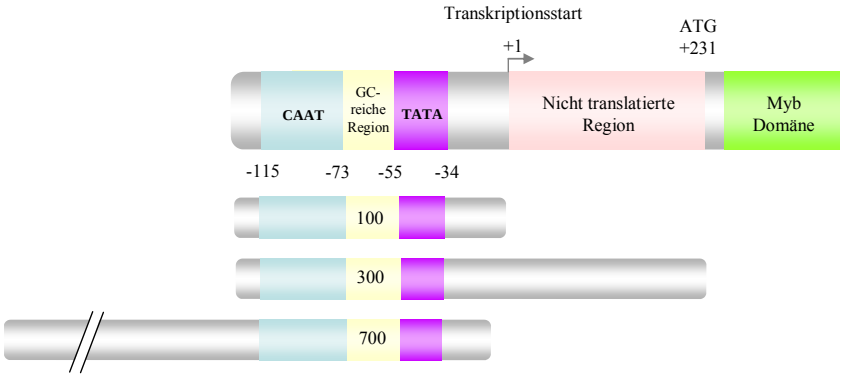


Abb. 3.26 Vorgeschlagene Promotororganisation des cdc5-Gens der Tomate und Darstellung der für die Expressions-Experimente verwendeten Sequenzbereiche. Die Bezeichnung der Klonierungsfragmente richtet sich nach ihrer ungefähren Größe in bp. **Fragment 100:** 100 bp. **Fragment 300:** 280 bp. **Fragment 700:** 680 bp.

Für eine funktionelle Charakterisierung der Promotorfunktion erfolgte die Expression des Reportergens GFP (Green Fluorescent Protein) über verschiedene Konstrukte des cdc5-Promotors (Abb. 3.26) mittels transientem DNA-Transfer in Mesophyllprotoplasten der Tomate.

Als Positivkontrolle sowie als Vektor für den direkten DNA-Transfer wurde das Plasmid pmon30049 von Monsanto verwendet, welches freundlicherweise von Dr. Stephan Scholten zur Verfügung gestellt wurde. Nach Exzision des vektoreigenen 35S-Promotors sowie des ihm folgenden HSP70-Introns wurden die Promotorfragmente über die Schnittstellen HindIII und BamHI des Vektors vor den GFP-Gen-ORF inseriert. Als Negativkontrolle diente der religierte Vektor pmon30049 Δ35S/HSP70-Intron. Die Klonierungskonstrukte wurden über Restriktionsanalyse mit Pst I (s. Abb. 3.27) sowie über Sequenzierung mit vektorspezifischen Primern überprüft.

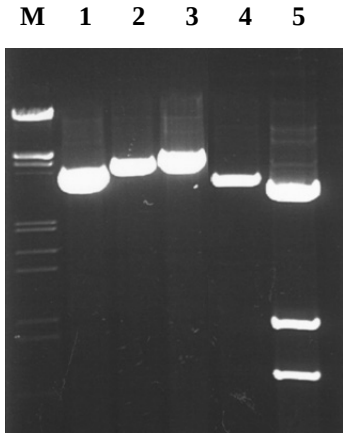


Abb. 3.27: Konstrukte für die Promotorfunktionsanalyse nach Restriktion mit Pst I. M: DNA Molecular Weight Marker 3 (Roche). **Spur 1:** pmon + 100 = 3915 bp. **Spur 2:** pmon + 300 = 4095 bp. **Spur 3:** pmon + 700 = 4495 bp. **Spur 4:** pmon Δ35S/HSP70-Intron = 3815 bp. **Spur 5:** pmon30049 = 690 bp. 1033bp + 3549 bp.

Ebenso wie die durchgeführten Sequenzanalysen entsprachen die Größen der in Abb. 3.27 dargestellten Restriktionsfragmente den Erwartungen, womit die Konstrukte für den direkten Gen-Transfer eingesetzt werden konnten.

Die verwendeten Protoplasten wurden aus Blättern von cv. Micro-Tom isoliert, die sich zuvor in einem Vergleich mit den Kultursorten Rutgers, Rentita und Goldkugel in Handhabung und Ausbeute als besonders geeignet erwiesen hatte (nicht gezeigt). Nachdem die Qualität und Quantität der isolierten Protoplasten mittels Lichtmikroskopie überprüft wurde (Abb. 3.28), erfolgte die Transfektion unter Verwendung von 1,5 x 10^6 Protoplasten pro Versuchsansatz nach der von Negrutiu *et al*. (1987) beschriebenen Methode.

Abb. 3.28: Lichtmikroskopische Aufnahme eines intakten Mesophyllprotoplasten der Tomatenkultursorte Micro-Tom.

Dem Gentransfer folgte die Aufnahme der Protoplasten in B5-Kulturmedium zur weiteren Kultivierung über Nacht bei 28°C. Die Auswertung der Transformationsrate sowie der Funktionalität der unterschiedlichen Promotor-Konstrukte wurde am folgenden Tag mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

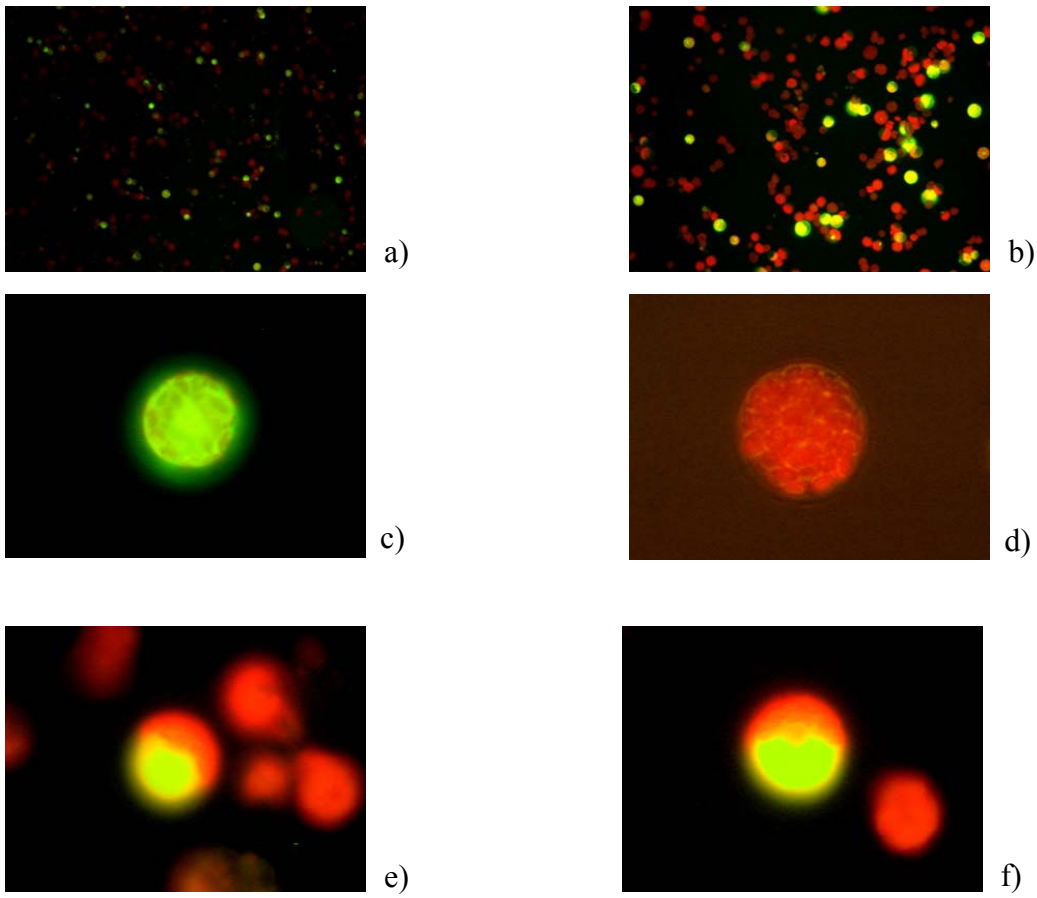


Abb. 3.29: Fluoreszensmikroskopische Aufnahmen der Mesophyll-Protoplasten 24 Stunden nach Transformation mit GFP-Konstrukten. a) und b): Gesamtaufnahme nach Transformation mit pmon30049, Vergrößerungsfaktor im Original 40. **c):** einzelner Protoplast nach Transformation mit pmon30049, Vergrößerungsfaktor 100. **d)** nicht transformierter intakter Protoplast, Vergrößerungsfaktor 100. **e) und f):** Transformanden des Promotorkonstruktes 700, Vergrößerungsfaktor 100.

Wie der Vergleich zwischen Abb. 3.29 a) mit e) und f) zeigt, wurde bei den cdc5-Promotorkonstrukten eine relativ schwache GFP-Fluoreszens der Protoplasten beobachtet..

Über das Auszählen von 500 Zellen pro Versuchsansatz erfolgte die Bestimmung der Anzahl intakter Protoplasten in %. Ausgehend von intakten Zellen wurde zum einen, anhand der Fluoreszenz nach Transformation der Protoplasten mit den pmon-Konstrukten, die Transformationsrate ermittelt, zum anderen die Funktionaliät der Promotorkonstrukte vergleichend betrachtet.

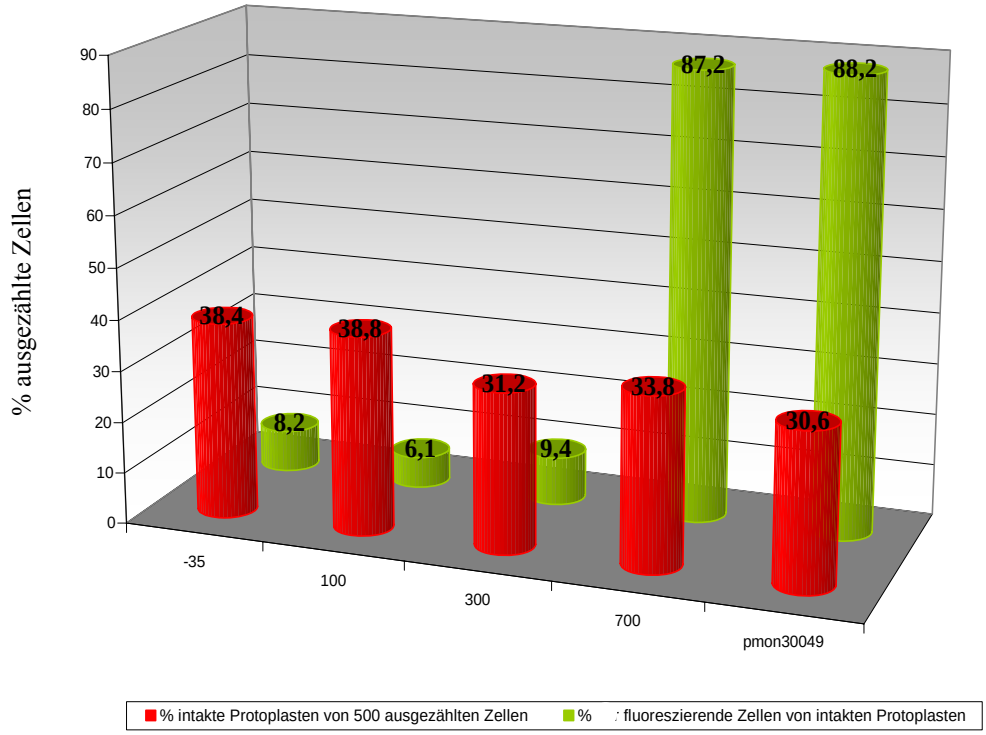


Abb. 3.30: Grafische Darstellung der Protoplastenauszählung. -35: pmon30049 ohne 35S-Promotor. **100:** Promotorfragment 100. **300:** Promotorfragment 300. **700:** Promotorfragment 700. **pmon30049:** vollständiger pmon30049-Vektor.

Anhand der in Abb. 3.30 dargestellten Ergebnisse ist deutlich zu erkennen, dass die Überlebensrate der Protoplasten nach Transformation im Durchschnitt etwa einem Drittel entsprach. Die meisten fluoreszierenden Zellen wurden bei den Versuchsansätzen mit pmon30049 sowie bei dem cdc5-Promotorkonstrukt 700 beobachtet. Bei beiden lag die Prozentzahl intakter leuchtender Zellen bei über 87 %, wodurch die Promotorfunktion des 700-Fragmentes als sehr wahrscheinlich angesehen werden kann. Dagegen konnte nach Transformation der Protoplasten mit den Fragmenten 100 und 300 nur eine geringe Anzahl schwach leuchtender Protoplasten beobachtet werden. Da auch bei pmon30049Δ35S diese Beobachtung gemacht werden konnte, ist von einem Hintergrundleuchten auszugehen.

3.3 Bindungsstudien zum Nachweis einer Interaktion des CDC5-Proteins mit PSTVd

3.3.1 Das Tri-Hybrid-System nach Putz *et al.* 1996

Zum Nachweis einer Interaktion zwischen dem CDC5-Protein und der PSTVd-RNA wurde das Tri-Hybrid System nach Putz *et al*. (1996) gewählt. Dieses System, eine Modifikation des Two-Hybrid Systems, bietet zum einen die Möglichkeit, spezifische RNA-bindende Proteine oder Target-RNAs aus cDNA-Bibliotheken zu identifizieren, zum anderen eine strukturelle Analyse von identifizierten Protein-RNA Interaktionen durchzuführen.

Das Tri-Hybrid System besteht aus drei Hybrid-Molekülen: I: die DNA-bindende-Domäne von GAL4 fusioniert an die RevM10 Mutante des HIV-1 Rev Proteins (RRE-RNA-bindendes Protein); II: die RRE-RNA Sequenz (Rev Responsives Element) fusioniert mit der Ziel-RNA, hier PSTVd; III: Die Aktivierungsdomäne von GAL4 fusioniert an das zu analysierende Protein CDC5 (Abb. 3.31).

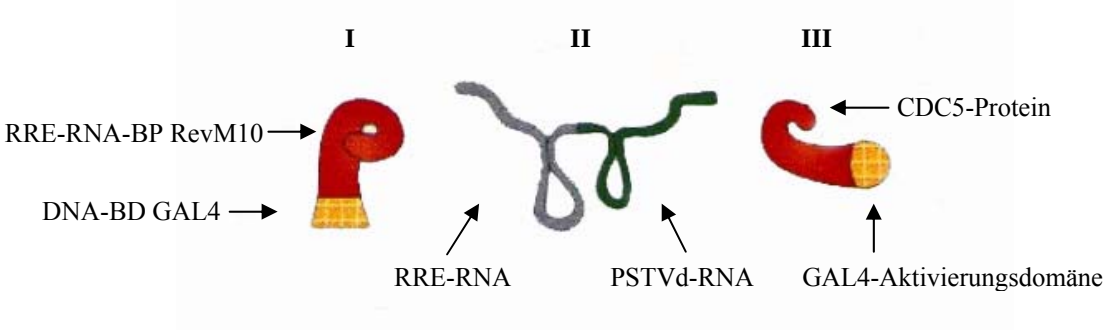


Abb. 3.31: Schematische Darstellung der Komponenten des Tri-Hybrid Systems. Abbildung nach Putz *et al.* 1996; modifiziert. **I:** Hybrid-Protein 1. **II:** Hybrid-RNA. **III:** Hybrid-Protein 2.

Über eine produktive Interaktion der Hybride I, II und III kommt es zur Bildung eines GAL4 Transkriptionsfaktors (Abb. 3.32), dessen Bindung an den GAL4 responsiven Promotor die Transkription des LacZ-Gens sowie des Reportergens HIS3 stimuliert.

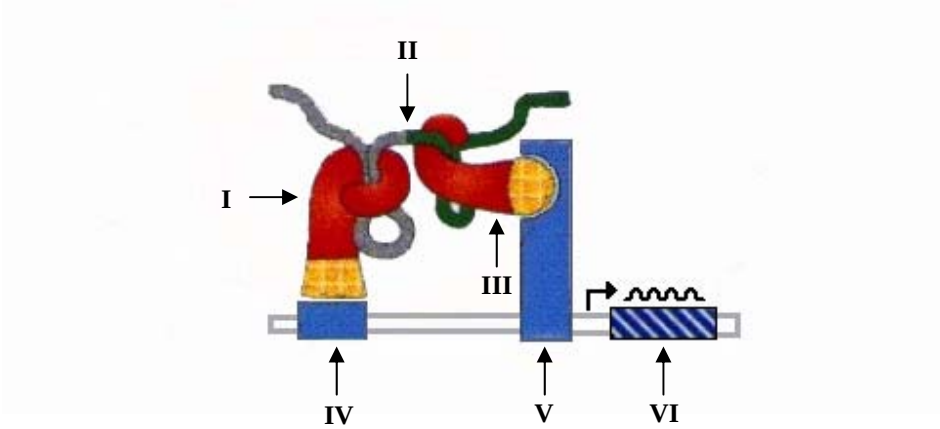


Abb. 3.32: Schematische Darstellung einer erfolgreichen Interaktion der Komponenten des Tri-Hybrid Systems und somit Bildung eines GAL4 Transkriptionsfaktors. Abbildung nach Putz *et al.* (1996), modifiziert. **I:** Hybrid-Protein 1. **II:** Hybrid-RNA. **III:** Hybrid-Protein 2. **IV:** GAL4 responsiver Promotor. **V:** basale Transkriptionsmaschinerie. **VI:** Transkription von lacZ und HIS3.

Für die Tri-Hybrid-Analysen wurden zunächst vier unterschiedlich große Fragmente von *Sl*CDC5 ausgewählt. Die Wahl dieser Fragmente richtete sich vor allem nach dem Auftreten der putativen Strukturmotive des *Sl*CDC5. So sollte zum einen überprüft werden, ob die charakteristischen C-terminalen Sequenzwiederholungen für eine Bindung an das Viroid ausreichen (Fragment 2858). Das Fragment 1930 beinhaltet die Sequenz des Klones pRW 19.5, über welche im "Ligang-Blot" eine Bindung an PSTVd beobachtet werden konnte (Werner, 1995c). Ob zusätzliche Komponenten, wie die TP-reiche Domäne oder die N-terminale NLS, eine Interaktion mit PSTVd fördern, soll über die Konstrukte 1226 und 851 geklärt werden.

Die Herstellung der unterschiedlichen cdc5-spezifischen Klonierungprodukte erfolgte über RT-PCR unter Verwendung von DNase-behandelter gesamt RNA der Kultursorte Rutgers. Der cDNA-Strang jedes der in Abb. 3.33 dargestellten cdc5-spezifischen Fragmente wurde mit Hilfe des Primers 3H-3365NcoI und der SuperScript II RT von Invitrogen synthetisiert. Für die anschließende PCR wurde die Takara LA Taq ausgewählt, da sich diese durch eine äußerst geringe Fehlerrate auszeichnet. Als PCR-Primer wurden je nach gewünschtem Fragment die Primer 3H-2858NcoI, 3H-1930NcoI, 3H-1226NcoI sowie 3H-851NcoI ausgewählt, nach deren Verwendung auch die Benennung der Tri-Hybrid-Klone erfolgte. Die Klonierung der cdc5-cDNA-Fragmente in den Tri-Hybrid-Vektor pACT2 erfolgte ungerichtet über die Restriktionsschnittstelle Nco I. PSTVd wurde in doppelter Länge über Not I in pRevRX inseriert, um mögliche Bindungsdomänen des ursprünglich ringförmigen Moleküls unzerstört zu erhalten. Plasmide, deren Inserts die erwarteten Größen aufwiesen, wurden zunächst auf die Orientierung des Inserts im Vektor hin überprüft. Im Anschluss hieran wurden Klone richtiger Orientierung vollständig sequenziert, um eventuell auftretende Mutationen auszuschließen.

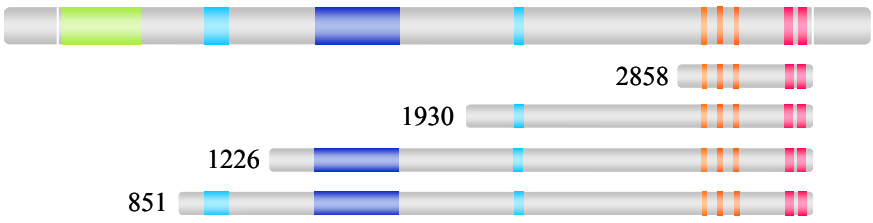


Abb. 3.33: Schematische Darstellung der verwendeten cdc5-cDNA Tri-Hybrid-Fragmente. 2858: 530 bp, **1930:** 1422 bp, **1226:** 2126 bp, **851:** 2494. **Grün:** myb DNA-Bindedomäne. **Türkis:** KLS. **Blau:** TP reiche Domäne. **Orange:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung.

Die Hefe-Transformationen erfolgten nach dem "Small-Scale-Transformation"-Protokoll aus dem Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 Benutzerhandbuch der Firma Clontech (BD Biosciences). Die ausgewählten Versuchsansätze sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tab. 3.5: Versuchsansätze I des Tri-Hybrid Systems.

Ansatz 1:	PSTVd/pRevRX	+	2858/pACT2	Viroid-CDC5 Bindungsstudien
Ansatz 2:	PSTVd/pRevRX	+	1930/pACT2	
Ansatz 3:	PSTVd/pRevRX	+	1226/pACT2	
Ansatz 4:	PSTVd/pRevRX	+	851/pACT2	
Ansatz 5:	PSTVd/pRevRX	+	pADRevM10	Kontrolle Viroid
Ansatz 6:	pRevR2	+	2858/pACT2	Negativkontrollen CDC5
Ansatz 7:	pRevR2	+	1930/pACT2	
Ansatz 8:	pRevR2	+	1226/pACT2	
Ansatz 9:	pRevR2	+	851/pACT2	
Ansatz 10:	pRevR2	+	pADRevM10	Positivkontrolle Tri-Hybrid System

Über die Verwendung des oben genannten Protokolls konnte eine gute und ausreichende Transformationsrate bei allen Transformationsansätzen erzielt werden, wie es in Abb. 3.34 exemplarisch dargestellt ist.

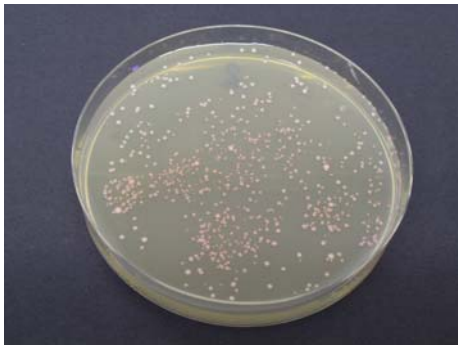


Abb. 3.34: Exemplarische Darstellung einer Hefe-Transformation mit den Konstrukten 2858/pACT2 und PSTVd/pRevRX. Die Anzucht und Selektion der Hefezellen erfolgte auf WA-Medium Δ Tryptophan /Leucin.

Die Analyse einer RNA-Protein Interaktion wurde nach Angaben von Prof. Dr. Dietmar Kuhl (pers. Mitteilung) durchgeführt und erfolgte wie in Abb. 3.32 dargestellt über zwei Nachweismethoden: zum einen wird die Synthese des Reportergens HIS3 durch eine Interaktion von RNA und Protein initiiert, wodurch die Hefezellen dazu befähigt werden, auf Histidin-Mangelmedium zu wachsen. Zum anderen kann eine erfolgreiche Interaktion über den Nachweis von lacZ durch X-Gal erfolgen.

Zum Nachweis einer Interaktion von CDC5 und PSTVd über lacZ wurden pro Transformationsansatz drei Hefekolonien auf WA-Platten Δtrp/leu (TL-Platten) ausgestrichen und bis zur weiteren Verwendung für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

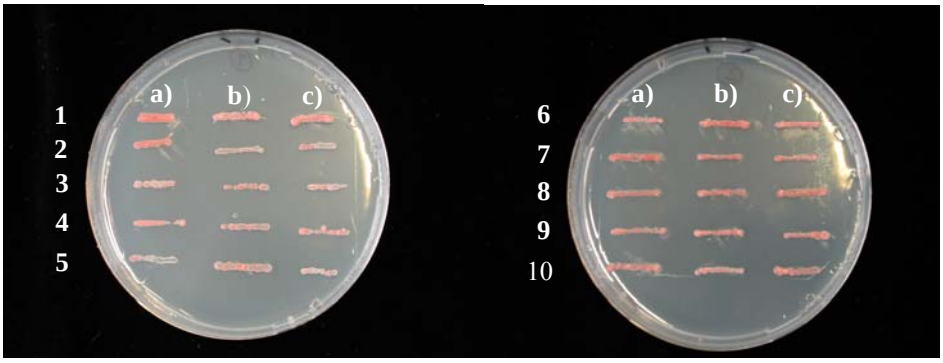


Abb. 3.35: Ausstrich der transformierten Hefekolonien für lacZ-Analysen. 1 - 10: Transformationsansätze nach Tabelle 3.5. **a) - c):** unterschiedliche Kolonien eines Transformationsansatzes.

Nach ausreichendem Zellwachstum (Abb. 3.35) wurden die Hefen auf Nylonmembranen übertragen, in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen, und anschließend auf X-Gal in Z-Puffer getränkten Whatmanpapieren bei 30°C bis zum Auftreten einer Blaufärbung inkubiert.

Wie in Abb. 3.36 deutlich zu erkennen, zeigten nur Hefezellen der Transformationsansätze 5 und 10 eine Blaufärbung, welches auf eine Interaktion der einzelnen Komponenten des Tri-Hybrid Systems zurückzuführen ist.

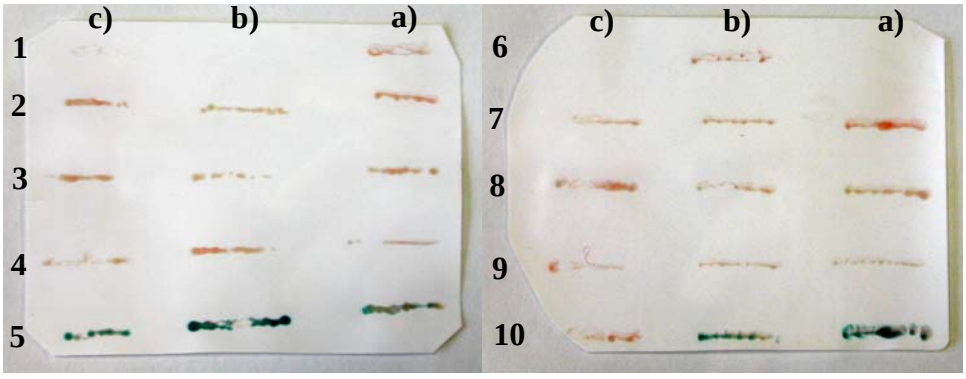


Abb. 3.36: lacZ-Analysen zum Nachweis einer Protein-RNA-Interaktion. Hefeabdrücke der in Abb.3.35 dargestellten Ausstriche. **1 - 10:** Transformationsansätze nach Tabelle 3.5. **a) - c):** unterschiedliche Hefekolonien.

Somit sollte der Transformationsansatz 10, als Positivkontrolle des Tri-Hybrid-Systems, LacZ-Aktivität aufweisen. Über den Transformationsansatz 5 sollte die Eignung von PSTVd im Tri-Hybrid-System getestet werden. Da auch hier eine Färbung zu beobachten ist, scheint eine Beeinflussung der System-Komponenten durch PSTVd unwahrscheinlich. Die

Hefezellen der Ansätze 6 - 9 zeigten wie erwartet keine Färbung, da es sich hierbei um Negativkontrollen handelt. Eine Interaktion von CDC5 und PSTVd konnte dagegen über die lacZ-Analysen in keinem der Versuchsansätze beobachtet werden (Ansätze 1 - 4), da auch hier eine Blaufärbung der Hefezellen vollständig ausblieb.

Zum Nachweis einer CDC5-PSTVd Interaktion über das Reportergen HIS3 wurden pro Transformationsansatz drei Hefekolonien auf TLH-Platten (WA-Platten Δ trp/leu/his) mit 10 mM, 30 mM und 50 mM Tri-Amino-Triazol ausgestrichen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die gleichen drei Hefekolonien auf die unterschiedlichen Platten aufgetragen wurden, die auch beim Nachweis von GAL4 Verwendung fanden.

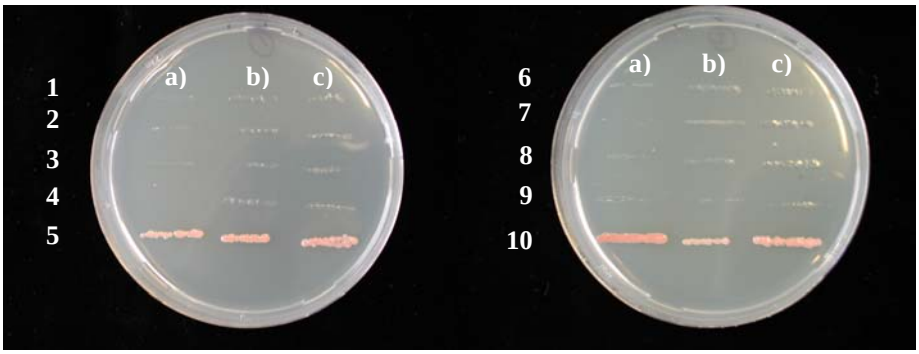


Abb. 3.37: Histidin-Analysen zum Nachweis einer Protein-RNA-Interaktion. Exemplarische Darstellung des Ausstrichs der Transformanden auf TLH-Platten mit 30 mM Tri-Amino-Triazol. **1 - 10:** Transformationsansätze nach Tabelle 3.5. **a) - c):** unterschiedliche Hefe-kolonien.

Nach Inkubation der Zellen bei 30°C für 2 Tage erfolgte die Auswertung der Ergebnisse über die Fähigkeit eines Zellwachstums auf Histidin-Mangelmedium.

Auch im Nachweisverfahren über HIS3 konnte bei den Transformanden von CDC5 und PSTVd (1 - 4) kein Wachstum beobachtet werden, was gegen eine Interaktion dieser Komponenten im Tri-Hybrid-System spricht. Wie erwartet zeigten auch die Negativkontrollen der Ansätze 6 - 9 kein Wachstum der Hefezellen. Analog zu den Ergebnissen der lacZ-Analysen ist ein deutliches Wachstum der Hefen in den Ansätzen 5 (Kontrolle Viroid) und 10 (Postitivkontrolle Tri-Hybrid-System) zu beobachten. In Bezug auf die variierenden 3AT-Konzentrationen konnte kein unterschiedliches Gesamtbild beobachtet werden. Auch bei Nutzung von TLH-Platten mit 10 mM und 50 mM 3AT war lediglich ein Zellwachstum bei den Transformationsansätzen 5 und 10 zu beobachten (nicht gezeigt).

Um zu prüfen, ob das Gesamtprotein von CDC5 für eine Interaktion mit PSTVd nötig ist, wurden zwei weitere CDC5-Konstrukte für Analysen im Tri-Hybrid-System hergestellt (Abb. 3.38).

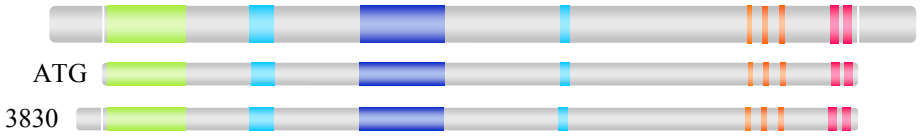


Abb. 3.38: Schematische Darstellung der verwendeten cdc5-cDNA Tri-Hybrid-Fragmente. ATG: 2980 bp. **3830:** 3121 bp. **Grün:** myb DNA-Bindedomäne. **Türkis:** KLS. **Blau:** TP reiche Domäne. **Orange:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung.

Für die folgenden Versuche zum Tri-Hybrid-System wurden zu den bisher bestehenden zwei weitere Kontrollen durchgeführt. Hierbei handelt es sich zum einen um die Proteine pSE1112 und pSE1111, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kuhl als Positivkontrolle des "Two-Hybrid-Systems" genutzt werden. Zum anderen wurde eine Co-Transformation des Hefestammes CG-1945 mit PSTVd/pRevRX und pSE111 durchgeführt, welche als Negativkontrolle des Viroides betrachtet wurde.

Tab. 3.6: Versuchsansätze II für das Tri-Hybrid-System

1.	PSTVd/pRevRX	+	3830/pACT2	Viroid-CDC5 Bindungsstudien
2.	PSTVd/pRevRX	+	ATG/pACT2	
3.	PSTVd/pRevRX	+	pSE1111	Negativkontrolle Viroid
4.	pRevR2	+	pADRevM10	Positivkontrolle Tri-Hybrid-System
5.	pRevR2	+	3830/pACT2	Negativkontrollen CDC5
6.	pRevR2	+	ATG/pACT2	
7.	pSE1112	+	pSE1111	Positivkontrolle Two-Hybrid-System

Die Durchführung der Versuche erfolgte wie bereits für die Konstrukte 2858, 1930, 1226 und 851 beschrieben.

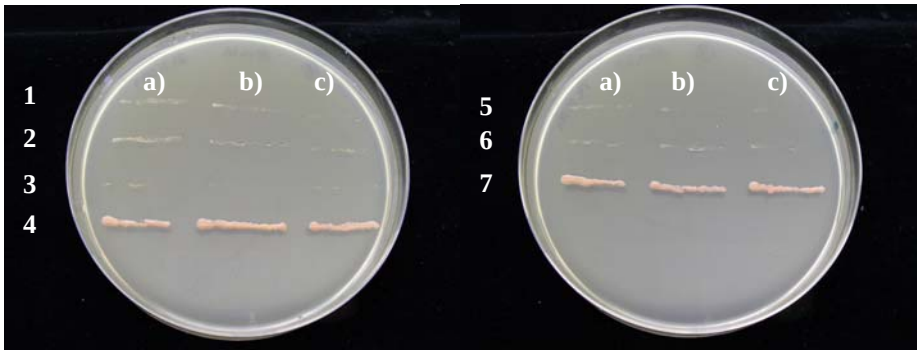


Abb. 3.39: Histidin-Analysen zum Nachweis einer Protein-RNA-Interaktion. Exemplarische Darstellung des Ausstrichs der Transformanden auf TLH-Platten mit 10 mM Tri-Amino-Triazol. **1 - 7:** Transformationsansätze nach Tabelle 3.6. **a) - c):** unterschiedliche Hefekolonien.

Wie in Abb. 3.39 zu erkennen, ist nur bei Transformationsansätzen der Positivkontrollen (4 und 7) ein Wachstum der Hefezellen zu erkennen. Eine Interaktion von CDC5 mit PSTVd ist auch bei Verwendung des Gesamtproteins im Tri-Hybrid-System nicht nachzuweisen.

3.3.1.1 Nachweis der Transkripte von cdc5 und PSTVd mittels Northern-Blot-Analysen

Herstellung der RNA-Hybridisierungssonden von PSTVd und cdc5

Da die zuvor postulierte Interaktion von CDC5 mit PSTVd im Tri-Hybrid-System nicht nachzuweisen war, sollte mit Hilfe von Kontrollversuchen untersucht werden, ob

1. die mRNAs der cdc5-Fragmente fehlerfrei synthetisiert werden,
2. die Transkripte von cdc5 sowie PSTVd gemeinsam in den Hefezellen auftreten,
3. die Translation der GAL4AD/CDC5 Fusionsproteine erfolgt.

Die für Northern-Blot-Analysen verwendeten Antisense RNA-Hybridisierungssonden von PSTVd und cdc5 wurden über *in vitro*-Transkription unter Verwendung von 2 µg restringierter Plasmid-DNA der Klone pRW58 (Viroid) und 2858/R3365-pGem (cdc5) hergestellt.

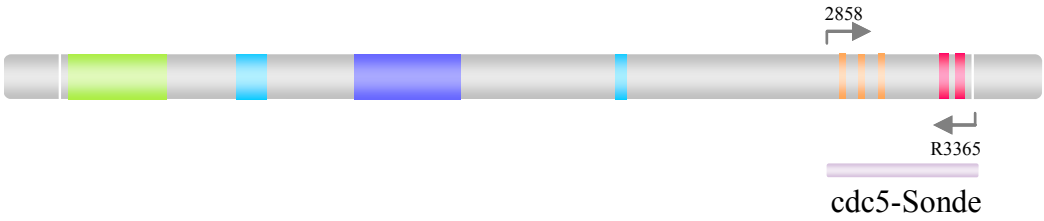


Abb. 3.40: Grafische Darstellung des Hybridisierungsbereiches der cdc5-Antisense-RNA-Sonde. Grün: myb DNA-Bindedomäne. **Türkis:** KLS. **Blau:** TP reiche Domäne. **Orange:** VEPS-Wiederholung. **Pink:** VTKT-Wiederholung.

Wie in Abb. 3.40 dargestellt, wurde der charakteristische 3'-Bereich zur Herstellung einer cdc5-Sonde ausgewählt, da jedes der cdc5 Tri-Hybrid-Konstrukte diesen beinhaltet.

1 µl der Dig-markierten Transkripte von PSTVd und cdc5 wurde anschließend zur Überprüfung der Transkriptlängen in einem 2 %igen denaturierenden MOPS-FA-Agarosegel analysiert. Durch "Spot-Blot"-Analysen wurde im Anschluss hieran für die PSTVd-Sonde eine Konzentration von 20 ng/µl, für die cdc5-Sonde eine Konzentration von 100 ng/µl ermittelt. Zum Nachweis der Transkripte von cdc5 und PSTVd wurde Gesamt-RNA der Transformanden 2858 a), 1930 a), 1226 a) und 851 a) nach dem Protokoll von Köhrer und Domdey (1992) extrahiert. 5 µl der isolierten Gesamt-RNA wurden zunächst zur Qualitätsprüfung auf einem denaturierenden 1,5 %igen MOPS-Formaldeyd-Agarosegel getestet (nicht gezeigt). Anschließend erfolgte die photometrische Reinheitsbestimmung der Proben (Verhältnis $Abs._{\lambda 260}/Abs._{\lambda 280}$), die mit Werten um 2,0 dem Optimum entsprachen. Jeweils 50 µg der extrahierten Gesamt-RNA der Hefetransformanden wurde für Northern-

Blot-Analysen in einem 1,5 %igen denaturierenden MOPS-FA-Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Da die extrahierten Proben keine Degradationen aufwiesen, sondern distinkte ribosomale Banden (Abb. 3.41 a)), und zudem die Mengenverhältnisse der Proben ein sehr homogenes Bild zeigten, erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond NX, Amersham) über Nacht mit 20x SSC.

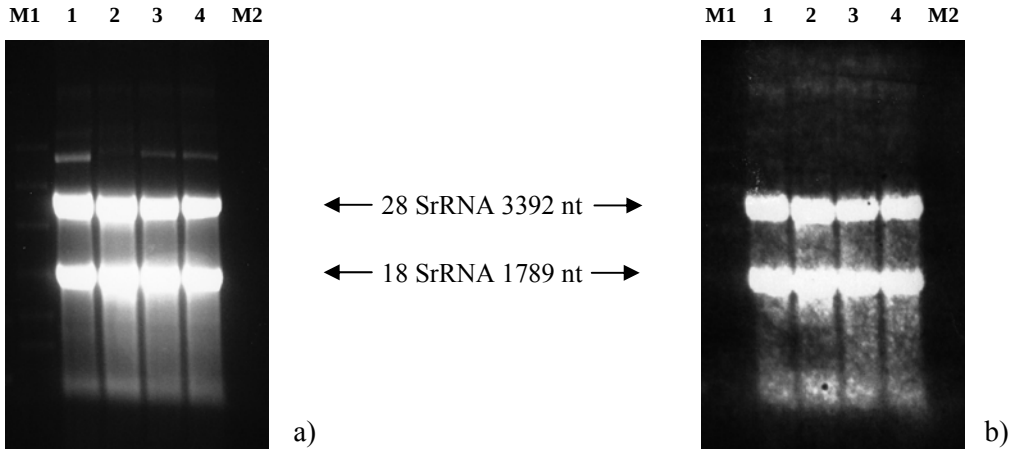


Abb. 3.41: Gelelektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA aus transformierten Hefezellen des Tri-Hybrid-Systems und Transfer auf eine Nylonmembran. a) Nachweis der Ethidiumbromid gefärbten RNA-Banden in einem in einem 1,5 %igen denaturierenden MOPS-Formaldehyd-Agarosegel. **b)** Nachweis der Ethidiumbromid gefärbten RNA-Banden auf einer Nylonmembran nach dem Transfer. **M1:** MBI-RNA Marker. **M2:** Dig-RNA-Marker III (Roche). **Spur 1:** Transformand 2858/PSTVd. **Spur 2:** Transformand 1930/PSTVd. **Spur 3:** Transformand 1226/PSTVd. **Spur 4:** Transformand 851/PSTVd.

Nach vollständigem Transfer der RNA-Banden auf die Nylonmembran (Abb. 3.41 b)) wurde die RNA durch "UV-Crosslinking" mit der Membran quervernetzt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.Die erste Hybridisierung der Hefe-RNA wurde mit Viroid-spezifischer Sonde bei 68°C über Nacht nach Angaben des "DIG Application Manual for Filter Hybridization" (Roche) durchgeführt.

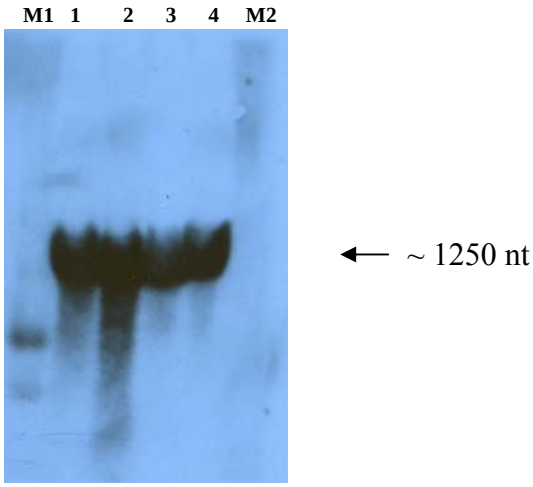


Abb. 3.42: Northern-Blot-Hybridisierung der Hefe-RNA aus Tri-Hybrid-Analysen mit PSTVd-spezifischer Sonde. M1: MBI-RNA Marker. **M2:** Dig-RNA-Marker III (Roche). **Spur 1:** Transformand 2858/PSTVd. **Spur 2:** Transformand 1930/PSTVd. **Spur 3:** Transformand 1226/PSTVd. **Spur 4:** Transformand 851/PSTVd.

Wie in Abb. 3.42 deutlich zu erkennen, konnten PSTVd-spezifische Hybridisierungssignale in erwarteter Größe von ca. 1250 nt in jeder Spur detektiert werden (Viroid 718 nt + RRE-RNA 242 nt + Vektorsequenz 324 nt).

Um eine Überlagerung der Hybridisierungssignale von PSTVd und cdc5 zu vermeiden, wurde die PSTVd-spezifische Sonde nach Angaben des "DIG Application Manual for Filter Hybridization" (Roche) durch "Strippen" von der Membran entfernt, welche anschließend in eine Hybridisierung mit cdc5-spezifischer Sonde eingesetzt wurde.

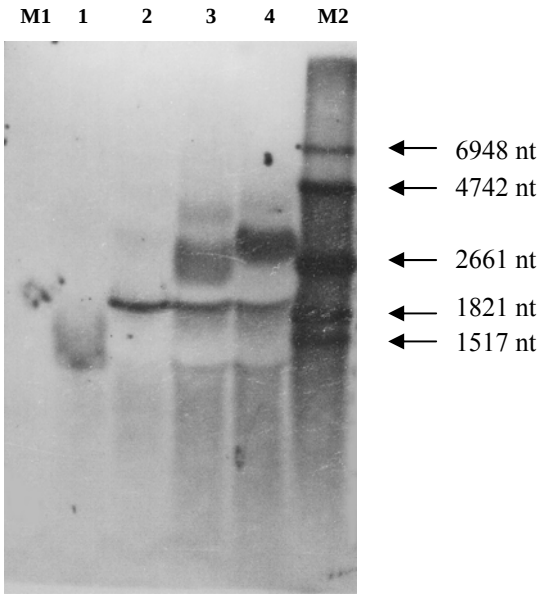


Abb. 3.43: Northern-Blot-Hybridisierung der Hefe-RNA aus Tri-Hybrid-Analysen mit cdc5-spezifischer Sonde. M1: MBI-RNA Marker. **M2:** Dig-RNA-Marker II (Roche). **Spur 1:** Transformand 2858/PSTVd. **Spur 2:** Transformand 1930/PSTVd. **Spur 3:** Transformand 1226/PSTVd. **Spur 4:** Transformand 851/PSTVd.

Die Höhe der in Abb. 3.43 dargestellten Hybridisierungssignale von Transformand 2858 (erwartet 1165 nt), 1226 (erwartet 2797 nt) und 851 (erwartet 3199) entsprachen den Erwartungen. Die zuvor postulierten Größen der Transkripte wurden unter Berücksichtigung folgender Komponenten berechnet: Transkript Gal4AD: 407 nt, Multiple Cloning-Site: 101 nt, Transkriptions Terminations Signal: 150 nt, sowie der Größen der cdc5-Fragmente. Keine eindeutigen Hybridisierungssignale sind hingegen in Spur 2 zu beobachten, was gegen eine Transkription der RNA des cdc5-Fragmentes 1930 (erwartet 2093 nt) sprechen würde. Des Weiteren kann in den Spuren 2, 3 und 4 eine deutliche schmale Bande mit einer Größe von ca. 1900 nt beobachtet werden, die aus Überlagerung durch ribosomale RNAs resultieren könnte.

3.3.1.2 RT-PCR zum Nachweis cdc5-spezifischer Transkripte

Um zu klären, ob das Konstrukt 1930 korrekt transkribiert wurde, sollten RT-PCR-Analysen aller cdc5-Konstrukte durchgeführt werden. Hierfür wurde zunächst die extrahierte Gesamt-RNA der transformierten Hefen (Abb. 3.41 a)) mit DNase behandelt, um PCR-Produkte

resultierend aus genomischer DNA zu vermeiden. Jeweils 2 µg DNase-verdaute RNA wurden anschließend für eine Erststrang-Synthese mit dem cdc5-spezifischen Primer R3365 eingesetzt. Die Zweitstrang-Synthese erfolgte unter Verwendung des Primers R3365 sowie der klonspezifischen Primer 2858, 1930, 1226 und 851. Zur Kontrolle eines vollständigen DNase-Verdaus der Proben wurde zusätzlich eine reine PCR mit DNase-verdauter RNA als Template durchgeführt, wofür wiederum die Primer-Kombinationen 2858-R3365, 1930-R3365, 1226-R3365 sowie 851-R3365 gewählt wurden.

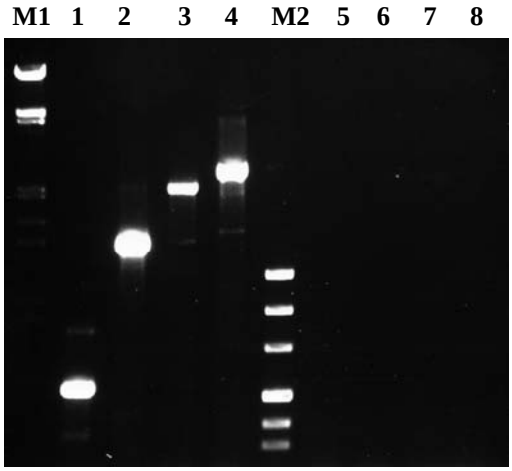


Abb. 3.44: RT-PCR zum Nachweis der cdc5-Transkripte aus den Hefetransformanden des Tri-Hybrid-Systems. Spuren 1 - 4: RT-PCRs**, Spuren 5 - 8:** Kontrollen des DNase-Verdaus über PCR. **M1:** DNA Molecular Weight Marker III (Roche). **M2:** DNA-Molecular Weight Marker VIII (Roche). **Spur 1 und 5:** 2858/R3365 (530 bp), **Spur 2 und 6 :** 1930/R3365 (1422 bp), **Spur 3 und 7:** 1226/R3365 (2126 bp), **Spur 4 und 8:** 851/R3365 (2494 bp).

Wie in Abb. 3.44 deutlich zu erkennen, sind alle cdc5-spezifischen Transkripte richtiger Größe in den Hefezellen nachweisbar. Da keine Banden in den Spuren der PCR-Kontrollen des DNase-Verdaus auftreten (5 - 8), kann davon ausgegangen werden, dass die erhaltenen Banden in den Spuren 1 - 4 nur von revers transkribierten cdc5-mRNAs stammen.

3.3.1.3 Hybridisierung von isolierter poly (A^+)-RNA mit cdc5-spezifischer Sonde

In Northern-Blot-Analysen der Hefetransformanden wurde nach Hybridisierung mit cdc5-spezifischer Sonde (Abb. 3.43) in den Spuren 2, 3 und 4 ein nicht identifiziertes Hybridisierungssignal in einer Größe von ca. 1900 nt detektiert, zudem konnte in der Spur von 1930 (Spur 2) kein eindeutiges Signal der erwarteten Größe beobachtet werden. Da es sich in beiden Fällen um eine mögliche Verdrängung der Hybridisierungssignale durch ribosomale RNAs handelt könnte, wurde eine mRNA-Isolation mit dem "NucleoTrap® mRNA Mini Kit" (Macherey-Nagel) durchgeführt, um eine eventuelle Überlagerung der mRNAs durch ribosomale RNAs in Northern-Blot-Analysen zu vermeiden. Für die mRNA-

Isolation wurden jeweils 100 µg Gesamt-RNA der Hefetransformanden aus den Tri-Hybrid-Experimenten eingesetzt. Jeweils 15 µl des Isolates (Endvolumen 30 µl) sowie jeweils 12 µg Gesamt-RNA der Hefetransformanden wurden in einem denaturierenden 1,5 %igen MOPS-FA-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C über Nacht mit cdc5-spezifischer Sonde.

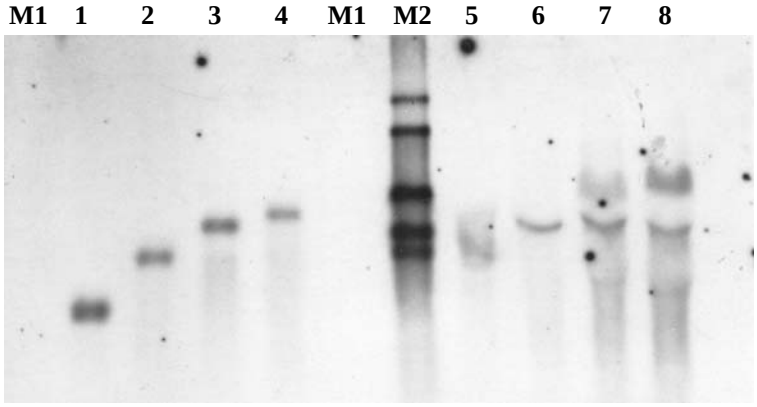


Abb. 3.45: Northern-Blot Analysen nach Hybridisierung von isolierter mRNA und Gesamt-RNA der Hefetransformanden mit cdc5-spezifischer Sonde. M1: DNA-Marker VII (Roche) **M2:** Dig-RNA-Marker II (Roche). **Spur 1:** mRNA von 2858/PSTVd. **Spur 2:** mRNA von 1930/PSTVd. **Spur 3:** mRNA von 1226/PSTVd. **Spur 4:** mRNA von 851/PSTVd. **Spur 5:** Gesamt-RNA von 2858/PSTVd. **Spur 6:** Gesamt-RNA von 1930/PSTVd. **Spur 7:** Gesamt-RNA von 1226/PSTVd. **Spur 8:** Gesamt-RNA von 851/PSTVd.

Über eine mRNA-Hybridisierung der unterschiedlichen Hefetransformanden mit cdc5-spezifischer Sonde konnten wie in Abb. 3.45 dargestellt, in allen Spuren (1 - 4) eindeutige Hybridisierungssignale ohne eine zusätzliche Bande bei 1900 nt detektiert werden. Auch 1930/PSTVd wies über diese Methodik ein deutliches Hybridisierungssignal auf, welches die Vermutung einer Verdrängung bzw. Überlagerung der Hybridisierungssignale durch ribosomale RNAs bestätigte, und somit auch das Auftreten des Signals bei 1900 nt erklärte. Auffällig ist jedoch ein Größenunterschied der Signale zwischen mRNA- und Gesamt-RNA-Hybridisierung von ca. 400 nt. Um zu klären, ob dieses auf ein unvorhergesehenes "Splicing" des Gal4-AD/cdc5-RNA-Konstruktes (Gal4-AD-RNA: 407 nt) beruhen könnte, sollten die "Fusions-Transkripte" über RT-PCR und folgender Southern-Blot-Hybridisierugn mit Gal4-AD-spezifischer Sonde nachgewiesen werden. Als Template hierfür diente DNase-behandelte Gesamt-RNA aus dem Nachweis der cdc5-Transkripte. Als Erststrang-Primer wurde für alle Reaktionen der cdc5-spezifische Revers-Primer R3365 eingesetzt. Die folgenden PCR-Reaktionen wurden mit zwei unterschiedlichen Primerkombinationen für alle vier Hefetransformanden durchgeführt. Zum einen wurde die Primerkombination Gal4-AD-FP / R3365 gewählt, worüber direkt die "Fusions-RNA" von Gal4-AD und cdc5 nachgewiesen

werden kann, zum anderen die Primerkombination Gal4-AD-FP und Gal4-AD-RP zur Darstellung der Gal4-AD-Transkripte.

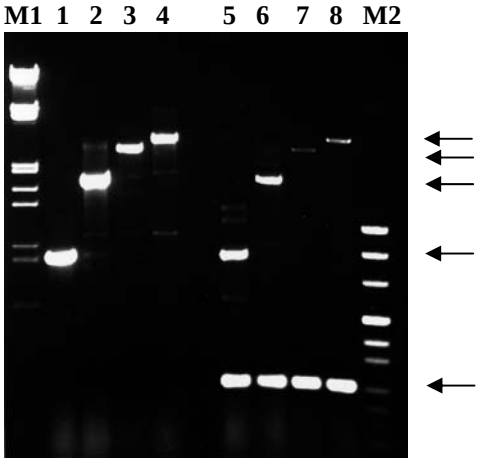


Abb. 3.46: Gelelektrophoretische Autrennung der RT-PCR-Fragmente zum Nachweis der Gal4/cdc5-RNAs. Spuren 1 - 4: 2.Strang-Synthese mit den Primern R3365 und Gal4-AD-FP. **Spuren 5 - 8:** 2.Strang-Synthese mit den Primern Gal4-AD-FP und Gal4-AD-RP. **M1:** DNA Molecular Weight Marker III (Roche). **M2:** DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche). **Spuren 1 + 5:** Hefetransformand 2858. **Spuren 2 + 6:** Hefetransformand 1930. **Spuren 3 + 7:** Hefetransformand 1226. **Spuren 4 + 8:** Hefetransformand 851.

Wie in Abb. 3.46 zu beobachten, wurden alle Transkripte der unterschiedlichen Gal4-AD/cdc5 cDNAs in erwarteter Größe von 824 bp (2858), 1752 bp (1930), 2456 bp (1226) und 2831 bp (851) amplifiziert. Auch Gal4-AD-Transkripte wurden in erwarteter Größe von 242 bp durch die Primer Gal4-AD FP und RP amplifiziert. Das Auftreten von Gal4/cdc5-spezifischen Banden in den Spuren 5 - 8 (Pfeile) resultiert aus der Verwendung des Erststrang-Primers R3365, welcher in niedriger Konzentration in die PCR-Reaktion überführt wurde.

Zur weiteren Bestätigung der oben erhaltenen Ergebnisse wurden die RT-PCR von dem in Abb. 3.46 gezeigten Gel über Nacht mit 20 x SSC auf eine Nylonmembran transferiert und anschließend mit einer Gal4-AD-spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Wie in Abb. 3.47 deutlich zu erkennen ist, konnten die Ergebnisse der RT-PCRs bestätigt werden, denn auch über Southern-Blot-Hybridisierung wurden die Gal4-AD-spezifischen Signale eindeutig detektiert.

Somit kann durch die hier dargestellten Ergebnisse ein "Splicing" der Gal4-AD/cdc5-RNAs ausgeschlossen werden, wodurch die Erklärung der "geshifteten" mRNA-Banden (Abb. 3.45) als Artefakt während der mRNA-Aufarbeitung oder Gelelektrophorese zu sehen ist.

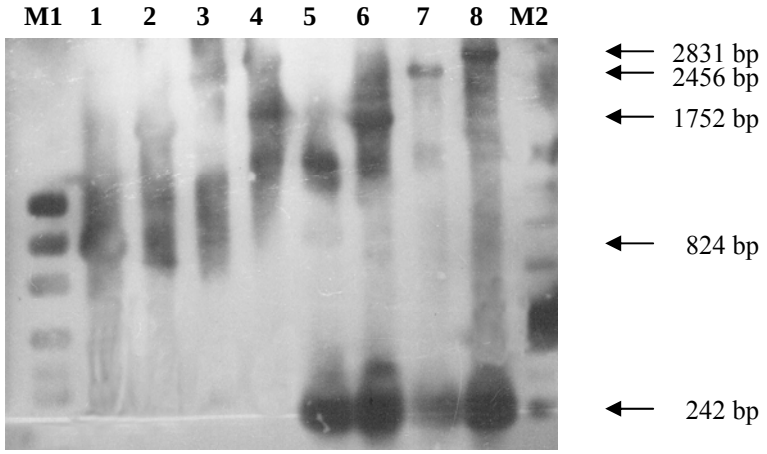


Abb. 3.47: **Southern-Blot-Hybridisierung der RT-PCR-Produkte zum Nachweis der Gal4-AD/cdc5-RNAs mit Gal4-AD-spezifischer RNA-Sonde. M1:** Dig-DNA-Marker VIII (Roche). **M2:** Dig-DNA-Marker VII (Roche). **Spuren 1 - 4:** 2.Strang-Synthese mit den Primern R3365 und Gal4-AD-FP. **Spuren 5 - 8:** 2.Strang-Synthese mit den Primern Gal4-AD-FP und Gal4-AD-RP. **Spuren 1 + 5:** Hefetransformand 2858. **Spuren 2 + 6:** Hefetrans-formand 1930. **Spuren 3 + 7:** Hefetransformand 1226. **Spuren 4 + 8:** Hefetransformand 851.

3.3.1.4 Nachweis der GAL4-AD/CDC5-Fusionsproteine über Western-Blot-Analysen

Da alle mRNAs der Gal4-AD/cdc5-Konstrukte vollständig transkribiert werden und zudem gemeinsam mit der PSTVd-RNA in den Hefetransformanden nachweisbar sind, musste geklärt werden, ob eine fehlende Interaktion von CDC5 und PSTVd im Tri-Hybrid-System auf Fehler während der Proteinsynthese zurückzuführen ist. Zum Nachweis der GAL4-AD/CDC5-Fusionsproteine sollten daher Western-Blot-Analysen durchgeführt werden. Die hierfür benötigten Gesamt-Protein-Extrakte der transformierten Hefezellen, der Kontrollen PSTVd/pADRevM10 und pRevR2/pADRevM10 sowie des reinen Hefestammes CG1945 wurden nach Angaben von Yaffe und Schatz (Basel) isoliert und jeweils 10 µl zur Überprüfung in einer SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt.

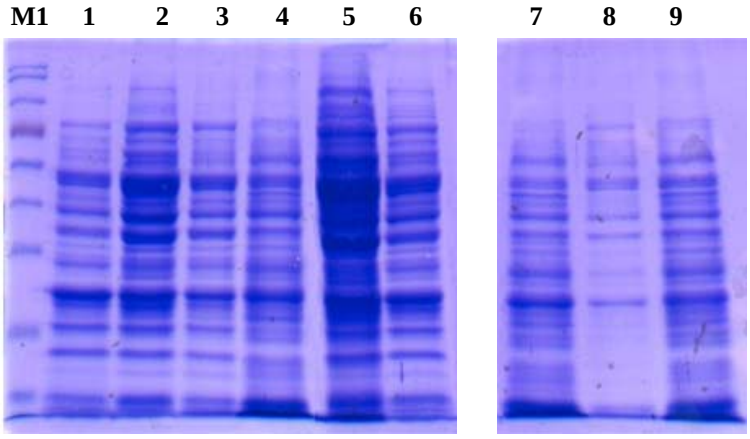


Abb. 3.48: SDS-PAGE der Gesamt-Proteinextrakte der Hefetransformanden. M: Prestained Protein Ladder (Fermentas). **Spur 1:** 2858/PSTVd. **Spur 2:** 1930/PSTVd. **Spur 3:** 1226/PSTVd. **Spur 4:** 851/PSTVd. **Spur 5:** 3830/PSTVd. **Spur 6:** ATG/PSTVd. **Spur 7:** Hefestamm CG1945. **Spur 8:** PSTVd/pADRevM10. **Spur 9:** pRevR2.

Nach einer Mengenabschätzung der in Abb. 3.48 dargestellten Isolate wurden die Gesamt-Protein-Extrakte in gleicher Konzentration einer SDS-PAGE unterzogen und über Nacht mittels Elektroblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Effizienz des Blotvorganges wurde im Anschluss hieran über Ponceau-S-Färbung überprüft.

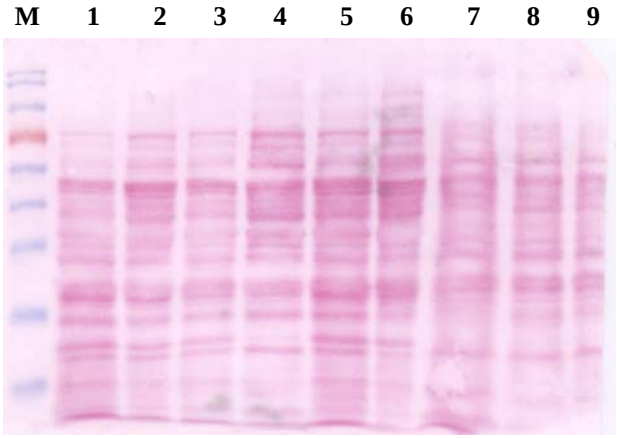


Abb. 3.49: Exemplarische Darstellung einer Ponceau-S-Färbung der Nitrocellulosemembran nach Elektroblot der Hefe-Gesamt-Protein-Extrakte. M: Prestained Protein Ladder (Fermentas). **Spur 1:** 2858/PSTVd 5 µl. **Spur 2:** 1930/PSTVd 2,5 µl. **Spur 3:** 1226/PSTVd 5 µl. **Spur 4:** 851/PSTVd 4 µl. **Spur 5:** ATG/PSTVd 5 µl. **Spur 6:** 3830/PSTVd 2 µl. **Spur 7:** PSTVd/pADRevM10 7,5 µl. **Spur 8:** pRevR2/pADRevM10 7,5 µl. **Spur 9:** Hefestamm CG1945 7,5 µl.

Wie in Abb. 3.49 dargestellt, wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Protein-Extrakte gleichmäßig auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Der Nachweis der GAL4-AD/CDC5-Fusionsproteine erfolgte anschließend über einen GAL4-AD-spezifischen monoklonalen Antikörper (Clontech); als sekundärer Antikörper wurde der Alkalische-Phosphatase-konjugierte Ziege-Anti-Maus-IgG (Dianova) verwendet. Die in Tab. 3.7 postulierten Proteingrößen wurden anhand ihrer Aminosäure-Sequenzen mit Hilfe der Lasergene Software "DNA-Star" berechnet. Das zu erwartende relative Molekulargewicht M_r von GAL4-AD wurde dabei nach dem "Matchmaker Monoclonal Antibodies User Manual" (BD Biosciences) mit ca. 24 kD gewertet.

Tab. 3.7: Postuliertes Molekulargewicht der GAL4-AD/CDC5-Fusionsproteine

cdc5-Fragment	Aminosäuren	Molekulargewicht in [kD]	GAL4AD/CDC5 in [kD]
2858	169	17,38	41,38
1930	467	51,94	75,94
1226	701	77,77	101,77
851	826	92,45	116,45
ATG	987	123,50	147,50
3830	1034	128,50	152,5

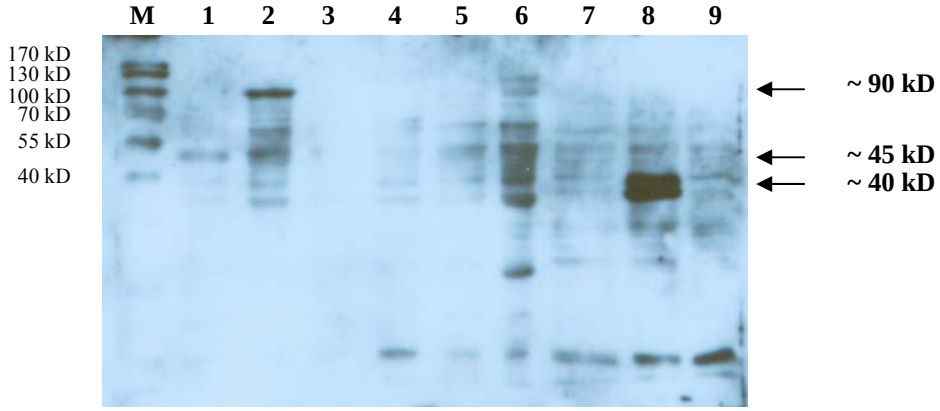


Abb. 3.50: Western-Blot-Analyse der Hefe-Gesamt-Protein-Extrakte zum Nachweis der GAL4-AD/CDC5-Fusionsproteine. **M:** Prestained Protein Ladder (Fermentas). **Spur 1:** 2858/PSTVd. **Spur 2:** 1930/PSTVd. **Spur 3:** 1226/PSTVd. **Spur 4:** 851/PSTVd. **Spur 5:** ATG/PSTVd. **Spur 6:** 3830/PSTVd. **Spur 7:** PSTVd/pADRevM10. **Spur 8:** pRevR2/pADRevM10. **Spur 9:** Hefestamm CG1945.

Über Western-Blot-Analysen konnten mittels Gal4-AD-spezifischen Antikörper eindeutige Hybridisierungssignale in den Spuren der Hefe-Transformanden 2858/PSTVd (Abb. 3.50, Spur 1, ca. 45 kD) und 1930/PSTVd (Spur 2, ca. 90 kD) nachgewiesen werden. Die im Verhältnis zum berechneten Molekulargewicht auftretenden Größenunterschiede der Fusionsproteine sind zu vernachlässigen, da die postulierten Molekulargewichte der CDC5-Proteinfragmente nicht dem relativen Molekulargewicht entsprechen. Eine Expression der GAL4-AD/CDC5-Fusionsproteine PSTVd/- 1226 (Spur 3), 851 (Spur 4), ATG (Spur 5) sowie 3830 (Spur 6) konnte bisher, wie auch in Abb. 3.50 zu erkennen, in keiner Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Des Weiteren zeigte die Positivkontrolle des Tri-Hybrid-Systems pRevR2/pADRevM10 (Spur 8) erwartungsgemäß eine Bande in Höhe von ca. 40 kD, wohingegen die GAL4-Aktivierungsdomäne in Hefezellen des im Tri-Hybrid-System positiv reagierenden Transformanden PSTVd/pADRevM10 (Spur 7) nicht nachweisbar war. Wie erwartet konnte darüber hinaus keine GAL4-AD-spezifisches Hybridisierungssignal in Zellen des untransformierten Hefestammes CG1945 detektiert werden (Spur 9).

3.3.2 "Gel-Shift"-Analysen

Im Tri-Hybrid-System konnte die von Dr. Ralf Werner (1995c) postulierte Interaktion des carboxyterminalen Bereiches von CDC5 mit PSTVd nicht bestätigt werden, obwohl zumindest im Fall der Hefe-Transformanden PSTVd/2858 und PSTVd/1930 alle benötigten Komponenten nachweisbar waren. Um eine mögliche Interaktion von CDC5 mit PSTVd in einer weiteren Versuchsanordnung zu überprüfen, wurden daher "Gel-Shift"-Analysen in Anlehnung an Gozmanova *et al.* (2003) und Li *et al.* (2004, modifiziert) durchgeführt.

Für diese Versuche wurden lediglich die CDC5-Proteinkonstrukte 2858 und 1930 verwendet, um einen direkten Vergleich mit dem Tri-Hybrid-System zu ermöglichen. Die Expression der ausgewählten CDC5-Proteinfragmente erfolgte unter Verwendung des pET-Expressionssystems (Novagen), welches eine anschließende Aufreinigung der Proteine über das MagneHis™ Protein Purification System erlaubte.

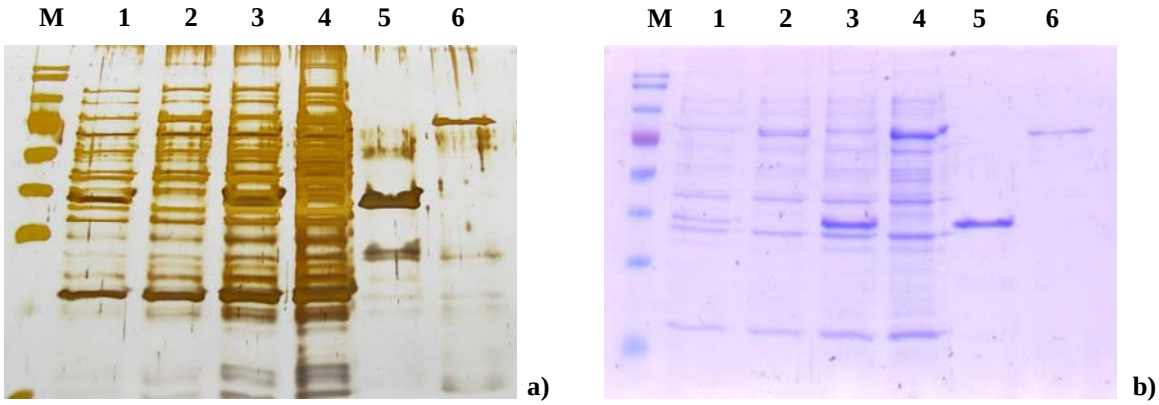


Abb. 3.51: SDS-PAGE der Proteinextrakte aus *E.coli*-Kulturen des Stammes Rosetta 5 Minuten und 3 Stunden nach Induktion der Expression mit IPTG sowie nach Aufreinigung der exprimierten Proteine über Ni-Chelat-Chromatogrphie. a) Silberfärbung. **b)** Coomassie-Blau-Färbung. **M:** Prestained Protein Ladder (Fermentas). **Spur 1:** 2858 (5 min nach Induktion). **Spur 2:** 1930 (5 min nach Induktion). **Spur 3:** 2858 (3 Std. nach Induktion). **Spur 4:** 1930 (3 Std. nach Induktion). **Spur 5:** 2858 nach Aufreinigung. **Spur 6:** 1930 nach Aufreinigung.

Wie in Abb. 3.51 dargestellt, konnte bereits 5 min. nach Induktion mit IPTG eine Expression der CDC5-Konstrukte beobachtet werden (Spuren 1 und 2), welche sich im Verlauf von 3 Stunden deutlich steigerte. Die aus 3-Stunden-Kulturen aufgereinigten Proteine zeigen nur über Silberfärbung des PAA-Gels leichte Verunreinigungen durch andere Proteine oder CDC5-spezifische Abbauprodukte (Spuren 5 und 6). Die erhaltenen Größen der aufgereinigten Proteine von ca. 40 kD (2858) und ca. 85 kD (1930) entsprechen den Größenberechnungen, die aus den zusätzlichen 74 Aminosäuren der pET 30a(+) Vektorsequenz resultieren. Die CDC5-Proteinfragmente wurden anschließend für ihre Verwendung in einer Konzentration von 100 ng/µl in "Binding-Buffer" nach Gozmanova *et al*. (2003) aufgenommen.

Die verwendete Viroid-RNA wurde aus PSTVd-inokulierter Gesamt-RNA der Tomatenkultursorte Rutgers über $LiCl_2$-Fällung isoliert (Abb. 3.52) und in einer Konzentration von 100 ng/µl in "Binding-Buffer" gelöst. Des Weiteren wurde die unter Kapitel 3.3.1.1 hergestellte PSTVd-Sonde, in "Antisense"-Orientierung, in den "Gel-Shift"-Experimenten verwendet, um eine mögliche Interaktion der PSTVd-Replikationsintermediate mit CDC5 aufzuzeigen.

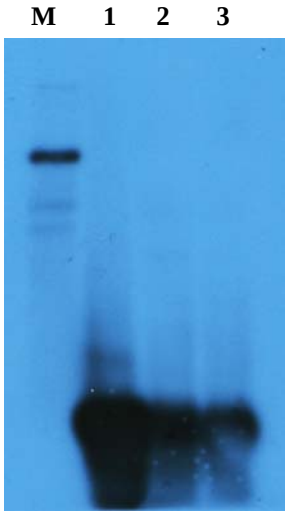


Abb. 3.52: Northern-Blot-Analyse nach Hybridisierung mit PSTVd-spezifischer Sonde der PSTVd-Isolate nach einer $LiCl_2$-Hochsalzfällung. M: Dig-RNA-Marker II (Roche). **Spur 1:** $LiCl_2$-Fraktion nach Hochsalzfällung (tRNAs + Viroid). **Spur 2:** Ribosomale Phase nach Hochsalzfällung. **Spur 3:** Gesamt-RNA einer infizierten Tomatenpflanze cv. Rutgers.

CDC5 und PSTVd wurden in äquimolaren Mengen 30 min. bei Raumtemperatur gemeinsam in "Binding-Buffer" inkubiert und anschließend in einem 1 %igen Agarosegel in 0,5 x TBE bei 60 V für 60 min. gelelektrophoretisch aufgetrennt. Da über eine $LiCl_2$-Fällung keine Trennung der "kleinen" RNAs (Viroid und tRNAs) erfolgt, war eine zusätzliche Zugabe von tRNAs als Kompetitor der Reaktion nicht notwendig, da diese bereits in ausreichender Konzentration über das Viroid-Isolat in der Reaktion vorlagen.

Nach Transfer der Reaktionen auf eine Nylonmembran über Nacht unter Verwendung von 20 x SSC, erfolgte die Hybridisierung der RNAs mit der PSTVd-spezifischen Sonde.

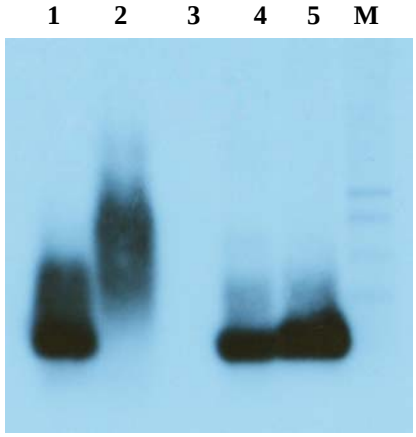


Abb. 3.53: Detektion der Gel-Shift-Analysen nach Hybridisierung mit PSTVd-spezifischer Sonde. M: Dig-RNA-Marker III (Roche). **Spur 1:** Gel-Shift-Experiment 2858 + PSTVd. **Spur 2:** Gel-Shift-Experiment 1930 + PSTVd. **Spur 3:** Gesamt-RNA-Extraktion gesund. **Spur 4:** Gesamt-RNA-Extraktion PSTVd-infiziert. Spur 5: aufgereinigte Viroid-RNA aus $LiCl_2$-Fällung.

Wie deutlich in Abb. 3.53 zu sehen ist, wurde PSTVd im Reaktionsansatz mit dem CDC5-Proteinfragment 1930 vollständig retardiert (Spur 2). Auch in Spur 1 (2858) ist eine leichte Verschiebung des PSTVd-spezifischen Hybridisierungssignals zu beobachten.
Darüber hinaus war auch unter Verwendung der Dig-markierten (+)-Strang-spezifischen PSTVd-Hybridisierungssonde, die somit der Replikations-Intermediat-Form des (-)-PSTVd entspricht, in beiden Reaktionsansätzen (Abb. 3.54 Spur 1 und 2) ein deutlicher "Shift" zu erkennen.

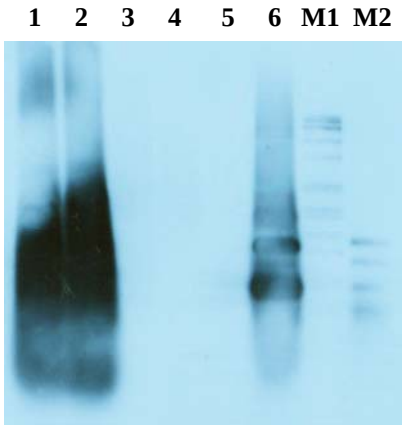


Abb. 3.54: Detektion der Dig-markierten PSTVd-spezifischen Sonde nach Gel-Shift-Experimenten. M1: Dig-DNA-Marker VII (Roche). **M2:** Dig-RNA-Marker III (Roche). **Spur 1:** Gel-Shift-Experiment 2858 + Dig-markierte PSTVd-Sonde. **Spur 2:** Gel-Shift-Experiment 1930 + Dig-markierte PSTVd-Sonde. **Spur 3:** Gesamt-RNA-Extraktion gesund. **Spur 4:** Gesamt-RNA-Extraktion PSTVd-infiziert. **Spur 5:** aufgereinigte Viroid-RNA nach $LiCl_2$-Fällung. **Spur 6:** Dig-markierte PSTVd-spezifische RNA-Sonde.

Im Gegensatz zum Tri-Hybrid-System konnte über "Gel-Shift"-Analysen eine eindeutige Interaktion des rekombinanten *Sl*CDC5 mit dem "Potato spindle tuber viroid" nachgewiesen werden. Da eine Retardierung des PSTVd nach Inkubation mit dem rekombinanten carboxyterminalen Bereiche des *Sl*CDC festzustellen war, ist zu schließen, dass dieser Bereich auch allein zur Bindung an PSTVd in der Lage ist.

4. Diskussion

In einer cDNA-Expressions-Bibliothek der Tomate wurde beim "Screening" mit PSTVd-spezifischen Sonde ein Protein gefunden, welches an das PSTVd gebunden hat. Der als pRW 19.5 bezeichnete λgt11-Klon beinhaltete eine Protein-Teilsequenz, welche schwache Homologie zum CDC5 von *Arabidopsis thaliana* aufwies.
Daher befasste sich die vorliegende Arbeit mit der Isolation und Charakterisierung des cdc5-homologen Gens, sowie des cdc5-homologen Promotors aus der Tomate. Darüber hinaus sollte die strukturelle Spezifität der Carboxy-terminalen Interaktion von pRW 19.5 mit dem "Potato spindle tuber viroid" im "Tri-Hybrid-System" analysiert werden. Da eine Interaktion die Funktion des myb-ähnlichen Transkriptionsfaktors beeinflussen könnte, sollte des Weiteren eine mögliche Rolle von *Sl*CDC5 in der Pathogenese von Viroiderkrankungen diskutiert werden.

4.1. Charakterisierung von CDC5-homologen Proteinen

Der Zellzyklus ist ein stark regulierter Prozess, in welchem komplexe Interaktionen von Kinasen, Cyclinen und Phosphatasen involviert sind (Inzé, 2005). Genetische Studien zur Regulation des Zellzyklus basierten vorwiegend auf der Analyse von Hefe-Mutanten, welche Defekte im Übergang von der späten G1-Phase zur S-Phase oder der Transition von G2-Phase in die M-Phase aufwiesen. Unter Verwendung von temperatursensitiven Mutanten der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* (*S.pombe*) konnten mehrere Gene identifiziert werden, welche an regulatorischen Prozessen des Zellzyklus beteiligt sind, zu welchen der myb-ähnliche Transkriptionsfaktor CDC5 zählt (Ohi *et al.*, 1994).

4.1.1 Struktur der CDC5-homologen Proteine

Strukturanalysen verschiedener Mitglieder der CDC5-Protein-Familie zeigten, dass untereinander eine sehr hohe Homologie vorherrscht, wodurch CDC5 als einer der am höchsten konservierten Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten beschrieben wird (Ohi *et al.*, 1998, Riechmann *et al.*, 2000).
N-terminal ist bei CDC5-homologen Proteinen eine myb-ähliche DNA-Binde-Domäne (DBD) lokalisiert, welche aus zwei vollständigen Myb-Wiederholungen besteht. Diese Wiederholungen beinhalten drei Tryptophan-Reste, welche durch Intervalle von 18 bis 19 Aminosäuren unterbrochen werden (Lipsick, 1996). Einzige Ausnahme bildet hier die dritte Position in der zweiten Wiederholung (R2), welche bei CDC5-Mitgliedern von einem

Tyrosin-Rest okkupiert wird. Die Präsenz von hydrophoben Aminosäure-Resten an diesen Positionen scheint für die DNA-Bindung sowie transkriptionelle Aktivierung von c-Myb ausschlaggebend zu sein (Kanai-Ishii *et al.*, 1994). Mutationsanalysen und Modellierungs-studien von c-Myb wiesen zudem darauf hin, dass die Myb-Wiederholungen eine Struktur ähnlich dem "Helix-Turn-Helix"-Motiv einnehmen, wobei jeder Tryptophan-Rest das hydrophobe Rückrad einer Helix bildet (Frampton *et al*., 1991; Gabrielsen *et al*., 1991). Der zweiten Wiederholung direkt anschließend befindet sich eine ca. 60 as lange Myb-ähnliche Wiederholung (MLR3), welche deutliche Unterschiede zur Myb-Wiederholung 3 von c-Myb aufweist. So ist zu beobachten, dass dem MLR3 die zuvor beschriebenen hydrophoben Aminosäuren fehlen (Ohi *et al*., 1998). Im Gegensatz zur hohen Identität im N-terminalen Bereich, nimmt die Homologie der CDC5-Proteine C-terminal ab. Auffällig ist jedoch das zahlreiche Auftreten von Thr-Pro di-Aminosäuren im mittleren Bereich, häufig gefolgt von Arg/Lys oder Xaa-Arg/Lys Aminosäure-Resten, wodurch die Aminosäure-Zielsequenz von Protein Serin/Threonin-Kinasen erfüllt wird (Hirayama & Shinozaki, 1996). Obwohl bisher nur für das humane (hCDC5) sowie *Lentinula edodes* (*Le*CDC5) CDC5 beschrieben (Liu *et al.*, 2003; Miyzaki *et al.*, 2004), konnten in dieser Arbeit zwischen der DBD und der TP-reichen Domäne bei allen bisher beschriebenen CDC5-Proteinen eine unterschiedliche Anzahl von Kern-Lokalisations-Sequenzen (NLS) identifiziert werden.

4.1.2 Funktion CDC5-homologer Proteine

Bereits 1994 wurde von Ohi *et al*. eine regulatorische Funktion des CDC5-Proteins von *S.pombe* im Zellzyklus postuliert (Ohi *et al.*, 1994). Über die Verwendung der temperatur-sensitiven Mutante cdc5-120 konnte gezeigt werden, dass Zellen in der G2-Phase mit einem DNA-Gehalt von 2n und einem einzelnen Nukleus arretierten. Da die CDC5-homologen Proteine von *Arabidopsis thaliana* (*At*CDC5; Hirayama & Shinozaki, 1996), *human* (*h*CDC5) und *Drosophila melanogaster* (*Dm*CDC5; Ohi *et al*., 1998) in der Lage sind, den Entwicklungs-Defekt der *S.pombe* Mutante cdc5-120 zu komplementieren, scheint analog der Struktur auch die Funktion bekannter CDC5-Proteine in Eukaryoten hoch konserviert zu sein (Ohi *et al*., 1998). Allerdings ist zu beobachten, dass *At*CDC5, *h*CDC5 sowie CEF1 (CDC5-Homolog von *Saccharomyces cerevisiae*) nicht in der Lage sind, eine $cdc5^{+}$ Null-Mutante von *S.pombe* zu komplementieren, sowie die Letalität von cef1Δ-Zellen aufzuheben (Ohi *et al*., 1998). Mögliche Erklärungen hierfür könnten C-terminale Sequenzunterschiede sein, wodurch die funktionelle Bedeutung dieses Bereiches für die Aktivität des Proteins deutlich wird (Ohi *et al*., 1998).

Über die Verwandtschaft zu c-Myb wurde davon ausgegangen, dass CDC5-Proteine ihre essentielle Funktion im Zellzyklus über transkriptionelle Regulation ausüben. Diese Hypothese konnte durch folgende Beobachtungen gestützt werden: 1. die Myb-Wiederholungen von *S. pombe* cdc5p, fusioniert an die Glutathion S-Transferase, binden an DNA-Zellulose (Ohi *et al.*, 1994); 2. die Myb-Wiederholung von *At*CDC5 zeigt hohe Affinität zu einer spezifischen DNA-Zielsequenz $^{5'}$ CTCAGCG $_{3'}$ (Hirayama & Shinozaki, 1996); 3. die Myb-Wiederholung des CDC5-Proteins von *Lentinula edodes* bindet an die Konsensussequnz $^{5'}$ GCAATGT $_{3'}$ (Miyazaki *et al*., 2004); 4. der C-Terminus des hCDC5, fusioniert an die GAL4-DNA Binde-Domäne, aktiviert die Transkription in einem Reporter-Assay (Bernstein & Coughlin, 1997) und 5. als DNA-Bindeprotein konnte CDC5 bisher exklusiv im Nukleus nachgewiesen werden (McDonald *et al.*, 1999). Von diesen Eigenschaften abgesehen, konnten keine Beweise erbracht werden, die zeigten, dass CDC5 auch *in vivo* als Transkriptionsfaktor fungiert (Burns *et al*., 1999).
McDonald *et al*. konnten 1999 beobachten, dass die CDC5-Proteine in *S. pombe* in einem 40S-Multiprotein-Komplex assoziiert sind. Diese Beobachtung war überraschend, da c-Myb und die meisten Vertreter Myb-verwandter Proteine als Monomere oder Heterodimere fungieren (Dai *et al*., 1996; Martin & Paz-Ares, 1997). Über Immunoaffinitäts-Aufreinigung konnten 10 der mit CDC5 assoziierten Proteine identifiziert werden. Hierzu zählen das *S.pombe* core snRNP-Protein D2, welches als Untereinheit aller splicosomalen snRNPs (U1, U2, U4/U6 und U5) gilt (Sumpter *et al*., 1992), sowie cwf8p, einem Ortholog des *S. cerevisiae* Prp19p, welchem eine essentielle Rolle während der pre-RNA Prozessierung zukommt (Cheng, *et al*., 1993; Cheng, 1994; Tsai *et al*., 1999). Die zusätzliche Beobachtung, dass CDC5-Immunopräzipitate U2, U5 und U6 snRNAs beinhalten, und dass CDC5Δ Zellen ein gestörtes prä-mRNA-Splicing aufweisen (Burns & Gould, 1999; McDonald *et al*., 1999; Tsai *et al.*, 1999), führten zu der Vermutung, dass CDC5 eine essentielle Komponente eines aktiven Spliceosoms sein könnte (McDonald *et al*., 1999). Genauere Analysen zeigten, dass CDC5 in *S.cerevisiae* mit dem Prp19p Protein interagiert, einer Komponente des NTC-Komplexes (Ohi & Gould, 2002; Ohi *et al*., 2005).

Der NTC-Komplex oder "the nineteen complex", welcher ebenfalls *in S.pombe* sowie in humanen Splicosom-Komplexen identifiziert wurde, scheint zwischen den Spezies hoch konserviert (Jurica & Moore, 2003) und übt seine Funktion im Übergang des inaktiven in ein aktives Spliceosomen aus (s. Abb. 4.1; Ohi *et al*., 2005).

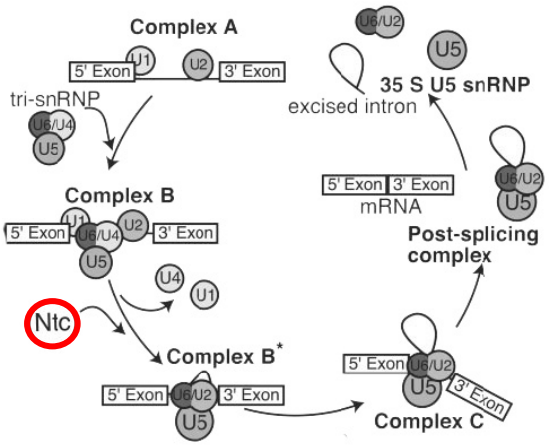


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der pre-mRNA Prozessierung (Ohi *et al.*, 2005).

Für verschiedene Genprodukte wie Dbf5p sowie Dbf3p aus *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass diese zum einen für die DNA-Replikation und zum anderen für den Zusammenbau eines snRNP unerläßlich sind, so dass eine duale Funktion der CDC5-Proteine nicht auszuschließen ist (Liu *et al*., 2003).

4.2 Das CDC5-Homolog der Tomate (*Sl*CDC5)

Über die Durchführung einer "5'-RACE", bei welcher Gesamt-RNA der Tomatenkultursorte Rutgers als "Template" eingesetzt und pRW 19.5 sequenzspezifische Primer verwendet wurden, konnte eine zusätzliche Sequenzinformation von 1,7 kb erhalten werden. Ein Vergleich der Gesamt-Sequenz mit der Datenbank auf Nukleotidebene (blastn) sowie auf Proteinebene (blastx) resultierte in einer 73 %igen Homologie zu einem myb-ähnlichen DNA-Bindeprotein aus *Arabidopsis thaliana*, welches aufgrund seiner Homologie zum cdc5 Gen aus *Schizosacccharomyces pombe* als *At*CDC5 bezeichnet wurde. Da auch die 3099 bp lange Tomaten-Sequenz eine 67%ige Homologie zu *S. pombe* aufwies, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem isolierten Gen um das cdc5-Homolog aus der Tomaten-kultursorte Rutgers handelte. Ein Vergleich der erhaltenen Sequenz von Rutgers mit den cDNA- und gDNA-Sequenzen der Kultursorten Goldkugel und "Micro-Tom" wies keine Unterschiede auf, wodurch im Folgenden von *Solanum lycopersicon* CDC5 (*Sl*cdc5) gesprochen werden kann. Eine Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz von *Sl*CDC5 zeigte, dass sich N-terminal (AS 5 - 104), analog der bisher identifizierten CDC5-Proteine, eine myb-DNA-Bindedomäne befindet. Ein Vergleich der myb-Wiederholungen R1 und R2 von *Sl*CDC5, *At*CDC5 und *Sp*CDC5 mit dem humanen c-Myb zeigt deutlich, dass unter den CDC5-Proteinen eine nahezu 100 %ige Homologie vorherrscht (Abb.4.2).

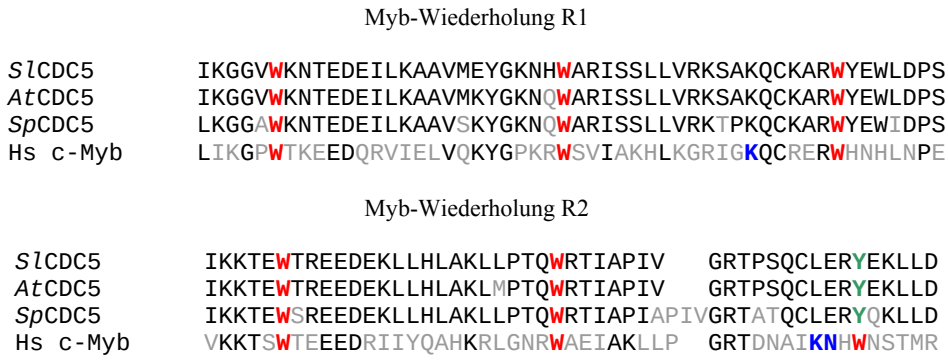


Abb. 4.2: Aminosäure-"Alignment" der Myb-Wiederholung R1 und R2. Schwarz: Identische Aminosäuren. **Grau:** Abweichende Aminosäuren. **Rot:** Konservierte Tryptophan-Reste von myb-DBD. **Grün:** CDC5-spezifischer Tyrosin-Rest. **Blau:** Aminosäuren, welche bei der Identifizierung von Zielsequenzen von c-Myb involviert sind.

Der für CDC5-Proteine charakteristische Tyrosin-Rest an der 3. Position von R2 konnte auch bei *Sl*CDC5 beobachtet werden. Für das humane c-Myb wurde diskutiert, dass die Aminosäuren Lysin an Position 39 in R1 sowie Lys / Asn an den Positionen 40 und 41 in R2 eine essentielle Rolle in der Erkennung einer DNA-Zielsequenz spielen. Wie in Abb. 4.1 allerdings zu erkennen, sind die korrespondierenden Aminosäuren in R2 bei CDC5-Proteinen durch Leu/Glu ausgetauscht, welches darauf schließen lässt, das Myb-Proteine und CDC5-Proteine unterschiedliche Zielsequenzen erkennen (Hirayama & Shinozaki, 1996). Obwohl die DBD der CDC5 Proteine untereinander eine über 90 %ige Homologie aufweisen, wurden für *At*CDC5 und *Le*CDC5 unterschiedliche DNA-Ziel-Sequenzen beschrieben. Diese Ergebnisse würden dafür sprechen, dass die myb-DBD nicht allein für eine sequenzspezifische Bindung an DNA ausreicht, sondern dass vielmehr C-terminal lokalisierte Regionen an dieser Reaktion beteiligt sind (Ohi *et al*., 1998). Somit können durch den Verfasser keine Rückschlüsse auf die mögliche Zielsequenz von *Sl*CDC5 durchgeführt werden. Darüber hinaus kann eine Funktion der Myb-Domäne in einer Protein-Protein-Interaktion nicht ausgeschlossen werden, denn obgleich der myb-Domäne in erster Linie die Funktion einer DNA-Bindedomäne zukommt, konnten bereits für mehrere Mitglieder der Myb-Familie eine Protein-Bindung in diesem Bereich beschrieben werden (Kanei-Ishii *et al*., 1994; Kanei-Ishii *et al*., 1997).

C-terminal der Myb-Domäne konnte auch bei *Sl*CDC5 ein Bereich mit drei Kern-Lokalisations-Sequenzen (NLS) beobachtet werden, darüber hinaus wurde eine zusätzliche NLS an Position AS 598 - AS 607 identifiziert, welche zuvor nicht beschrieben wurde. Eine genauere Sequenzanalyse von *At*CDC5, *Sp*CDC5 und *h*CDC5 zeigte, dass auch bei *At*CDC eine zusätzliche NLS an ähnlicher Position zu erkennen ist, nicht jedoch bei *Sp*CDC5 und *h*CDC5. Da auch *Solanum tuberosum* und *Nicotiana rustica* eine C-terminale NLS aufweisen,

ist möglicherweise davon auszugehen, dass diese nur im Pflanzenreich auftritt. Durch Liu *et al*., (2003) konnte für das humane CDC5 gezeigt werden, dass der CDC5-Transport in den Zellkern NLS-unabhängig erfolgt, und dass vielmehr die AS 1 - 160 für diese Reaktion erforderlich sind. Interessanter Weise konnte über BindN, einer Software zur Vorhersage von putativen RNA-Bindedomänen (RBD), eine 80 %ige Wahrscheinlichkeit für eine RNA-Protein-Interaktion in dem Bereich der N-terminalen NLS berechnet werden. Diese Beobachtung könnte die Hypothese unterstützen, dass auch beim *Sl*CDC5-Protein die N-terminalen NLS eine abweichende Funktion ausüben, wodurch der Kerntransport von CDC5 in Pflanzen möglicherweise über die C-terminale NLS erfolgt. Eine weitere Region mit hoher RNA-Affinität wurde am C-terminalen Ende des *Sl*CDC5-Proteins prognostiziert (AS 848 - 895), womit den VEPS-Wiederholungen, welche bisher nur bei *Sl*CDC5 und *St*CDC5 identifiziert werden konnten, eine mögliche Funktion in Pflanzen der Gattung *Solanaceae* zugewiesen werden könnte.

```
MRIMIKGGVWKNTEDEILKAAVMEYGKNHWARISSLLVRKSAKQCKARWY  50
EWLDPSIKKTEWTREEDEKLLHLAKLMPTQWRTIAPIVGRTPSQCLERYE 100
KLLDAACTKDENYDPNDDPRKLKPGEIDPNPESKPARPDPVDMDEDEKEM 150
LSEARARLANTRGKKAKRKAREKQLEEARRLASLQKRRELKAAGIDVRQR 200
KRKRRGIDYNAEIPFEKKPPPGFYDVTEEDRPVDQPKFPTTIEELEGERR 250
VDKEARLRKQDIARNKIAERQDAPTSILHANKLNDPEAVRKRSKLNLPAP 300
QIPDHELEAIAKIGIASDLIGGDELSEGNAATRALLANYAQTPQHAMTPM 350
RTPQRTPSTKQDAIMMEAENQRRLTQSQTPLLGGDNPLLHPSDFSGVTPK 400
KREVQTPNPLLTPSATPGATSLTPRIGMTPSRDSYGMTPKGTPMRDELRI 450
NEEMDMHSNAKLGQFNSKKELLSGLKSLPQPKNEYQIVIQQPPEENEEPE 500
EKIEEDMSDRIAREKAEEEAKRQALLRKRSKVLQRELPRPPIASLELIKS 550
SLMRADEDKSSFVPPTLIEQADEMIRKELVSLLEHDNTKYPLDEKPEKEK 600
KKGVKRKIVAEPAIEDFEEDELKEADGLIKDEAHFLRVAMGHESESLDEF 650
VEIHKATLNDIMYFPTRNAYGLSSVAGNMEKLAALQNEFENVKKKMDDDT 700
KKATKLEQKIKVLTNGYQMRAGKLWSQIESTFKKMDTAGTELECFRALQK 750
QEQLAASHRINNMWEEVQKQKELERTLQKRYGDLIADTQKIQHLMDEYRI 800
QDQMQEEVAAKNRALELAKAEMAEKDSVPSADDVEPSGTGQNSNTEENSA 850
SASHVPIEADVHVEPSGTNQCSNAEENSASIEADNVHVEPSGTSQCPIAE 900
ETSASISHDTTPRDVDGQVQVADVSTMDSEAISDHVPMEGQQNPGEESNT 950
VVTKTEDSTVAAGDVDVTKTDDSGVVAGDGEADPKNM.              988
```

Abb. 4.3: Abgeleitete Aminosäuresequenz des putativen CDC5-Proteins aus Tomate mit potentiellen Strukturelementen und Zielsequenzen für Protein-Kinasen. Grün unterstrichen: myb DNA-Bindedomäne. **Türkis unterstrichen:** NLS. **Blau unterstrichen:** TP-reiche Domäne. **Orange unterstrichen:** VEPS-Wiederholung. **Pink unterstrichen:** VTKT-Wiederholung. **Gelb hervorgehoben:** N-Myristoylierungs-Zielsequenzen. **Braun:** Zielsequenzen für die Casein Kinase II.

Neben der TP-reichen Domäne, welche als putative Transkriptions-Aktivierungs-Domäne anzusehen ist (Bernstein & Coughlin, 1997; Miyazaki *et al*., 2004; Lin *et al*., 2007 a), können bei *Sl*CDC5 verschiedene Zielsequenzen für Protein-Kinasen identifiziert werden. Hierzu zählen vor allem Zielsequenzen der Protein Kinase C (S/T-x-R/K) sowie der Casein Kinase II (S/T-xx-D/E), einer Serin/Threonin-Proteinkinase, welche z.B. die Aktivität des humanen c-Myb reguliert und zudem eine regulatorische Funktion im Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung ausübt. Da für *Solanum lycopersicum* (Bolle, 2004) sowie für *A.thaliana* (Lin *et al*., 2007a; Lin *et al*., 2007b) eine erhöhte Expression des CDC5-Proteins in stark proliferierenden Geweben beschrieben wurde, ist eine Beteiligung der genannten Enzyme bzw. Kinasen nicht verwunderlich. Insgesamt implizieren die vorigen Beobachtungen eine Regulation der CDC5-Aktivität durch Phosphorylierung, welche durch die Arbeiten von Boudrez *et al*. (2000) und Stukenberg *et al.* (1997) gestützt werden. So konnte zum einen gezeigt werden, dass das humane CDC5 mit NIPP1 interagiert, einer regulatorischen Untereinheit der Protein Phosphatase 1, einer Serin/Threonin Proteinphosphatase, welche mit Splicing-Faktoren co-lokalisiert, zum anderen wurde das CDC5-Protein von *Xaenopus laevis* über das Cyklin B-Cdc2 phosphoryliert.

Weiterhin können sieben N-Myristoylierungs-Zielsequenzen in der AS-Sequenz von *Sl*CDC5 beobachtet werden (siehe Abb. 4.3). Eine N-Myristolierung ist ein Prozess, bei welchem Myristinsäure an den N-terminalen Glycinrest von Proteinen angehängt wird. Das Anhängen dieser Fettsäure geschieht sehr spezifisch und ist eine wichtige posttranslationale Modifikation von Proteinen. Myristinsäure wird irreversibel an ein N-terminales Glycin durch die sogenannte N-Myristoyltransferase gekoppelt. Dieser Prozess vollzieht sich in der Regel direkt nach einer spezifischen Proteolyse, d.h., Enzyme spalten das Protein, so dass ein Peptid mit N-terminalem Glycin entsteht. N-Myristoylierung vermittelt schwache, reversible Interaktionen mit der Zellmembran und anderen Proteinen. Über die Myristoylierung lässt sich zusätzlich der Transport und die Lokalisation von Proteinen steuern. Bei Pflanzen spielt Myristoylierung zudem eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion bei der Reaktion auf Stress (Farazi *et al*., 2001). Myristoylierungs-Zielsequenzen konnten auf die DBD im N-terminalen Bereich, die Transaktivierungs-Domäne sowie auf den C-Terminus von *Sl*CDC lokalisiert werden. Da bisher nur N-terminale Myristoylierungen beschrieben wurden, können keine genauen Rückschlüsse auf eine regulatorische Funktion im zentralen sowie C-terminalen Bereich gezogen werden. Da allerdings für diese Bereiche Protein-Protein-Interaktionen beschrieben wurden, könnten die Myristoylisierungs-Motive hierin eine Rolle ausüben (Ajuh *et al*., 2001). Am C-Terminus des *Sl*CDC5 kann eine zweifache Wiederholung

des als VTKT bezeichneten Sequenzmotives beobachtet werden. Obwohl eine Zuordnung dieser Wiederholungen über die Literatur sowie über Protein-Datenbanken nicht möglich war, ist eine regulatorische Funktion nicht auszuschließen.

4.2.1 Identifikation und funktionelle Charakterisierung des *Sl*cdc5-Promotors

Zur Analyse des 5'-nichtkodierenden Bereiches und einer Zuordnung des putativen Promotors von *Sl*cdc5, wurde ein "5'-Genome-Walk" durchgeführt. Über diesen Weg wurden zusätzliche Sequenzinformationen von 3900 bp erhalten, welche durch dreifache Überprüfung bestätigt wurden. Da für diesen Bereich keine genaue Zuordnung eines Promotors erfolgen konnte, und zudem für keines der bekannten cdc5-Gene ein Promotor beschrieben war, wurden Primer-Extensions-Experimente zur Ermittlung des Transkriptionsstartpunktes durchgeführt. Wie in Abb. 3.20 zu erkennen, erfolgten in der Synthese des Dig-markierten Erststranges häufig Kettenabbrüche, welche als "Strong-Stops" bezeichnet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt unter anderem in Sequenzbereichen mit hohen GC-Gehalt sowie möglichen Sekundärstrukturen, wodurch die Synthese eines Stranges für die Reverse Transkriptase erschwert wird. Da somit keine Lokalisierung des Transkriptionsstartpunktes über Primer-Extensions-Experimente erfolgen konnte, wurden eine Vielzahl von reversen Transkriptionen mit unterschiedlich lokalisierten Primern durchgeführt. Damit konnte der Transkriptionsstart 231 Nukleotide stromaufwärts vom ATG-Startkodon entfernt identifiziert werden.

```
                3                   2                   1
TCATCCCATG CAAACAATCC ATTTTTAAAC CCAACAATGT ATTGATGGGC CAAAATAAGC CCAGCCCACC ACCCTAAACT  80
ATCCAAACCC AAATTCCAAA ACAAGTCGAA TTTGGAGAAC TCATCGAAAG GTTACACTAA TGGAATCTCA TCAGCTTCGG 160
AGCTAAAAAC CGATTCCGAA ATATCTTCTC GTCGGAGCGG AAAAACGCCG CCGCGGCCTG AATCTACTCT ACCGGAGACC 240
GTCATTTCTC GCCGGCGTAT AGATTTCAGC TCATTTACAG GCAAAATCTG AGGTATACTT ATCCAAAACC CTAGATTTCT 300
CGGAGTCTCC CTTGGGAGAC TGAAATAGTT AGCAAACATG                                           340
```

Abb. 4.4: Sequenz des putativen Promotorbereiches von *Sl*CDC5. Blau: ATG-Startkodon. **Rot:** Transkriptionsstartpunkt. **Lila:** mögliche Bereich der TATA-Box. **Türkis:** Nukleotide welche putative CAAT-Boxen darstellen.

Wie anhand der Sequenz in Abb. 4.4 zu erkennen, konnten nach Analyse des Transkriptions-startpunktes, welcher häufig mit einem Adenin assoziiert ist, verschiedene regulatorische Promotorelemente beobachtet werden. So ist von -34 bis -55 ein Bereich zu erkennen, welcher eine putative TATA-Box darstellen könnte. Drüber hinaus finden sich drei mögliche CAAT-Boxen, wobei vor allem CAAT-Box 1 in einem Bereich mit hohem GC-Gehalt liegt. Da der Promotor von *Sl*cdc5 deutliche Unterschiede zu Promotoren von Haushaltsgenen aufweist, z.B. durch die Anwesenheit einer TATA-Box sowie dem niedrigen Anteil von GC-Basenpaaren, zeigt der *Sl*cdc5-Promotor vielmehr Ähnlichkeit zu Promotoren regulierter

Gene (Lewin, 2006). Dieses entspricht auch der postulierten Funktion von CDC5-Proteinen, welche vor allem eine erhöhte Expression in teilungsaktiven Geweben aufweisen (Bolle, 2004; Miyazaki *et al*., 2004; Lin *et al*., 2007a). Funktionsanalysen des postulierten Promotors zeigten weiterhin, dass nur Protoplasten, welche mit dem Promotorkonstrukt 700 transformiert wurden, ein eindeutiges GFP-Leuchten aufwiesen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass ein "Core"-Promotor" (TATA und CAAT) nicht ausreicht und dass zusätzliche regulatorische Elemente an der Transkription des *Sl*cdc5 beteiligt sein müssen.

4.3 Analysen zur Bedeutung des C-terminalen Bereiches von *Sl*CDC5

Werner konnte im Rahmen seiner Arbeit verschiedene PSTVd-bindende Protein über das "Screening" einer λgt11-cDNA Expressions-Bibliothek identifizieren, zu welchen auch der Klon pRW 19.5 zählt (Werner, 1995c). Analysen der Proteinsequenz von pRW 19.5 zeigten, dass im C-terminalen Bereich des Proteins zwei auffällige Sequenzmotive (VEPS und VTKT) mit bisher unbekannter Funktion lokalisiert sind (Werner *et al*., 1995c). Da die Interaktion der Viroid-RNA mit *Sl*CDC5 über den C-terminalen Bereich nachgewiesen wurde, und bisher nur die Tomate als Viroid-Wirtspflanze die charakteristischen Motive im CDC5-Protein zeigte, stellte sich die Frage nach der Bedeutung des C-terminalen Bereiches für eine Interaktion und Infektion mit dem Viroid.

Erste Erkenntnisse sollten über eine sequenzielle Analyse von cdc5 bei verschiedenen Tomaten-Kultursorten erhalten werden, welche unterschiedlich starke Sympthome nach einer Viroid-Infektion aufweisen. Hierbei zeigte sich, das zwischen Rutgers und "Micro-Tom" als Viroid-sensitiven Kultursorten und Goldkugel als Symptom-tolerante Kultursorte keine Unterschiede in der gDNA- und cDNA-Sequenz vorliegen. Unterschiedliche Bindungs-affinitäten von PSTVd und hieraus resultierende Unterschiede in der Sensitivität der Kultursorten gegenüber dem Viroid sind somit unwahrscheinlich. Allerdings wurde beobachtet, dass das CDC5-Protein der natürlichen Wirtspflanze Kartoffel das VTKT-Motiv sogar in vierfacher Wiederholung aufwies (Bolle, 2004) und darüber hinaus *Nicotiana rustica* als Nicht-Wirt für PSTVd eine veränderte Aminosäuresequenz des VEPS-Motives zeigte. Aufgrund dieser Beobachtungen schien es trotz der identischen Tomaten-Sequenzen notwendig, die C-terminale Interaktion von *Sl*CDC5 mit PSTVd zu analysieren.

4.3.1 Bindungssstudien

Zur Analyse der *Sl*CDC5-PSTVd-Interaktion wurden Experimente nach dem Tri-Hybrid-Systhem von Putz *et al*., (1996) durchgeführt. Für eine genauere Einordnung der Interaktions

Domäne sowie für eine Charakterisierung notwendiger N-terminaler Strukturelemente wurden verschiedene Konstrukte von *Sl*CDC5 hergestellt.

Nach erfolgreicher Co-Transformation des Hefestammes CG-1945 mit den Versuchsansätzen erfolgte die Analyse einer Protein-RNA-Interaktion über den Nachweis von LacZ und His3. Wie in den Abb. 3.36 und 3.37 zu beobachten, konnte für die *Sl*CDC5-Konstrukte (2858, 1930, 1226 und 851) keine Interaktion über die verwendeten Nachweisverfahren beobachtet werden. Die verwendeten Positivkontrollen hingegen zeigten ein deutliches Wachstum der Hefezellen auf TLH-Platten sowie eine deutliche Blaufärbung im X-Gal-Nachweisverfahren. Auch bei Negativkontrollen konnte das erwartete Ergebnis beobachtet werden, denn sie zeigten kein Wachstum auf TLH-Platten und keine Blaufärbung im X-Gal-Test. Um auszuschließen, dass die Myb-DBD von *Sl*CDC5 für eine aktive Bindung an das Viroid benötigt wird, wurden zwei weitere Klone (ATG und 3830) hergestellt und im Tri-Hybrid-System getestet. Auch hier konnte ausschließlich ein Wachstum bei Zellen der Positivkontrollen beobachtet werden. Da diese Ergebnisse der durch "Ligand-Screening" gefundenen Interaktion von *Sl*CDC5 mit PSTVd widersprachen (Werner *et al*., 1995c), wurden zunächst Kontrollversuche zum Tri-Hybrid-System durchgeführt. Hierbei galt folgende Fragestellung: 1. wird die mRNA der cdc5-Konstrukte fehlerfrei synthetisiert? 2. treten die Transkripte von cdc5 und PSTVd gemeinsam in den transformierten Hefezellen auf? 3. erfolgt eine fehlerfreie Translation der GAL4AD/CDC5 Fusionsproteine?

Über Northern-Blot Analysen konnten die Transkripte von cdc5 fehlerfrei und gemeinsam mit der PSTVd-RNA in Gesamt-RNA Extrakten der transformierten Hefezellen nachgewiesen werden. Da auch die Fusionsproteine von 2858/GAL4AD und 1939/GAL4AD in richtiger Größe im Western-Blot detektiert wurden, konnte ein Fehler in der methodischen Anwendung des Tri-Hybrid-System ausgeschlossen werden. Um zu klären, ob der mangelnde Nachweis einer Interaktion auf das Tri-Hybrid-System zurück zu führen ist, oder ob die zuvor von Werner (1995c) postulierte Interaktion fehlinterpretiert worden war, wurden "Gel-Shift"-Analysen durchgeführt. Hierbei zeigte sich nun, dass PSTVd durch das Proteinfragment 1930 vollständig retardiert wird. 1930 entspricht der Sequenz des Klones pRW 19.5 und beinhaltet neben den charakteristischen C-terminalen Sequenzmotiven auch die C-terminal lokalisierte NLS von *Sl*CDC5. Sogar für 2858 konnte eine leichte aber nicht vollständige Verzögerung des Gellaufs von PSTVd festgestellt werden. Mit diesen Versuchen konnte zum einen eine Interaktion von *Sl*CDC5 mit PSTVd bewiesen werden, zum anderen scheint ein größerer Bereich als die letzten 169 AS des C-Terminus (höchstens 467 AS) für eine effektive Interaktion mit der RNA notwendig. Eine alleinige Funktion der zuvor postulierten RNA-

Bindedomäne von *Sl*CDC5 für eine Bindung des Viroides ist somit unwahrscheinlich. Allerdings kann eine Funktion der C-terminalen Motive für eine Proteinfaltung zur Bindung von PSTVd oder als regulatorische Einheit nicht ausgeschlossen werden. Diese Annahme würde zudem mit der Tatsache, dass *Nicotiana rustica* nicht mit PSTVd interagiert, korrelieren. Schließlich konnte bei *Nr*CDC5 eine Abwandlung der VEPS-Wiederholung von Kartoffel und Tomate beobachtet werden, wodurch möglicherweise eine Struktur zur Bindung von PSTVd unterbunden wird. Darüber hinaus könnte die vierfache Wiederholung des VTKT-Motives bei der natürlichen Viroid-Wirtspflanze Kartoffel eine noch stärkere Bindung zwischen CDC5 und PSTVd bewirken.

Warum ein Nachweis der *Sl*CDC5 / PSTVd-Interaktion im Tri-Hybrid-System nicht möglich war, muss derzeit ungeklärt bleiben. In Anbetracht der Tatsache, dass alle Komponenten für eine Interaktion nachweisbar waren, könnte dies am Organismus Hefe selbst liegen. Da Viroide mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren (Werner *et al*., 1995a,b; Daròs *et al*., 2002), ist auch eine Interaktion mit Proteinen der Hefe denkbar. Sollte das Viroid eine höhere Affinität zu einem Hefeprotein (z.B. CDC5) als zum *Sl*CDC5-Protein aufweisen, wäre eine Interaktion dieser Komponenten nicht mehr im Tri-Hybrid-System nachweisbar. So konnte Werner (1995b) zeigen, dass ribosomale Proteine effizient an PSTVd binden. Da diese im Überschuss in Hefezellen vorliegen, wäre eine Kompetition der Bindung an *Sl*CDC5 denkbar. Da allerdings PSTVd bereits erfolgreich im Hefe Tri-Hybrid-System eingesetzt wurde (Maniataki *et al*., 2003), kommt auch *Sl*CDC5 selbst als problematischer Faktor in Frage. Ob und inwiefern *Sl*CDC oder dessen Konstrukte eine native Konformation im Tri-Hybrid-System eingehen, oder ob *Sl*CDC5 aufgrund seiner Homologie zu den Hefe-Orthologen deren Funktion in der Hefe "nachahmt", wäre in weiteren Untersuchungen zu klären.

4.4 Putative Funktion des *Sl*CDC5 in der Pathogenese von Viroiderkrankungen

Da Viroide nicht für eigene Proteine kodieren, die für die Ausbildung von Krankheitssymptomen verantwortlich sein könnten, wurde deutlich, dass ihre Pathogenität nur aus einer Interaktion mit Wirtsfaktoren (HF) wie Proteinen oder Nukleinsäuren resultieren kann (Diener, 1979 a; Conejero *et al*., 1979; Semancik & Conejero, 1987). So war es von großem Interesse, dass ein Zellzyklus spezifischer Transkriptionsfaktor über seine Bindung an PSTVd isoliert werden konnte (Werner *et al*., 1995c). Nachdem darüber hinaus CDC5 eine Funktion im Aufbau eines aktiven Splicosomens zugewiesen wurde (McDonald *et al*., 1999), konnte eine Rolle der *Sl*CDC5/PSTVd-Interaktion in der Pathogenese von Viroiderkrankungen nicht ausgeschlossen werden. Gestützt wurde diese Annahme vor allem durch die hypothetische

Ähnlichkeit der Effekte einer Viroidinfektion und CDC5-Mutation auf das Wachstum und die Morphogenese des Wirtes. Die letalen Auswirkungen eines CDC5-"Knock-Out" auf den Wirt wurden für Hefe und kürzlich für *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Ohi *et al*., 1994; Lin *et al*., 2007 b), ob der Phänotyp einer CDC5-"Knock-Out" Pflanze ähnliche Eigenschaften wie eine Symptomausprägung nach PSTVd-Infektion in Tomate zeigt, könnte in weiterführenden Experimenten über RNAi untersucht werden.

Allerdings konnte durch diese Arbeit bereits gezeigt werden, dass eine Interaktion des CDC5-Proteins allein mit PSTVd keine direkte Auswirkung auf das Bild einer Viroidinfektion haben kann, schließlich variieren die Krankheitssymptome der unterschiedlichen Tomaten-kultursorten trotz des identischen CDC5-Proteins. Eine unmittelbare Beeinflussung der Funktion des CDC5-Proteins durch das Viroid scheint somit unwahrscheinlich. Auffällig ist jedoch, dass bisher analysierte Wirte für Viroide zum einen ein deutlich größeres CDC5-Protein, zum anderen identische Sequenzmotive im C-Terminus des Proteins aufweisen. Ob es sich hierbei um ein *Solanaceae*-typisches Merkmal handelt, muss in weiterführenden Versuchen geklärt werden.

Nach wie vor bleibt die Frage einer möglichen Funktion der durch Ligand-Blot (Werner, 1995c) und durch "Gel-Shift"-Analysen in dieser Arbeit nachgewiesenen Interaktion von *Sl*CDC mit PSTVd offen. Eine mögliche Erklärung könnte im Transport des Viroides in den Nucleus zu finden sein. Nachdem diese Hypothese bereits für viele Viroid-bindende Proteine, wie z.B. Virp1 beschrieben wurde (Maniataki *et al.*, 2003; Kalantidis *et al*., 2007), ist nicht auszuschließen, dass PSTVd mit *Sl*CDC5 interagiert und über die Interaktion in den Kern transportiert wird, wo auch CDC5 seine Funktion ausübt. Besonders attraktiv ist auch in Bezug auf das Viroid eine Funktion des *Sl*CDC5 als Transkriptionsfaktor. Entsprechend der Funktion von Transkriptionsfaktoren (TFII) der RNA-Polymerase II könnte *Sl*CDC5 die DNA-abhängige RNA-Polymerase an die Zielsequenz, d.h. in diesem Fall an das Viroid leiten, und die Initiation der Transkription durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II einleiten (Mühlbach & Sänger, 1979; Rackwitz *et al*., 1981; Spiesmacher *et al*., 1985; Schindler & Mühlbach, 1992).

Eine Überprüfung der aufgestellten Hypothesen stellt eine große Herausforderung dar, da aufgrund der Letalität von CDC5-"Knock-Out"-Mutanten nur eingeschränkt auf die Methodik von RNAi zurückgegriffen werden kann. Diese scheint allerdings unerlässlich, um *Sl*CDC5Δ mit einem gestörten Transport und/oder einer unterdrückten Transkription des Viroides zu assoziieren.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde durch molekularbiologische Analysen das cdc5-homologe Gen sowie der cdc5-spezifische Promotorbereich der Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) identifiziert und charakterisiert. Darüber hinaus konnte über "Gel-Shift"-Analysen mit rekombinant exprimierten CDC5 die zuvor von Werner (1995c) postulierte Interaktion von CDC5 mit dem "Potato spindle tuber viroid" (PSTVd) bestätigt werden.

Der partielle cDNA-Expressions-Klon pRW 19.5, welcher über die Interaktion des exprimierten Proteins mit PSTVd isoliert wurde, wies Homologie zu einem myb-ähnlichen Transkriptionsfaktor von *Arabidopsis thaliana* auf, der als Cell Division Cycle 5-Protein bezeichnet (CDC5) wurde. Von dieser Teilsequenz ausgehend, wurden über "RACE"-Analysen sowie "Genome-Walk"-Experimente die vollständigen cDNA- und gDNA-Sequenzen des putativen cdc5-Gens der Tomatenkultursorten Rutgers, Micro-Tom und Goldkugel erhalten, welche untereinander vollständig identisch waren. Da die abgeleitete Aminosäuresequenz von 988 AS, eine 73 %ige Homologie zu den beschriebenen CDC5-Proteinen von *Arabidopsis thaliana* und *Schizosaccharomyces pombe* aufwies und zudem CDC5-charakteristische Sequenzmotive beinhaltete, wurde das Protein als CDC5-Homolog der Tomate (*Sl*CDC5) bezeichnet. Zudem konnte, über die Verwendung von "Primer-Extension"-Experimenten und RT-PCR-Analysen, der *Sl*cdc5-spezifische Promotor identifiziert und über GFP-Expressionsanalysen in Mesophyllprotoplasten funktionell charakterisiert werden.

Ein Vergleich der bisher bekannten CDC5-Proteine zeigte, dass nur *Sl*CDC5 einen verlängerten C-Terminus aufwies, der zwei Sequenzwiederholungen, als VEPS und VTKT bezeichnet, enthielt. Da dieser Bereich für die Bindung an das Viroid von Bedeutung sein könnte, wurde der C-terminale Sequenzbereich des CDC5-Proteins von *Nicotiana rustica*, einer Viroid-Nicht-Wirtspflanze, analysiert. Die abgeleitete CDC5-Sequenz von *Nicotiana rustica* wies eine mit Tomate vergleichbare VTKT-Wiederholung auf, zeigte jedoch anstelle der VEPS-Wiederholung zweifach die Sequenz VESSET. Dagegen war bei der Kartoffel, als ursprünglichen Wirtspflanze für PSTVd, neben der VEPS-Wiederholung sogar viermal das VTKT-Motiv im CDC5-Protein zu finden. Um die mögliche Interaktion von PSTVd und *Sl*CDC5 analysieren zu können, wurden Tri-Hybrid-Studien durchgeführt. Obwohl alle Interaktionspartner gebildet wurden, was über Northern- und Western-Blot Analysen geprüft wurde, war eine Interaktion von PSTVd mit unterschiedlichen *Sl*CDC5-Konstrukten im Tri-Hybrid System nicht nachweisbar. Daher wurden "Gel-Shift"-Analysen mit rekombinanten *Sl*CDC5 und PSTVd durchgeführt. Hierbei ließ sich nachweisen, dass das 467 AS lange C-

terminale CDC5-Konstukt das Viroid vollständig retardierte, während das verkürzte 169 AS lange äußerste C-terminale Ende nur zu einer geringen Retardierung führte. Somit kommt auch dem N-terminal gelegenen Bereich außerhalb der auffälligen Sequenzmotive VTKT und VEPS eine Bedeutung für die Bindung von PSTVd zu.

6. Literaturverzeichnis

Ajuh, P., Sleemann, J., Chusainow, J. and Lamond, A.I. (2001). A direct interaction between the carboxyl-terminal region of CDC5L and the WD40 domain of PLRG1 is essential for pre-mRNA splicing. J. Biol. Chem. 276 (45): 42370 - 42381.

Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. Nature 431: 356 - 363.

Baumstark, T. and Riesner, D. (1995). Only one of four possible secondary structures of the central conserved region of potato spindle tuber viroid is a substrate for processing in a potato nuclear extract. Nucleic Acids Res. 23 (21): 4246 - 4254.

Bernstein, H.S. and Coughlin, S.R. (1997). Pombe Cdc5-related protein. A putative human transcription factor implicated in mitogen-activated signaling. J. Biol. Chem. 272: 5833 - 5837.

Baumstark, T., Schröder, A.R.W. and 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.

Bolle, N. (2004). Untersuchungen zur Bedeutung der carboxyterminalen Region des CDC5-Proteins für die Anfälligkeit verschiedener Pflanzenspezies gegenüber einer Viroid-Infektion. Diplomarbeit Universität Hamburg, 118 S.

Bonfiglioli, R.G., MCFadden, G.I. and Symons, R.H. (1994). In situ hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and cocnut cadang cadang viroid in the nucleus. Plant J. 6: 99 - 103.

Bonfiglioli, R.G., Webb, D.R. and Symons, R.H. (1996). Tissue and intra-cellular distribution of coconut cadang cadang viroid and citrus exocortis viroid determined by *in situ* hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. Plant J. 9: 457 - 465.

Boudrez, A., Beullens, M., Groenen, P., Van Eynde, A., Vulsteke, V., Jagiello, I., Murray, M., Krainer, A.R., Stalmans, W. and Bollen, M. (2000). NIPP1-mediated interaction of protein phosphatase-1 with CDC5L, a regulator of pre-mRNA splicing and mitotic entry. J. Biol. Chem. 275 (33): 25411 - 25417.

Branch, A.D. and Dickson, E. (1980). Tomato DNA contains no detectable regions complementary to Potato spindle tuber viroid as assayed by southern hybridization. Virology 104 (1): 10 - 26

Branch, A.D., Benefeld, B.J. and Robertson, H.D. (1985). Ultraviolet light-induced crosslinking reveals a unique region of local tertiary structure in potato spindle tuber viroid and HeLa 5 S RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6590 - 6594.

Branch, A.D. and Robertson, H.D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. Science 223: 450 - 455.

Burns, C.G., Ohi, R., Krainer, A.R. and Gould, K.L. (1999). Evidence that Myb-related CDC5proteins are required for pre-mRNA splicing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (24): 13789 - 13794.

Burns, C.G. and Gould, K.L. (1999). Connections between pre-mRNA processing and regulation of the eukaryotic cell cycle. In: Post-transcriptional regulation of gene expression and its importance tho the endocrine system. Chew, S.L., ed., Karger, Basel, Switzerland. 59 - 82.

Bussière, F., Ouellet, J., Cote, F., Levesque, D. and Perreault, J.P. (2000). Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. J Virol. 74 (6): 2647 - 2654.

Candresse, T., Gora-Sochacka, A. and Zagorski, W. (2001). Restoration of secondary hairpin II is associated with restoration of infectivity of a non-viable recombinant viroid. Virus Res. 75 (1): 29 - 34.

Cheng, S.C., Tarn, W.Y., Tsao, T.Y. and Abelson, J. (1993). PRP19: a novel spliceosomal component. Mol. Cell. Biol. 13: 1876 - 1882.

Cheng, S.C. (1994). Formation of the yeast splicing complex A1 and association of the splicing factor PRP19 with the pre-mRNA are independent of the 3' region of the Intron. Nucleic Acids Res. 22: 1548 - 1554.

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Mac Donald, R.J. and Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. Biochemistry 18: 5295 - 5299.

Chomczynski, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. Anal. Biochem. 201: 134 - 139.

Conejero, V., Picazo, I. and Segado, P. (1979). Citrus exocortis viroid (CEV): protein alterations in different hosts following viroid infection. Virology 97: 454 - 456.

Crick, F. (1979). Split genes and RNA splicing. Science 204: 264 - 271.

Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Hou, D.X., Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Takahashi, T. and Ishii, S. (1996). CBP as a transcriptional coactivator of c-Myb. Genes Dev. 10: 528 - 540.

Daròs, J.A. and Flores, R. (2002). A chloroplast protein binds a viroid RNA in vivo and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. EMBO J. 21 (4): 749 - 759.

Daròs, J.A., Elena, S.F., and Flores, R. (2006). Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. EMBO reports 7 (6): 593 - 598.

Dickson, E. (1981). A model for the involvement of viroids in RNA splicing. Virology 115: 216 - 221.

Diener, T.O. and Rymer, W.B. (1967). Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. Science 158 (799) :378 - 381.

Diener, T.O. and Rymer, W.B. (1969). Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. II. Characterization and partial purification. Virology 37 (3): 351 - 366.

Diener, T.O. (1971). Potato spindle tuber "virus". A replicating low molecular weight RNA. Virology 45: 411 - 428.

Diener, T.O. (1973). A method for the purification and reconcentration of nucleic acids eluted or extracted from polyacrylamid gels. Anal. Biochem. 55 (1): 317 - 320.

Diener, T.O. (1979a). Viroids and viroid diseases. Wiley and Sons ed., New York, USA. 1 - 252.

Diener, T.O. (1979b). Viroids: Structure and function. Science 205: 859 - 866.

Diener, T.O. (1981). Viroide. Spektrum der Wissenschaft 3: 53 - 61

Diener, T.O. (1987). Autonomous and helper-dependent small pathogenic RNAs of plants: viroids and satellites. Prog. Clin. Biol. Res. 234: 3 - 18.

Diener, T.O. (1989). Subviral pathogens of plants: the viroids. Ric. Clin. Lab. 19 (2): 105 - 128.

Diener, T.O. (1996). Origin and evolution of viroids and viroid-like satellite RNAs. Virus Genes 11 (2-3): 119 - 131.

Diener, T.O. (1999). Viroids and the nature of viroid diseases. Arch. Virol. Suppl. 15: 203 - 220.

Ding, B., Kwon, M.O., Hammond, R. and Owens R.A. (1997). Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. Plant J. 12: 931 - 936.

Dinter-Gottlieb, G. (1986). Viroids and virusoids are related to group I introns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (17): 6250 - 6254.

Eiras, M., Kitajima, E.W., Flores, R. and Daròs, J.A. (2007). Existence in vivo of the loop E motif in potato spindle tuber viroid RNA. Arch. Virol. 152 (7): 1389 - 1393.

Farazi, T.A., Waksman, G. and Gordon, J.I. (2001). The biology and enzymology of protein N-myristoylation. J. Biol. Chem. 276 (43): 39501 - 39504.

Flores, R., Di Serio, F., and Hernández, C. (1997). Viroids: the noncoding genomes. Semin. Virol. 8: 65 - 73.

Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M. and Diener, T.O. (1998). A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. Arch. Virol. 143 (3): 623 - 628.

Flores, R., Navarro, J.A., de la Pena, M., Navarro, B., Ambros, S. and Vera, A. (1999). Viroids with hammerhead ribozymes: some unique structural and functional aspects with respect to other members of the group. Biol. Chem. 380 (7-8): 849 - 854.

Flores, R., Randles, J.W., and Owens, R.A. (2003). Classification. In: . Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., and Semancik, J.S., ed. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 71 - 75.

Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A.E., Daròs, J.A. and Di Serio, F. (2005). Viroids and viroid-host interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 43: 117 - 139.

Frampton, J., Gibson, T.J., Ness, S.A., Doderlein, G. and Graf, T. (1991). Proposed structure for the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein based on model building and mutational analysis. Protein Eng. 4: 891 - 901.

Gabrielsen, O.S., Sentenac, A. and Fromageot, P. (1991). Specific DNA binding by c-Myb: evidence for a double helix-turn-helix-related motif. Science 253: 1140 - 1143.

Gago, M., de la Pena, M. and 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.

Garnsey, S.M. and Randles, J.W. (1987). Biological interactions and agricultural implications of viroids. In: Viroids an viroid-like pathogens. J.S. Semancik, ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 127 - 160.

Gast, F.U., Kempe, D. and Sänger H.L. (1998). The dimerization domain of potato spindle tuber viroid, a possible hallmark for infectious RNA. Biochem. 37 (40): 14098 - 14107.

Gómez, G. and Pallás, V. (2001). Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 910 - 913.

Gómez, G. and Pallás, V. (2004). A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with hop stunt viroid RNA. J. Virol. 78: 10104 - 10110.

Goodman, R.C., Nagel, L., Rappold, W., Klotz, G., and Riesner, D. (1984). Viroid replication: equilibrium association constant and comparative activity measurements for the viroid-polymerase interaction. Nucl. Acids Res. 12: 6231 - 6246.

Gozmanova, M., Denti, M.A., Minkov, I.N., Tsagris, M. and Tabler, M. (2003). Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of potato spindle tuber viroid RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1. Nucleic Acids Res. 31 (19): 5534 - 5543.

Gross, H.J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H., and Sänger, H.L. (1978). Nucleotid sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. Nature 273: 203 - 208.

Haas, B., Klanner, A., Ramm, K. and Sänger, H.L. (1988). The 7S RNA from tomato leaf tissue resembles a signal recognition particle RNA and exhibits a remarkable sequence complementary to viroids. EMBO J. 7: 4063 - 4074.

Hadidi, A., Cress, D.E., and Diener, T.O. (1981). Nuclear DNA from uninfected or potato spindle tuber viroid-infected tomato plants contains no detectable sequences complementary to cloned double-stranded viroid cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (11): 6932 - 6935.

Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature 404: 293 - 296.

Harders, J., Lukacs, N., Robert-Nicoud, M., Jovin, J.M. and Riesner, D. (1989). Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridization and vonfocal laser scanning microscopy. EMBO J. 8: 3941 - 3949.

Henco, K., Sänger, H.L. and Riesner, D. (1979). Fine structure melting of viroids as studied by kinetic methods. Nucleic Acids Res. 6 (9): 3041 - 3059.

Hernández, C. and Flores, R. (1992). Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave in vitro via hammerhead structures. Proc. Natl. Acad. Sci. 89 (9): 3711 - 3715.

Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1988). Improved silver stain procedure for staining in phastsystem development unit; staining of sodium dodecylsulfate gels. Electrophoresis 9: 28 - 32.

Hiddinga, H.J., Crum, C.J., Hu, J. and Roth, D.A. (1988). Viroid-induced phosphorylation of a host protein related to a dsRNA-dependent protein kinase. Science 241 (4864): 451 - 453.

Hirayama, T. and Shinozaki, K. (1996). A $cdc5^{+}$ homolog of a higher plant, Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 13371 - 13376.

Hollings, M., and Stone, O.M. (1970). Attempts to eliminate chrysanthemum stunt from chrysanthemum by meristem-tip culture after heat-treatment. Ann. Appl. Bio. 65: 311 - 315.

Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114: 193 - 197.

Hutchins, C.J., Keese, P., Visvader, J.E., Rathjen, P.D., McInnes, J.L. and Symons, R.H. (1985). Comparison of multimeric plus and minus forms of viroids and virusoids. Plant Mol. Biol. 4: 293 - 304.

Hutchins, C.J., Rathjen, P.D., Forster, A.C., and Symons, R.H. (1986). Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. Nucl. Acids Res. 14: 3627 - 3640.

Inzé, D. (2005). Green light for the cell cycle. EMBO 24 (4): 657 - 662.

Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R.S. and Ding, B. (2001). Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 1332 - 1334.

Itaya, A., Matsuda, Y., Gonzales, R.A., Nelson, R.S. and Ding, B. (2002). Potato spindle tuber viroid strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique genes in infected tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. 15 (10): 990 - 999.

Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A.R., Molina, C., Nelson, R.S. and Ding, B. (2007). A structured viroid RNA serves as a substrate for Dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. J. Virol. 81 (6): 2980 - 2994.

Jurica, M.S. and Moore, M.J. (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. Mol. Cell 12: 5 - 14.

Kalantidis, K., Denti, M.A., Tzortzakaki, S., Marinou, E., Tabler, M. and Tsagris, M. (2007). Virp1 is a host protein with a major role in potato spindle tuber viroid infection in *Nicotiana* plants. J. Virol. (epub ahead of print).

Kanei-Ishii, C., Yasukawa, T., Morimoto, R.I. and Ishii, S. (1994). c-Myb-induced trans-activation mediated by heat shock elements without sequence-specific DNA binding of c-Myb. J. Biol. Chem. 269: 15768 - 15775.

Kanei-Ishii, C., Tanikawa, J., Nakai, A., Morimoto, R.I. and Ishii, S. (1997). Activation of heat shock transcription factor 3 by c-Myb in the absence of cellular stress. Science 277: 246 - 248.

Kees, P. and Symons, R.H. (1985). Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4582 - 4586.

Ketting, H.F., Haverkamp, T.H., van Luenen, H.G. and Plasterk, R.H. (1999). Mut-7 of C. elegans, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. Cell 99 (2): 133 - 141.

Kiefer, M.C., Owens, R.A., and Diener, T.O. (1983). Structural similarities between viroids and transposable genetic elements. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6234 - 6238.

Kiss, T., Posfai, J. and Solymosy, F. (1983). Sequence homology between potato spindle tuber viroid an U3B snRNA. FEBS Lett. 163: 217 - 220.

Klaff, P., Gruner, R., Hecker, R., Sattler, A., Theissen, G. and Riesner, D. (1989). Reconstituted and cellular viroid-protein complexes. J. Gen. Virol. 70: 2257 - 2270.

Köhrer, K. and Domdey, H. (1991). Preparation of High Molecular Weight RNA. In: Methods in Enzymology Vol. 194, Guthrie, C. and Fink, G.R., eds., Academic Press, San Diego, London. 398 -401.

Kolonko, N., Bannach, O., Aschermann, K., Hu, K.H., Moors, M., Schmitz, M., Steger, G. and Riesner, D. (2006). Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts in the left terminal loop. Virology 347: 392 - 404.

Koltunow., A.M., and Rezaian, M.A. (1988). Grapevine yellow speckle viroid. Structural features of a new viroid group. Nucleic Acids Res. 16: 849 - 864.

Krüger-Lebus, S. and Potrykus, I. (1987). A simple and efficient method for direct gene transfer without electroporation. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 289 - 294.

Lewin, B. (2006). Essential Genes. Pearson Education Interantional, Inc., New Jersey USA.

Li, Y., Jiang, Z., Chen, H. and Ma, W.J. (2004). A modified quantitative EMSA and its application in the study of RNA-protein interactions. J. Biochem. Biophys. Methods 60: 85 - 96.

Lin, Z., Yin, K., Zhu, D., Chen, Z., Gu, H. and Qu, L.J. (2007a). *At*CDC5 regulates the G2 to M transition of the cell cycle and ist critical for the function of *Arabidopsis* shoot apical meristem. Cell Res. 17: 815 - 828.

Lin, Z., Yin, K., Wang, X., Liu, M., Chen, Z., Gu, H. and Qu, L.J. (2007b). Virus induced gene silencing of *At*CDC5 results in accelerated cell death in *Arabidopsis* leaves. Plant Phys. Biochem. 45: 87 - 94.

Lipsick, J.S. (1996). One billion years of Myb. Oncogene 13: 223 - 235.

Liu, L., Gräub, R., Hlaing, M., Epting, C.L., Turck, C.W., Xu, X.Q., Zhang, L. and Bernstein, H.S. (2003). Distinct Domains of Human CDC5 direct its nuclear import and association with the spliceosome. Cell Biochem. Biophys. 39: 119 - 131.

Loss, P., Schmitz, M., Steger, G. and 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: 710 - 727.

Maniataki, E., Martínez de Alba, A.E., Sägesser, R., Tabler, M. and 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. Erratum in: RNA 9 (4): 502.

Markarian, N., Li, H.W., Ding, S.W. and Semancik, J.S. (2004). RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. Arch. Virol. 149: 397 - 406.

Martin, C. and Paz-Ares, J. (1997). MYB transcription factors in plants. Trends Genet. 13: 67 - 73.

Martínez de Alba, A.E., Flores, R. and Hernández, C. (2002). Two chloroplastic viroids induce the accumulation of the small RNAs associated with post-transcirptional gene silencing. J. Virol. 76: 13094 - 13096.

Martínez de Alba, A.E., Sägesser, R., Tabler, M. and Tsagris M. (2003). A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA *in vitro* and *in vivo*. J. Virol. 77: 9685 - 9694.

Matthews, R.E.F. (1992). Fundamentals of Plant Virology. Harcourt, Brace, Jovanovich, eds., Academic Press, INC., New-York, USA. 1 - 835.

Matz, M., Shagin, D., Bogdanova, E., Britanova, O., Lukyanov, S., Diatchenko, L. and Chenchik, A. (1999). Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. Nucleic Acids Res. 27 (6): 1558 - 1560.

McDonald, W.H., Ohi, R., Smelkova, N., Frendewey, D. and Gould, K.L. (1999). Myb-related fission yeast cdc5p is a component of a 40S snRNP-containing complex and is essential for pre-mRNA splicing. Mol. Cell. Biol. 19 (8): 5352 - 5362.

Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke M.A. and Matzke, A.J. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. EMBO J. 19 (19): 5194 - 5201.

Miyazaki, Y., Jojima, T., Ono, T., Yamazaki, T. and Shishido, K. (2004). A cDNA homologue of *Schizosaccharomyces pombe* cdc5^{+} from the mushroom *Lentinula edodes*; characterization of the cDNA and its expressed product. Biochim. Biophys. Acta 1680: 93 - 102.

Mohamed, N.A. and Thomas, W. (1980). Viroid-like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocados. J. Gen. Virol. 46: 157 - 167.

Mühlbach, H.P. and Sänger, H.L. (1979). Viroid replication is inhibited by α-amanitin. Nature 278: 185 - 188.

Mühlbach, H.P. (1987). Viroide: Freie infektiöse RNA-Moleküle als Erreger von Pflanzenkrankheiten. Biologie in unserer Zeit 17 (3): 65 - 78.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473 - 479.

Navarro, J.A., Daròs, J.A. and Flores, R. (1999). Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid; identification in chloroplasts and characterization. Virology 253: 77 - 85.

Navarro, J.A., Vera, A. and Flores, R. (2000). A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. Virology 268: 218 - 225.

Negruti, J., Shillito, R., Potrykus, I., Biasini, G. aund Sala, F. (1987). Hybrid genes in the analysis of transformation condition. Plant Mol. Biol. 8: 363 - 373.

Nykänen, A., Haley, B. and Zamore, P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 107 (3): 309 - 321.

Oerke, E.C. (1994). Estimated crop losses due to pathogens, animal pests and weeds. In: Crop production and crop protection. Oerke, E.C., Dehne, H.W., Schonbeck, F. and Weber, A., ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. 72 - 741.

Ohi, R., McCollum, D., Hirani, B.L., Den Haese, G.J., Zhang, X., Burke, J.D., Turner, K. and Gould, K. (1994). The *Schizosaccharomyces pombe* cdc5^{+} gene encodes an essential protein with homology to c-Myb. EMBO J. 13 (2): 471 - 483.

Ohi, R., Feoktistova, A., McCann, S., Valentine, V., Look, A.T., Lipsick, J.S. and Gould, K.L. (1998). Myb-related *Schizosaccharomyces pombe* cdc5p is structurally and functionally conserved in eukaryotes. Mol. Cell. Biol. 18 (7): 4097 - 4108.

Ohi, M.D. and Gould, K.L. (2002). Characterization of interactions among the Cef1p-Prp19p-associated splicing complex. RNA 8: 798 - 815.

Ohi, M.D., Vander Kooi, C.W., Rosenber, J.A., Ren, L., Hirsch, J.P., Chazin, W.J., Walz, T. and Gould K.L. (2005). Structural and functional analysis of essential pre-mRNA splicing factor Prp19p. Mol. Cell. Biol. 25 (1): 451 - 460.

Owens, R.A. and Diener, T.O. (1982). RNA intermediates in potato spindle tuber viroid replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 113 - 117.

Owens, R.A., Steger, G., Hu, Y., Fels, A., Hammond, R.W. and Riesner, D. (1996). RNA structural features responsible for Potato spindle tuber viroid pathogenicity. Virology 222: 144 - 158.

Owens, R.A., Blackburn, M. and Ding, B. (2001). Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 905 - 909.

Owens, R.A. and Baumstark, T. (2007). Structural differences within the loop E motif imply alternative mechanisms of viroid processing. RNA 13 (6): 824 - 834.

Palukaitis, P. (1987). Potato spindle tuber viroid: investigation of the long-distance, intra-plant transport route. Virology 158: 239 - 241.

Papaefthimiou, I., Hamilton, A.J., Denti, M.A., Baulcombe, D.C., Tsagris, M. and Tabler, M. (2001). Replication potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. Nucleic Acids Res. 29: 2395 - 2400.

Pélissier, T. and Wassenegger, M. (2000). A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. RNA 6: 55 - 65.

Putz, U., Skehel, P. and Kuhl, D. (1996). A tri-hybrid system for the analysis and detection of RNA-protein interactions. Nucleic Acids Res. 24 (23): 4838 - 4840.

Qi, Y. and Ding, B. (2002). Replication of Potato spindle tuber viroid in cultured cells of tobacco and *Nicotiana benthamiana:* the role of specific nucleotides in determining replication levels for host adaptation. Virology 302 (2): 445 - 456.

Qi, Y. and Ding, B. (2003). Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. Plant Cell 15: 1360 - 1374.

Qi, Y., Pelissier, T., Itaya, A., Hunt, E., Wassenegger, M. and Ding, B. (2004). Direct role of a viroid RNA motif in mediating directional RNA trafficking across a specific cellular boundary. Plant Cell 16: 1741 - 1752.

Rackwitz, H.R., Rohde, W. and Sänger, H.L. (1981). DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. Nature 291: 297 - 301.

Randles, J.W., Steger, G. and Riesner, D. (1982). Structural transitions in viroid-like RNAs associated with cadang-cadang disease, velvet tobacco mottle virus, and *Solanum nodiflorum* mottle virus. Nucleic Acids Res. 10 (18): 5569 - 5586.

Randles, J.W. (1987). Coconut cadang-cadang. In: The viroids. Diener, T.O., ed. Plenum Press, New York, USA. 265 - 277.

Randles, J.W. (2003). Economic impact of viroid diseases. In: Viroids. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., and Semancik, J.S., ed. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 3 - 11.

Randles, J.W. and Rodriguez, M.J.B. (2003). Coconut cadang-cadang viroid. In: Viroids. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., and Semancik, J.S., ed. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 233 - 245.

Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A. and Baulcombe, D.C. (1999). Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. Plant Cell 11 (7): 1207 - 1216.

Raymer, W.B. and Diener, T.O. (1969). Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. I. Assay, extraction, and concentration. Virology 37 (3): 343 - 350.

Raymer, W.B. and O'Brien, M.J. (1962). Transmission of potato spindle tuber virus to tomato. Am. Potato J. 39: 401 - 408.

Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K. and Yu, G.L. (2000). Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. Science 290. 2105 - 2110.

Riesner, D., Henco, K., Rokohl, U., Klotz, Gl, Kleinschmidt, A.K., Domdey, H., Jank, P., Gross, H.J., and Sänger, H.L. (1979). Structure and structure formation of viroids. J. Mol. Biol. 133: 85 - 115.

Roberts, R.J. (1978). Intervening sequences excised in vitro. Nature 274: 530.

Sänger, H.L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H.J. and Kleinschmidt, A.K. (1976). Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA-molecules existing as highly base-paired rod-like structures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 3852 - 3856.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463 - 5467.

Sambrook, J. and Russel, DW (2001). Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Sping Harbor Laboratory Press, New York.

Sano, T., Candresse, T., Hommond, R.W., Diener, T.O. and Owens, R.A. (1992). Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10104 - 10108.

Schindler, I.M. and Mühlbach, H.P. (1992). Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication : a reevaluation. Plant Science 84: 221 - 229.

Schmitz, A. and Riesner, D. (1998). Correlation between bending of the VM region and pathogenicity of different Potato spindle tuber viroid strains. RNA 4: 1295 - 1303.

Schnölzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann, H. and Sänger, H.L. (1985). Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTVd). EMBO J. 4 (9): 2181 - 2190.

Schrader, O., Baumstark, T. and 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 mini circle. Nucleic Acids Res. 31 (3): 988 - 998.

Schröder, A.R. and Riesner, D. (2002). Detection and analysis of hairpin II, an essential metastable structural element in viroid replication intermediates. Nucleic Acids Res. 2002 30 (15): 3349 - 3359.

Semancik, J.S. and Conejero, V. (1987). Viroid pathogenesis and expression of biological acitvity. In: Viroids and Viroid-like pathogens. Semancik, J.S., ed., CRC Press, Boca Raton, Fl, USA. 71- 126.

Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H. and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. Cell 107 (4): 465 - 476.

Spiesmacher, E., Mühlbach, H.P., Schnölzer, M., Haas, B. and Sänger, H.L. (1983). Oligomeric forms of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and of its complementary RNA are present in nuclei isolated from viroid-infected potato cells. Biosci. Rep. 3: 767 - 774.

Spiesmacher, E., Mühlbach, H.P., Tabler, M. and Sänger, H.L. (1985). Synthesis of (+) and (-) RNA molecules of potato spindle tuber viroid (PSTVd) in isolated nuclei and its impairment by transcription inhibitors. Biosci. Rep. 5: 251 - 265.

Steger, G., Hofmann, H., Fortsch., J., Gross, H.J., Randles, J.W., Sänger, H.L. and 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 (3): 543 - 571.

Steger, G. and Riesner, D. (2003). Molecular characteristics. In: Viroids. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., and Semancik, J.S., ed. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 15 - 29.

Stukenberg, P.T., Lustig, K.D., McGarry, T.J., King, R.W., Kuang, J. and Kirschner, M.W. (1997). Systematic identification of mitotic phosphoproteins. Curr. Biol. 7: 338 - 348.

Sumpter, V., Kahrs, A., Fischer, U., Kornstadt, U. and Luhrmann, R. (1992). *In vitro* reconstitution of U1 and U2 snRNPs from isolated proteins and snRNA. Mol. Biol. Rep. 16: 229 - 240.

Symons, R.H. (1981). Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. Nucleic Acids Res. 9: 6527 - 6537.

Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. and Zamore, P.D. (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. Genes Dev. 17 (1): 49 - 63.

Terribilini, M., Lee, J.H., Yan, C., Jernigan, R.L., Honavar, V. and Dobbs, D. (2006). Prediction of RNA binding sites in proteins from amino acid sequence. RNA 12: 1450 - 1462.

Tsagris, M., Tabler, M., Mühlbach, H.P. and Sänger, H.L. (1987). Linear oligomeric potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs are accurately processed in vitro to the monomeric circular viroid proper when incubated with a nuclear extract from healthy potato cells. EMBO J. 6 (8): 2173 - 2183.

Tsai, W.Y., Chow, Y.T., Chen, H.R., Huang, K.T., Hong, R.I., Jan, S.P., Kuo, N.Y., Tsao, T.Y., Chen, C.H. and Cheng, S.C. (1999). Cef1p is a component of the Prp19p-associated complex and essential for pre-mRNA splicing. J. Biol. Chem. 274: 9455 - 9462.

Vaistij, F.E., Jones, L. and Baulcombe, D.C. (2002). Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. Plant Cell 14 (4): 857 - 867.

Van Houdt, H., Bleys, A. and Depicker, A. (2003). RNA target sequences promote spreading of RNA silencing. Plant Physiol. 131 (1): 245 - 253.

Visvader, J.A. and Symons, R.H. (1985). Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and correlation of sequence with pathogenicity. Nucleic Acids Res. 13: 2907 - 2920.

Vogt, U., Pélissier, T., Putz, A., Rzvi, F., Fischer, R. and Wassenegger, M. (2004). Viroid-induced RNA silencing of GFP-viroid fusion transgenes does not induce extensive spreading of methylation or transitive silencing. Plant J. 1: 107 - 118.

Wassenegger, M., Heines, S., Riedel, L. and Sänger, H.L. (1994). RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. Cell 76: 567 - 576.

Wassenegger, M., Spieker, R.L., Thalmeir, S., Gast, F.U., Riedel, L. and Sänger, H.L. (1996). A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. Virology 226: 191 - 197.

Werner, R., Mühlbach, H.P. and Guitton, M.C. (1995a). Isolation of viroid-RNA-binding proteins from an expression library with nonradioactive-labeled RNA probes. Biotechniques 19 (2): 218 - 221.

Werner, R., Guitton, M.C. and Mühlbach, H.P. (1995b). A tomato cDNA encodes a protein homologous to the eukaryotic ribosomal protein S25. Plant Physiol. Biochem. 33 (3): 373 - 377.

Werner, R. (1995c). Isolierung und Charakterisierung viroidbindender Proteine der Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Dissertation. Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

Wimberly, B., Varani, G. and Tinoco, I., Jr. (1993). The conformation of loop E of eukaryotic 5 S ribosomal RNA. Biochemistry 32: 1078 - 1087.

Wolff, P., Gilz, R., Schumacher, J. and Riesner, D. (1985). Complexes of viroids with histones and other proteins. Nucleic Acids Res. 13 (2): 355 - 367.

Woo, Y.M., Itaya, A., Owens, R.A., Tang, L., Hammond, R.W., Chou, H.C., Lai, M.M.C. and Ding, B. (1999). Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. Plant J. 17: 627 - 635.

Wu, R. (1994). Development of the primer-extension approach: a key role in DNA sequencing. Trends Biochem. Sci. 19: 429 - 433.

Yaffe, M.P. and Schatz, G. (1984). Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (15): 4819 - 4823.

Zaitlin, M., Niblett, C.L., Dickson, E. and Goldberg R.B. (1980). Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by solution and filter hybridization. Virology 104: 1 - 9.

Zhao, Y., Owens, R.A. and 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. Virol. 82: 1491 - 1497.

Zhong, X., Leontis, N., Qian, S., Itaya, A., Qi, Y., Boris-Lawrie, K. and Ding, B. (2006). Tertiary structural and functional analyses of a viroid RNA motif by isostericity matrix and mutagenesis reveal its essential role in replication. J Virol. 80 (17): 8566 - 8581.

Zhong, X., Tao, X., Stombaugh, J. Leontis, N. and Ding, B. (2007). Tertiary structure and function of an RNA motif requied for plant vascular entry to initiate systemic trafficking. EMBO J. 26 (16): 3836 - 3846.

Zhu, Y., Qi, Y., Xun, Y., Owens, R. and Ding, B. (2002). Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. Plant Physiol. 130: 138 - 146.

7. Anhang

7.1 Sequenzen

7.1.1 Sequenzen der Tomate

7.1.1.1 DNA-Sequenz des *Sl*cdc5 und flankierende Bereiche

```
TTTGTAAGTA GTAAAATATT CATCCTTCCA TTCCAATCTG GTTTTCTTGT TTGCCTTTTA GGATGCTAGT TTACAAATTG   80
TTGTAGTAAA ATCATGGATA AATTCGTATT TAAGTATGAT TTAGAAAATT CAGAAATTAT ATGAAAAATT CTGACATTGG  160
AAGTATTTTC ATCTCAAAAT ACAAAAATAG ATATGGTTGA CTTGAAAAGT CACAATCTTT TGAAACAGAG AGTAGTTATT  240
CCGTCTTCTA CAAGGGCCTC CTTTTGATTT TTTTTCTACG TTAATGTATC TATTTCTTTC TCTAGGTGAT CTGCCTACCC  320
TCTTACAATT TAAGTGTTAC TTTTTATAAT TGAATAGTTT ATATGTGCTT ATTTGAATCA TTATGGATCC TTGGATGTTT  400
CATAATAGTC ATGTATGGAA AGTACAGCCG CGGCTACTCA AAATATTGGT TTCCATTCAA GCATGGCTTG AACCCAACAT  480
AAAGTGCATG AAAGCTTACT GATGCTTCAA CCCATATCTA CCTCTGTCCA CTTCTATGAG TTCTTTTTCA AGTTCTGCAC  560
TTTTATTCTT TTGGTAATGA ATGAGTTCTA TGGTCAACCT TGGGGGTCTT TCAAGGGTTA CTGGAACTAA TATATAATGT  640
AACCAATCAT CGGAAATTTG TGCCTGAAGA AGTTTTTAGC GCCTAAGAAT TTGTGCTTGA AGGTTTTCCT TTAGCTGAAC  720
CTCCTTTGTT TAAGACTTCA ATCTCTTTGG TGATATGCTC TGTTTCTAAG TACTTGATAC CAAAAGAAGA GACTCTGTAT  800
TGCAACGAGT AATGCTKCAT AAGTGCAAGA TAAGTAGATA GCAGCAGTAA TTCACCGGAT CTTCCGTCTA CAAAAATAGA  880
AGAGGTGTAT GTTAAGGTTC GCTTCATGAA AGCAAGAAAG GAAGCAAGTT CGACCTTGCC AGAAAAAAAG AAAGATAACA  960
GAAATAATTT TGTTAATCAT TGTCATCGCT CTCTGTTAAA TGCAGTTCTC ACTCTCGATT TAATGAAATA TTAATCTCGA 1040
TTCTCCTAAT GGTACTCTGT TGTTTTATGT ATTATCTTTT GCAGATAGCT TGGGTTTTTA TAAATCGTAA TGCTGAGTGG 1120
AAGCCTTTAC AGTTTTTGGC CTTCGCCTTT GTATATAGGA TATTTGAGAA ATTAAAAGCA TTTGAGCCTC CAACTCCCAC 1200
GTTTACAGTA AGTATACTTA AAATAGCATT CCTGTCTTCT TCTGCTTGTG AATGCAATTG TATCTCCTAA TCAACATTTC 1280
TTTCTCATAT TTTGCAATAT ATAACATATT GCTTTTCAAG TGCATTCATC TTTTAGCTGC TTTTTTTAGG AGGAAGGCGA 1360
AGATGAAGGA CGGATGATGA GGATGGGAAA AAGGCTGCTT CGTTCTCTTG CATTAGTTTT TGGTTGCATT AGCTATTGCA 1440
TCCTTGGTAT GTGTTCTGTC AGAGTAATGT TACCTGACTG TTCAATTTGT TGGTCCATCT GTAAAGTCAC TTGAAAGAAT 1520
CTGGTTTTGC TTTCTGAATC ATCTCTCATC TTGGAATGTC CTACATATTT GTTGCCTTTT ATTGAATTAA ATCTCCGTTA 1600
TTCATTTGTA TAGGGATATA CTGGTCTCCT CAATCTTATC GAGTATGCTG GTGGTTTCAT ACCTGTCTTT CTGTACAATA 1680
ATCAGGTAAG AGAAGATCCT CTCATTGCAA TCTCTACCAC CGCTGCACAA ACAAAAGGCT TCACAGACCT TCACATATCA 1760
CAGATAGAAT AACAATGTTT TATCATCTTC TTCGACATTT TTGAGTCATA TTCTCTGAAT AGCTATGACT CCTCTTCATC 1840
TTATGAACAG CTAAAGAAAA AATTGCATTC AGTTAATATT ACTTTGCCTA AACGAATTAA GGCTACATTA AGGGAGGGGA 1920
AACTTAGTTC TCAAATATCC TTTATGTTTT GCCCTCTTGC ATATATTTTT TCGTGTATCC TGCTGTTTGC TTCTGTATAC 2000
TTGTTGTTAG GGTTATAATG TTGAGTCCTC TTTTACCTCC ATTCAACATG AATATGAAAA AATGAAGGCA TTCATCCTTA 2080
GCTTTACCAT GATTATTACC CCAATGCTTA TCCGCGGTGT TAAATCTTTT TTCGCGTGCA GGAATTGCTT GTAACTGGAT 2160
TCACAGCCAT CGTGCTTTCC ATCATCGCAT CTTATTACAG ATAGTCTACC TTCTACACTT GTTGAAGAAG AGATGCAGTT 2240
GCCTTGTGTT AGCTGTCAAA TTTTGTAATT CCTATTTGTT CCAGAAATTT TGCCTTGTTT GACTATAGGA TTTGATTGAG 2320
CAGCACTTGT AAGGGATGCA CCAAGTTCTG AGGATTCTAG GATTAAACAA GACCACAATC TTTTCAAAAT TGATGGATGT 2400
TAATGTGGAG ATATAAATGA TAATGAGGAG GAAAGGTTAG GGCGGATCAA TCCTTCATTT GAAAAACAGT CTTGAAATGC 2480
CCAACTCTAC AAGGGTTGCG GGCTTGTGCA GGCCAGCCCT TCTTTATTTT TATTTTTTCC GTTCATTTTT CTAATAATTC 2560
TTTCTTTCTT TTTTTCAAAA AAATCTAAAT TCAAACTTCA AATTTTAACA TGGCTAACAA AATTATATGA AAGTACATAA 2640
TAGTTTCAAT CATATCCTAC TTTATGAATA TGGTTAATGG TAATTCAAAT TACAATTCCA TATATAAGAT CAAGAAAGGG 2720
AGAAAATTTT CAAATTGAAA ATGATATTTT TTCAATACTT TTAGATAAAA TCTACTAAAA GAAATATAAT AATGATTTTT 2800
GACAAATAAA TAACATAAAT TTGAAAAAAT TAATTTGTAA CTTAACGAAC AATTACCTCT TAAAACTTTA GTAATTTAAT 2880
TCAAATTAGA TAATACTTTT AACCAATCCC GACCGGGCGT CAATGAAGCC TCAAGGGCCA AACGCTTACT TGGATTGAGT 2960
CATAAGCCCT AGTTTCTTAA ATAGGCTGGA AAAACCTTAT TCTAATCCTA TTCTAATAGC GATTTAGGTT GGACCGTCGC 3040
CATGGACTAA CCTATTTTGA CAGCTCAAGT AAAACCATTT GTGAATTTAA CCTAGTCAAA ATGTTTTAAA GCTAAAAAAT 3120
TTCCCATCGT TAAACGAGGT CAAAAGTTTA AAACCATCTA CTTTTATGGT CATCTCTCTT ATAAATCATG AGAAAACTAC 3200
TTTATTAGAC ATACATTCAT GCCATATATA CTAATTTTGT CTATATTTTT AAGTAATTAG CGTATTTTAC CACTAATTAA 3280
GAGTTTCCTA TTATATATTA GGAAGATCAT CTAAATATAT GTATATTTGC TACCACATAC ACTAAAATAG GGAGAGAAAC 3360
GATCAAGATA GTCATGTATA TCATATATGC GCGAATCACA CTATAGGTAT CAGAGATACC ATAGACATAG GAGAGTGGCG 3440
AGTTAGATGG GAGGGCGGCG AGTGTAATTT ATCTATCTCA AATACATGCA AATTCACTTG GATACAGTGT ATCTTGAAAA 3520
ATTTACACCT AATTTTGAAG TATCCAGATG CACAAAAATA TGATAAGATT CGTAATATTA CAAACTAGTG AAATTTCGGC 3600
AAGTCGAATT ATTGTCATCC CATGCAAACA ATCCATTTTT AAACCCAACA ATGTATTGAT GGGCCAAAAT AAGCCCAGCC 3680
CACCACCCTA AACTATCCAA ACCCAAATTC CAAAACAAGT CGAATTTGGA GAACTCATCG AAAGGTTACA CTAATGGAAT 3760
CTCATCAGCT TCGGAGCTAA AAACCGATTC CGAAATATCT TCTCGTCGGA GCGGAAAAAC GCCGCCGCGG CCTGAATCTA 3840
CTCTACCGGA GACCGTCATT TCTCGCCGGC GTATAGATTT CAGCTCATTT ACAGGCAAAA TCTGAGGTAT ACTTATCCAA 3920
AACCCTAGAT TTCTCGGAGT CTCCCTTGGG AGACTGAAAT AGTTAGCAAA CATGAGGATT ATGATAAAGG GAGGAGTATG 4000
GAAGAACACG GAGGATGAGA TTCTAAAGGC GGCGGTGATG GAGTATGGGA AGAATCACTG GGCTCGTATT TCTTCTTTAC 4080
TTGTTCGTAA ATCTGCTAAG CAGTGTAAAG CTCGCTGGTA TGAATGGCTC GATCCTTCAA TTAAGAAGGT CAGTTTTTTA 4160
TTCTCTATTG AATTAAGCTT GTTTGTGAGT CATATCCTAC TGTTGTTTGG TAGCTAGTAG ATACATGTAC AAGTTATGAG 4240
ATAAATTGTT TTGTTATCTT ATTGGCCTGC ATTACTTACC AAATGAGTTT GTTCATATGT TTTGGTAAAA GGTTATATGA 4320
AAACTGTTTT TGATTGGTAA CTTTTGCTGT GGAGAGGGTA TAACAGTAGG TGACATATGC TCATAGTACC AGCTGCATGA 4400
TAGGTATGAG GATAGGTTTG AATGTTAGAT TTTGCGAATC ATTGTTCAAG TGCCAAGGTA GGGGTAAGGT CTGCGTGGAC 4480
TATACCATCA AAAGGAGACC ACAAGTGGGA TTATACCGGG CATGTTGTTG TAATTTTCAA TTGTTGATTC AAAAGAGTGG 4560
CAGGAAGTGT GTGTTAAAGA TGTCCGAGAA GGAAACTAGT TAGTGTGGAA GTTATTTTCC TCCAAAATTG AGTAAAATAC 4640
TTCTCATTTC AGACCCTGAC AACCAAATAT ATAACATTCT AGTTCACTGG GTGTTGGTTC TTTTTTCTTG CTTAGTTTAA 4720
TGCGACATGC GAGTTATCTT TTTTTGTTAT GTGTGACACC GTTATGTATT TGTTGATAGC TGTCACATTT CAGATTTCAT 4800
CCTATTCCAT TGTGAACTAG AGAAGTTCTG TTTTGTGAGC ATACTGTGGC TTTGCACCAG TTTGTTTTTG GCTTGATTAT 4880
TGGCATGCAA GATCTGAAAC TAGTTTTCTG TGTGGAGATT TCTGTCTGAG TTTTTCCAAT CTTTTTCTAT TATTCCGTTT 4960
ATCAATGACA GCTAATGATT TTCTGAATAG AGAAAGTGGA GAAGTCACAG TTTTTCAAGT TTACCTCAAG ACTGGTAGGA 5040
ACTTATGTTT TAGCTTAACC ACTTCTTGAC ACAACTTACT GCTATTTTCT TCCAGACTGA ATGGACTAGA GAGGAGGATG 5120
AAAAACTACT TCACCTTGCA AAACTCATGC CTACCCAATG GAGGACAATT GCGCCAATCG TTGGCCGTAC ACCATCACAA 5200
TGCCTTGAAC GTTATGAGAA GCTTCTCGAT GCAGCATGTA CTAAGGATGA GAACTATGAT CCTAATGATG ATCCAAGAAA 5280
```

```
ATTGAAGCCC GGAGAGATTG ATCCTAACCC GGAATCAAAG CCTGCTCGTC CTGATCCTGT TGATATGGAT GAGGACGAGA  5360
AAGAAATGCT TTCTGAAGCA CGGGCTAGGT TGGCCAACAC AAGAGGCAAG AAGGCTAAAA GGAAAGCCAG AGAAAAGCAG  5440
CTTGAAGAGG CGCGGAGGCT TGCTTCTTTA CAGAAGAGGA GAGAACTGAA GGCTGCTGGA ATAGATGTCC GTCAAAGGAA  5520
GAGAAAAAGG AGAGGTATTG ATTACAATGC TGAAATTCCC TTTGAAAAGA AGCCTCCTCC AGGTTTCTAT GATGTCACTG  5600
AGGAAGACCG TCCAGTTGAT CAACCTAAGT TTCCAACTAC CATTGAGGAA CTAGAAGGTG AAAGGAGAGT CGATAAGGAA  5680
GCTCGCCTAA GGAAGCAGGA TATTGCGAGG AACAAAATTG CAGAGAGACA GGATGCCCCT ACATCCATAT TGCATGCGAA  5760
CAAACTTAAT GATCCAGAAG CAGTGAGGAA GAGGTCGAAA CTGAATCTTC CAGCACCACA GATTCCAGAT CATGAATTGG  5840
AGGCCATAGC AAAGATAGGT ATTGCCAGTG ATCTAATTGG GGGAGATGAA CTGTCCGAAG GGAATGCTGC AACGCGTGCT  5920
CTTCTTGCAA ATTATGCCCA GACACCACAA CATGCTATGA CTCCTATGCG AACACCTCAA AGAACCCCTT CAACTAAGCA  6000
AGACGCCATT ATGATGGAAG CAGAAAATCA ACGAAGATTG ACTCAATCTC AAACACCATT ACTTGGAGGA GATAATCCTT  6080
TGTTGCACCC CTCAGATTTC TCGGGTGTCA CTCCTAAGAA AAGGGAGGTT CAAACTCCAA ACCCACTTTT AACTCCTTCA  6160
GCGACTCCTG GAGCCACGAG CCTTACTCCT AGAATTGGCA TGACACCTTC GAGAGATTCT TATGGGATGA CACCCAAAGG  6240
AACTCCTATG AGGGACGAGC TACGCATTAA TGAAGAAATG GATATGCATA GTAATGCTAA ACTGGGGCAA TTTAATTCAA  6320
AAAAAGAATT GCTTTCTGGT TTGAAAAGCC TTCCTCAGCC CAAGAATGAG TACCAGATTG TCATCCAACA ACCTCCTGAA  6400
GAAAATGAAG AACCAGAAGA GAAGATCGAA GAAGACATGT CTGATAGGAT TGCCAGGGAG AAGGCTGAAG AAGAAGCAAA  6480
GCGACAAGCA TTACTCCGTA AAAGGTCAAA AGTATTGCAA AGGGAGCTCC CTAGACCTCC CATTGCTTCT CTAGAACTAA  6560
TAAAGAGTTC CTTGATGAGA GCTGATGAGG ACAAGAGCTC CTTTGTTCCT CCTACACTAA TTGAGCAGGC TGATGAAATG  6640
ATTAGAAAGG AACTTGTGTC CTTGCTAGAA CATGATAATA CCAAGTACCC TCTAGATGAG AAGCCAGAGA AGGAGAAGAA  6720
AAAGGGGGTC AAGCGAAAAA TTGTTGCTGA ACCTGCTATT GAGGATTTTG AGGAAGATGA ATTAAAAGAG GTACGTTCAT  6800
GTTACAGAGA GAAAAAAATG GTTTTCTTTA CATCTTTTGT CGATATACTT TTTCCTTACC TGCATTTATG CATAAAAATG  6880
ACAAAGAGTT GTCTAAATTC CATATAAATC AATTTGGAAA TTATTTTTTT AACATCCCAG CAACAACTGA GCGGAAGAGT  6960
TTCAAATGAG AGTTAGTGTC ACGTAAGACT AGAAAAGAAA AAGAGTTCTC TAAATTCCAT GTAAAGCTAT TTTGGAAGTA  7040
CTTCTTTAAC ATTTTCATAT AACCTTTTTG TATAAGAATT TCTGAAACCA TTCCTACAAT TGCTGATAAA TCCGAAACTA  7120
TGGCTGCAAG AATTGAAGAT TACGGTAGGT TCAATAGGAT CATCCAATAC TATATTTGTC AAGTTATATT TAACTGTATG  7200
TAGTGTATAT GTTATGTATA TATATGTTTT ACTTGACTTT ACACTACACA AGCTAGGTTA CATGCTCTAC TTTTTAGACC  7280
CTACTGAACT CGGGACAATA CACGATGTCA CAGCTTTGTT TTTAGTATTT GTTGTTACGA GGACGGATTA ACTGAAATTG  7360
GAAATTCGAG TCTTGAGACA CCAAAAAAAT GCCGATGGTG AATAGACTCC TTGTCCCTTT TATTGTGTGC TAATAGATGT  7440
GCCCTTTCAT TACCAAATTC GTGTTTAAAC AATGACGTTC TTTGGAGGTT GTATGATTTT ATCTTGAGCC TACTGCATTA  7520
CTAACTCCAC TTGTGCAGGC CGATGGATTG ATCAAGGATG AGGCTCACTT TCTTCGTGTG GCAATGGGAC ATGAGAGTGA  7600
ATCTCTTGAT GAATTTGTCG AAATACACAA AGCAACTTTG AATGATATCA TGTACTTTCC TACCCGAAAT GCTTATGGTC  7680
TCTCAAGTGT TGCTGGAAAC ATGGAAAAGC TTGCTGCTTT GCAGAACGAG TTTGAGAATG TGAAGAAAAA AATGGACGAT  7760
GATACTAAGA AAGCAACAAA ACTTGAGCAA AAGATCAAAG TTCTTACTAA TGGATATCAG GTACAGTTTA GTGGTTTAAT  7840
CTTTAATCTG AATAGTTGCA CATGCTTTAC ATTTTTCTGT TTGCTTCATA TGCTTAGAGG TTTTATCATA AGACATGGTT  7920
TTATATCACT TCTGCAATCA GATAGGTTTC TGCTTCTTAC ATTGGATCTT CTTTTGGCTG CTCTAGTTTT TGTTTGTTTT  8000
TCTTTTTTAA CTATATGTTG AGAGTTGAAC TGTAAGCTAT AAATACAAGC TAACTATTCA TTGTGGATGA GCAGATGCGA  8080
GCTGGAAAGC TTTGGTCACA GATAGAGTCA ACCTTCAAGA AAATGGACAC AGCGGGTACA GAGCTTGAAT GCTTCCGAGC  8160
ATTACAAAAA CAAGAGCAGC TAGCAGCATC CCACAGGATC AACAATATGT GGGAAGAAGT TCAGAAGCAA AAGGAGCTTG  8240
AGCGTACTTT ACAGAAAAGG TACGGTGACC TCATAGCAGA TACGCAAAAG ATCCAGCATC TCATGGATGA GTATAGAATA  8320
CAAGATCAAA TGCAGGAAGA AGTTGCAGCA AAAAATCGTG CTCTTGAGTT GGCGAAGGCA GAAATGGCAG AAAAAGATAG  8400
TGTACCATCT GCTGATGATG TGGAACCTTC AGGTACCGGA CAGAATTCCA ATACAGAGGA AAATTCTGCT TCTGCCTCTC  8480
ATGTGCCAAT AGAAGCTGAT GTGCATGTAG AGCCTTCAGG TACCAACCAG TGCTCTAATG CAGAGGAAAA TTCTGCTTCT  8560
ATTGAAGCTG ATAATGTGCA TGTGGAGCCC TCAGGTACTA GCCAGTGCCC CATTGCAGAG GAAACTTCTG CCTCCATCTC  8640
TCATGACACA ACTCCTCGAG ACGTTGATGG ACAGGTGCAA GTGGCTGACG TTTCCACAAT GGACTCTGAA GCCATAAGTG  8720
ACCATGTACC TATGGAGGGT CAGCAAAACC CAGGAGAAGA GAGTAACACA GTTGTTACTA AAACAGAAGA CTCTACAGTA  8800
GCAGCAGGTG ACGTGGATGT TACTAAAACA GACGACTCTG GAGTAGTAGC AGGTGATGGT GAGGCTGATC CCAAAAACAT  8880
GTAAGGTTCT ACCGAGAAAG TGGTTGGTTG TTCAATAGTT CCTTAATCCT GTTTTCCTAC ATTTTTGGAA CCAAGTTTTG  8960
CTTCATTTCA AGAATATGTT GTTTGGTTGG ATGAAAATTC GAAATTCTCA AAATTTGTAC TGTGGTTTAG CTACCTATGC  9040
TGGTATTTGC AAAATAATCA AAAACTGCAT TTGCCTACAC TTGGAATCAA CTCTTTAGGT CCTTTATTCA CCAGTCTTCT  9120
GTGGCTACTT ACTTCTATGT TTGTGTTACT GTAAATGTGA GCTTAGCTTT ACCAAACTCT CTGGTTAAAA TTGAATGTTG  9200
TGGTTAACAT TAATGTGAAA AATAGCTTCT AATTGCAATT GACAAGTCCT TTTCAAACTT CCAAAAGACT TGTATCTTCT  9280
TAAAATTCAG AACTTTGTAT AGGTCATCTT TTAATTGTAA TGGCAACATC CAATTTTTCT AAGGTTTTCA TTCTGAGTTA  9360
CTGTGGAATG GTTTGAGGTA ACAGAGAGGT AGTAGTTTGT TGCTGGTAAG CTATTCGATA CTTGTACAGA TGCGAGATAG  9440
CAAGTATCTA ATGAAATAAT TGAAGGGTAA CGTGTATCAT TAGAAATAAG GTGGATGAAG GAAGGTAGAA GGTAATTACG  9520
ATTATCTAGT GAAATAGTTG AGATGATGAA AAATATAAAA GTTATGGTGA GGGCAAGCTA ACTAGGTGAT GAAGGGGTTG  9600
TATGTGTCCA CTAAAATACA TATGGTGGTG AAATGGTGAT AGTTAGAGTT ATCAATATTT AGAATAGTGG GTAAATAGTT  9680
ATTAGTCATA GTGAGGATAA ACTAGAGTGG TGGTAAAGAC TAAAGAGGTA TCATGGGGTC CACTAAAATA CTTAAGGCAT  9760
CGTTTGGTGC AAATAATAAT AATAATGATG CAGGAATTAG TAAAATGAAG ATCCGTAATA CAATGATCAG TAATGCAGAG  9840
TTTTATGT   9848
```

7.1.1.2 Intronsequenzen des *Sl*cdc5

Intron 1:

```
GTCAGTTTTT TATTCTCTAT TGAATTAAGC TTGTTTGTGA GTCATATCCT ACTGTTGTTT GGTAGCTAGT AGATACATGT   80
ACAAGTTATG AGATAAATTG TTTTGTTATC TTATTGGCCT GCATTACTTA CCAAATGAGT TTGTTCATAT GTTTTGGTAA  160
AAGGTTATAT GAAAACTGTT TTTGATTGGT AACTTTTGCT GTGGAGAGGG TATAACAGTA GGTGACATAT GCTCATAGTA  240
CCAGCTGCAT GATAGGTATG AGGATAGGTT TGAATGTTAG ATTTTGCGAA TCATTGTTCA AGTGCCAAGG TAGGGGTAAG  320
GTCTGCGTGG ACTATACCAT CAAAAGGAGA CCACAAGTGG GATTATACCG GGCATGTTGT TGTAATTTTC AATTGTTGAT  400
TCAAAAGAGT GGCAGGAAGT GTGTGTTAAA GATGTCCGAG AAGGAAACTA GTTAGTGTGG AAGTTATTTT CCTCCAAAAT  480
TGAGTAAAAT ACTTCTCATT TCAGACCCTG ACAACCAAAT ATATAACATT CTAGTTCACT GGGTGTTGGT TCTTTTTTCT  560
TGCTTAGTTT AATGCGACAT GCGAGTTATC TTTTTTTGTT ATGTGTGACA CCGTTATGTA TTTGTTGATA GCTGTCACAT  640
TTCAGATTTC ATCCTATTCC ATTGTGAACT AGAGAAGTTC TGTTTTGTGA GCATACTGTG GCTTTGCACC AGTTTGTTTT  720
TGGCTTGATT ATTGGCATGC AAGATCTGAA ACTAGTTTTC TGTGTGGAGA TTTCTGTCTG AGTTTTTCCA ATCTTTTTCT  800
ATTATTCCGT TTATCAATGA CAGCTAATGA TTTTCTGAAT AGAGAAAGTG GAGAAGTCAC AGTTTTTCAA GTTTACCTCA  880
AGACTGGTAG GAACTTATGT TTTAGCTTAA CCACTTCTTG ACACAACTTA CTGSTATTTT CTTCCAG    947
```

Intron 2:

```
GTACGTTCAT GTTACAGAGA GAAAAAAATG GTTTTCTTTA CATCTTTTGT CGATATACTT TTTCCTTACC TGCATTTATG  80
CATAAAAATG ACAAAGAGTT GTCTAAATTC CATATAAATC AATTTGGAAA TTATTTTTTT AACATCCCAG CAACAACTGA  160
GCGGAAGAGT TTCAAATGAG AGTTAGTGTC ACGTAAGACT AGAAAAGAAA AAGAGTTCTC TAAATTCCAT GTAAAGCTAT  240
TTTGGAAGTA CTTCTTTAAC ATTTTCATAT AACCTTTTTG TATAAGAATT TCTGAAACCA TTCCTACAAT TGCTGATAAA  320
TCCGAAACTA TGGCTGCAAG AATTGAAGAT TACGGTAGGT TCAATAGGAT CATCCAATAC TATATTTGTC AAGTTATATT  400
TAACTGTATG TAGTGTATAT GTTATGTATA TATATGTTTT ACTTGACTTT ACACTACACA AGCTAGGTTA CATGCTCTAC  480
TTTTTAGACC CTACTGAACT CGGGACAATA CACGATGTCA CAGCTTTGTT TTTAGTATTT GTTGTTACGA GGACGGATTA  560
ACTGAAATTG GAAATTCGAG TCTTGAGACA CCAAAAAAAT GCCGATGGTG AATAGACTCC TTGTCCCTTT TATTGTGTGC  640
TAATAGATGT GCCCTTTCAT TACCAAATTC GTGTTTAAAC AATGACGTTC TTTGGAGGTT GTATGATTTT ATCTTGAGCC  720
TACTGCATTA CTAACTCCAC TTGTGCAG  748
```

Intron 3:

```
GTACAGTTTA GTGGTTTAAT CTTTAATCTG AATAGTTGCA CATGCTTTAC ATTTTTCTGT TTGCTTCATA TGCTTAGAGG  80
TTTTATCATA AGACATGGTT TTATATCACT TCTGCAATCA GATAGGTTTC TGCTTCTTAC ATTGGATCTT CTTTTGGCTG  160
CTCTAGTTTT TGTTTGTTTT TCTTTTTTAA CTATATGTTG AGAGTTGAAC TGTAAGCTAT AAATACAAGC TAACTATTCA  240
TTGTGGATGA GCAG  254
```

7.1.1.3 Aminosäuresequenz von *Sl*CDC5

```
MRIMIKGGVW KNTEDEILKA AVMEYGKNHW ARISSLLVRK SAKQCKARWY EWLDPSIKKT EWTREEDEKL LHLAKLMPTQ  80
WRTIAPIVGR TPSQCLERYE KLLDAACTKD ENYDPNDDPR KLKPGEIDPN PESKPARPDP VDMDEDEKEM LSEARARLAN  160
TRGKKAKRKA REKQLEEARR LASLQKRREL KAAGIDVRQR KRKRRGIDYN AEIPFEKKPP PGFYDVTEED RPVDQPKFPT  240
TIEELEGERR VDKEARLRKQ DIARNKIAER QDAPTSILHA NKLNDPEAVR KRSKLNLPAP QIPDHELEAI AKIGIASDLI  320
GGDELSEGNA ATRALLANYA QTPQHAMTPM RTPQRTPSTK QDAIMMEAEN QRRLTQSQTP LLGGDNPLLH PSDFSGVTPK  400
KREVQTPNPL LTPSATPGAT SLTPRIGMTP SRDSYGMTPK GTPMRDELRI NEEMDMHSNA KLGQFNSKKE LLSGLKSLPQ  480
PKNEYQIVIQ QPPEENEEPE EKIEEDMSDR IAREKAEEEA KRQALLRKRS KVLQRELPRP PIASLELIKS SLMRADEDKS  560
SFVPPTLIEQ ADEMIRKELV SLLEHDNTKY PLDEKPEKEK KKGVKRKIVA EPAIEDFEED ELKEADGLIK DEAHFLRVAM  640
GHESESLDEF VEIHKATLND IMYFPTRNAY GLSSVAGNME KLAALQNEFE NVKKKMDDDT KKATKLEQKI KVLTNGYQMR  720
AGKLWSQIES TFKKMDTAGT ELECFRALQK QEQLAASHRI NNMWEEVQKQ KELERTLQKR YGDLIADTQK IQHLMDEYRI  800
QDQMQEEVAA KNRALELAKA EMAEKDSVPS ADDVEPSGTG QNSNTEENSA SASHVPIEAD VHVEPSGTNQ CSNAEENSAS  880
IEADNVHVEP SGTSQCPIAE ETSASISHDT TPRDVDGQVQ VADVSTMDSE AISDHVPMEG QQNPGEESNT VVTKTEDSTV  960
AAGDVDVTKT DDSGVVAGDG EADPKNM.  988
```

7.1.2 Sequenzen von Tabak

7.1.2.1 Partielle cDNA-Sequenz von *Nr*cdc5

```
CAGACTGAGT GGACTAGAGA AGAAGATGAA AAACTACTTC ACCTTGCAAA ACTCATGCCT ACTCAATGGA GGACTATTGC  80
GCCAATTGTT GGTCGTACAC CATCCCAATG CCTTGAACGC TATGAAAAGC TTCTCGATGC AGCATGTGCT AAGGATGAAA  160
ACTATGACCC TAATGATGAT CCAAGAAAAT TGAAGCCTGG AGAGATTGAT CCTAATCCCG AATCAAAGCC TGCTCGTCCT  240
GATCCTGTTG ATATGGACGA GGATGAGAAA GAAATGTTGT CTGAAGCACG GGCTCGGTTG GCCAACACAA GAGGCAAGAA  320
GGCTAAAAGG AAAGCCAGAG AAAAGCAGCT TGAAGAGGCG CGGAGGCTTG CTTCTTGACA GAAGAGGAGA GAACTGAAGG  400
CTGCTGGGAT AGATGCCCGT CAAAGGAAGA GAAAAAGGAG AGGAATTGAT TACAATGCTG AATTTCCCTT TGAAAAGAAG  480
CCTCCTCCAG GTTTCTATGA TGTGTCTGAG GAAGACCGTC CAGTAGAGCA ACCTAAGTTT CCAACTACCA TTGAAGAACT  560
AGAAGGTGAA AGGAGAGTCG ATAAGGAAGC TCGTCTAAGA AAGCAGGATA TTGCAAGGAA TAAAATTGCA GAAAGGCAGG  640
ATGCCCCTAC AGCCATATTG CATGCAAATA AACTTAATGA TCCAGAAGCA GTGAGGAAGA GGTCGAAACT CAATCTTCCA  720
GCACCACAGA TTCCAGATCA TGAATTGGAG GCCATAGCAA AGATGGGTAT TGCCAGTGAT CTACTAGGGG GTGATGAACT  800
CTCCGAAGGG AATGCTGCAA CACGTGCTCT TCTTGCAAAT TATGCCCAGA CACCACAGCA TGCAATGACT CCAATGCGAA  880
CACCTCAAAG AACCCCTTCA ACTAAGCAAG ATGCCATTAT GATGGAAGCA GAAAATCAAC GAAGATTGAC TCAGTCTCAG  960
ACACCATTAC TTGGAGGGGA TAATCCTATG TTGCACCCCT CAGATTTTTC TGGTGTCACT CCTAAGAAAA GGGAAGTTCA  1040
AACACCGAAC CCACTCTTAA CTCCTTCAGC AACTCCTGGA GCCACTGGCC TTACTCCTAG AATTGGCATG ACACCTTCAA  1120
GGGATTCTTA TGGCATGACC CCGAAAGGAA CTCCTATGAG GGATGAGCTA CACATTAATG AAGAAATGGA TATGCACAAT  1200
AATGCTAAAC TTGGGCAATT CAATTCAAAG AAAGAATTGC TTTCTGGTTT GAAAAGCCTT CCTCAGCCCA AAAATGAGTA  1280
CCAGATAGTC GTCCAACAAC CTCAGGAAGA AAGTGAAGAA CCACCAGAAG AGAAGATTGA AGAAGACATG TCTGATAGGA  1360
TTGCAAGGGA GAAGGCCGAA GAAGAAGCAA GGCAACAAGC TTTACTCCGG AAAAGGTCAA AAGTACTGCA GAGAGAGCTC  1440
CCTAGACCTC CCATTGCTTC ACTAGAGCTA ATAAGAAGTT CCTTAATGAG AGCTGATGAA GATAATAGCT CCTTTGTTCC  1520
TCCTACACTA ATTGAGCAGG CTGATGAAAT GATTAGGAAG GAGCTTCTGT CTTTGCTAGA ACATGATAAT AGCAAGTAAC  1600
CTCTAGATGA AAGAGCAGAG AAGGAGAAGA AAAAGGGGGT CAAGCGAAAA GTGGTTGCTG AACCTGCGAT TGAGGACTTT  1680
GAGGAAGATG AACTGAGAGA GGCTGATGGA TTGATCAAGG ACGAGGCTCA TTTTGTTCGT GTGGCAATGG GACATGAGGG  1760
TGAATCTCTT GATGAATTTG TCGAAGCACA CAAAACAACT TTGAATGATA TCATGTACTT TCCTACCCGG AATGCTTATG  1840
GTCTCTCAAG TGTTGCTGGA AACATGGAAA AGCTAGCTGC TTTACAGAAT GAGTTTGAGA ATGTGAAGAA GAAAATGGAT  1920
GATGATACTA AGAAAGCAAC AAAGCTTGAG CAGAAGATCA AAGTCCTTAC TAATGGATAT CAGATGCGAG CCGGAAAACT  2000
CTGGTCACAG ATAGAGGCTA CGTTTAAGCA AATGGACACA GCAGGGACAG AACTTGAATG CTTCCGAGCA TTACAAAAAC  2080
AAGAGCAGCT AGCAGCATCA CATAGGATCA ACAATCTGTG GGAAGAAGTT CAGAAACAAA AGGAGCTTGA ACGTACTCTA  2160
CAGAAAAGGT ACGGCGACCT CATAGCAGAT AAGGAAAAGA TGCAGCATCT CATGGATGAG TACAGAATAC AAGCTCAAAT  2240
GCAGGAAGAA ATTGCAGCAA AGAATCGTGC TCTTGAGCTG GCCAAGGCAG AAATGGAAGA AAAGCAGAGC ACACCTGCTG  2320
CTGCTGAAGC TGGTGTGGAA TCTTCAGAGA CCGTCCAGTG CTCCAATGCA GAGGAAAAAT CTGCTTCTGC CGCTCCTGTA  2400
TCATCATCTG CTATTGAAGC TGATGACGTG CCTGTAGAAT CTTCAGAGAC CAGCCAGTGC TCCAATGCAG AGGAAAAATC  2480
```

```
TGCTTCTGCC ACTCATGATG CAACTCCTCA GGACGTTGAG GAACAGGTGA AAGTGATCAG TGACGACTCT ACAATGGATG  2560
CTGAAGCCAT AAGTGAGAAC GTCCCTGTGG AGGGTCAGCA AAACTGTATA GCAGAGAGTA ACCAGGATGT TACCAAAACA  2640
GAAGATTCTG GAGTTGCAGA TGATGCACGG GATGTTACTA ACATAGAAGA TTCTGGAGTT GCAAGTGATG CGGGAAACTA  2720
GTAATGTTCT AGTTTTGCCA CTAAGAAAGT GATTGGCGGT TTGCTTGTTG TGTTGTAATC CCATTTTCGT ACAT  2794
```

7.1.2.2 Partielle Aminosäuresequenz von *Nr*CDC5

```
QTEWTREEDE KLLHLAKLMP TQWRTIAPIV GRTPSQCLER YEKLLDAACA KDENYDPNDD PRKLKPGEID PNPESKPARP  80
DPVDMDEDEK EMLSEARARL ANTRGKKAKR KAREKQLEEA RRLASLQKRR ELKAAGIDAR QRKRKRRGID YNAEFPFEKK  160
PPPGFYDVSE EDRPVEQPKF PTTIEELEGE RRVDKEARLR KQDIARNKIA ERQDAPTAIL HANKLNDPEA VRKRSKLNLP  240
APQIPDHELE AIAKMGIASD LLGGDELSEG NAATRALLAN YAQTPQHAMT PMRTPQRTPS TKQDAIMMEA ENQRRLTQSQ  320
TPLLGGDNPM LHPSDFSGVT PKKREVQTPN PLLTPSATPG ATGLTPRIGM TPSRDSYGMT PKGTPMRDEL HINEEMDMHN  400
NAKLGQFNSK KELLSGLKSL PQPKNEYQIV VQQPQEESEE PPEEKIEEDM SDRIAREKAE EEARQQALLR KRSKVLQREL  480
PRPPIASLEL IRSSLMRADE DNSSFVPPTL IEQADEMIRK ELLSLLEHDN SKYPLDERAE KEKKKGVKRK VVAEPAIEDF  560
EEDELREADG LIKDEAHFVR VAMGHEGESL DEFVEAHKTT LNDIMYFPTR NAYGLSSVAG NMEKLAALQN EFENVKKKMD  640
DDTKKATKLE QKIKVLTNGY QMRAGKLWSQ IEATFKQMDT AGTELECFRA LQKQEQLAAS HRINNLWEEV QKQKELERTL  720
QKRYGDLIAD KEKMQHLMDE YRIQAQMQEE IAAKNRALEL AKAEMEEKQS TPAAAEAGVE SSETVQCSNA EEKSASAAPV  800
SSSAIEADDV PVESSETSQC SNAEEKSASA THDATPQDVE EQVKVISDDS TMDAEAISEN VPVEGQQNCI AESNQDVTKT  880
EDSGVADDAR DVTKTIEDSG VASDAGN.  908
```

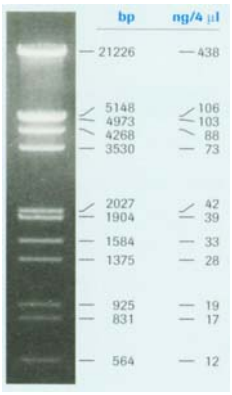
7.1.3 Sequenzen der Kartoffel

7.1.3.1 Aminosäuresequenz von *St*CDC5

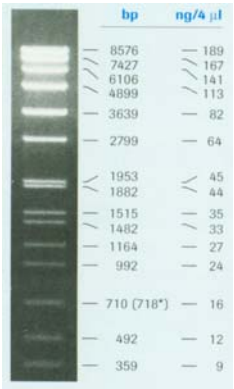
```
MRIMIKGGVW KNTEDEILKA AVMKYGKNQW ARISSLLVRK SAKQCKARWY EWLDPSIKKT EWTRGEDEKL LHLAKLMPTQ  80
WRTIAPIVGR TPSQCLERYE KLLDAACTKD ENYDPNDDPR KLKPGEIDPN PESKPARPDP VDMDEDEKEM LSEARARLAN  160
TRGKKAKRKA REKQLEEARR LASLQKRREL KAAGIDARQR KRKRRGIDYN AEIPFEKKPP PGFYDITEED RPVDQPKFPT  240
TIEELEGERR VDKEARLRKQ DVARNKIAER QDAPTSILHA NKLNDPEAVR KRSKLNLPAP QIPDHELEAI AKIGIASDLI  320
GGDELSEGNA ATRALLANYA QTPQHAMTPM RTPQRTPSTK QDAIMMEAEN QRRLTQSQTP LLGGDNPLLH PSDFSGVTPK  400
KREVQTPNPL LTPSATPGAT SLTPRIGTTP SRDSYGMTPK GTPMRDELRI NEEMDMHNNA KLGQFNSKKE LLSGLKSLPQ  480
PKNEYQIVVQ QPPEENEEPE EKIEEDMSDR IAREKAEEEA KRQALLRKRS KVLQRELPRP PIASLELIKS SLMRADEDKS  560
SFVPPTLIEQ ADEMIRKELV SLLEHDNTKY PLDEKPEKEK KKGVKRKIVA EPAIEDFEED ELKEADGLIK DEAHFLRVAM  640
GHESESLDEF VEVHKTTLND IMYFPTRNAY GLSSVAGNME KLAALQNEFE NVKKKMDDDT KKATKLEQKI KVLTNGYQMR  720
AGKLWSQIES TFKKMDTAGT ELECFRALQK QEQLAASHRI NNMWEEVQKQ KELERTLQKR YGDLIADTQK IQHLMDEYRI  800
QDQMQEEIAA KNRALELAKA EIAEKESIPS ADDVEPSGTV QCSNPEENSA SASHVPIEAD VHVEPSGIDQ CSNAEENSAS  880
IEADNVHVEP SGTSQSPIAE ETSASVSHDT TPQDVEGQVQ VADVSTMDAE ALSDHVPMEG QQNLVEESNT DVTKTEDSTV  960
ASYYVDVTKT EDSTVAAGDV DVTKTEDSTV AAGDVDVTKT DDSVVVAGDG EADPKNM.  1018
```

7.2 Längenmarker

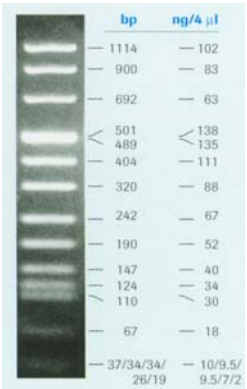
7.2.1 DNA-Längenmarker



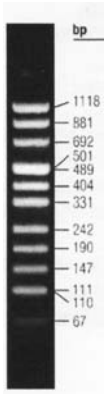
DNA- Molecular Weight Marker III (Roche)



DNA- Molecular Weight Marker VII (Roche)



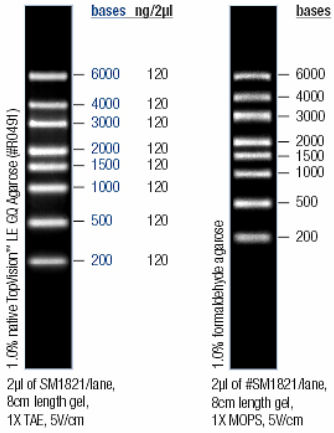
DNA- Molecular Weight Marker VIII (Roche)



pUC-Mix (Fermentas)

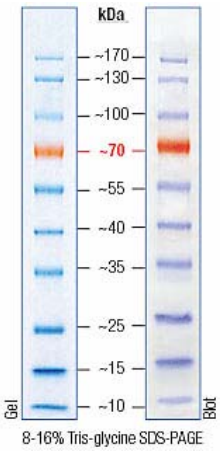
7.2.2 RNA-Längenmarker

RNA-Marker II (Roche)



RNA-Ladder High Range (Fermentas)

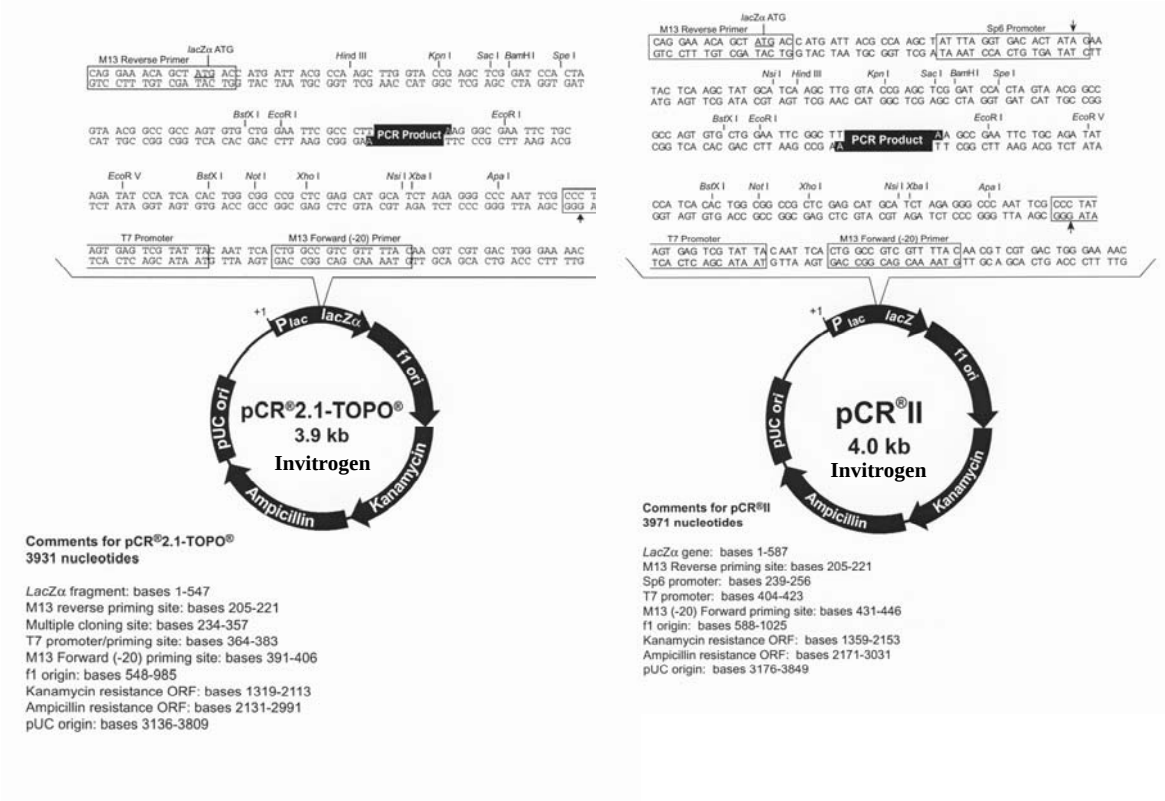
7.2.3. Proteinmarker



Prestained Protein Ladder (Fermentas)

7.3 Vektoren

7.3.1 Vektoren für die Klonierung von PCR- und RT-PCR-Produkten

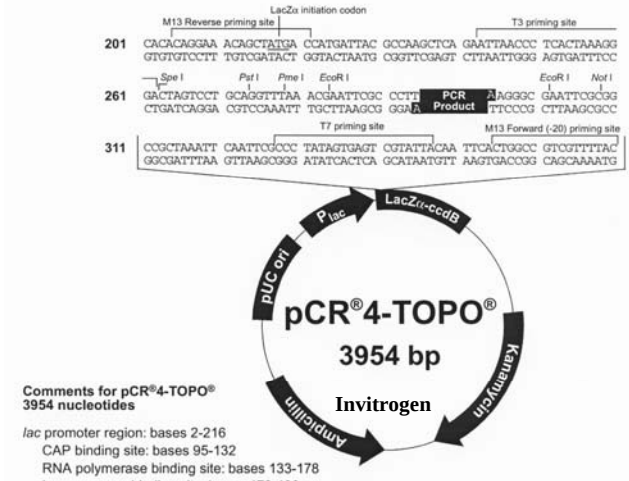


Comments for pCR®2.1-TOPO®
3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547
M13 reverse priming site: bases 205-221
Multiple cloning site: bases 234-357
T7 promoter/priming site: bases 364-383
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
f1 origin: bases 548-985
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
pUC origin: bases 3136-3809

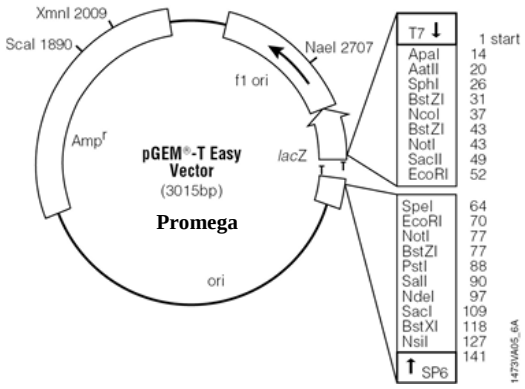
Comments for pCR®II
3971 nucleotides

LacZα gene: bases 1-587
M13 Reverse priming site: bases 205-221
Sp6 promoter: bases 239-256
T7 promoter: bases 404-423
M13 (-20) Forward priming site: bases 431-446
f1 origin: bases 588-1025
Kanamycin resistance ORF: bases 1359-2153
Ampicillin resistance ORF: bases 2171-3031
pUC origin: bases 3176-3849

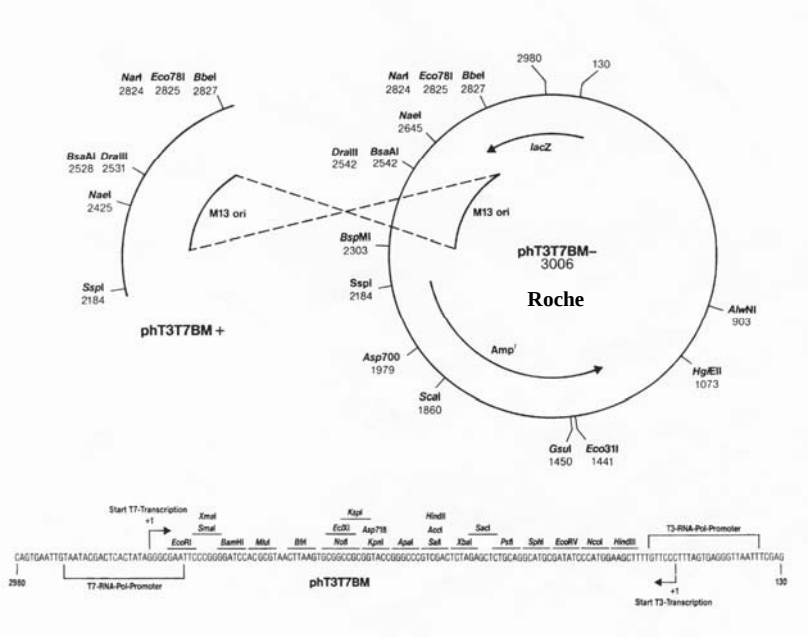


Comments for pCR®4-TOPO®
3954 nucleotides

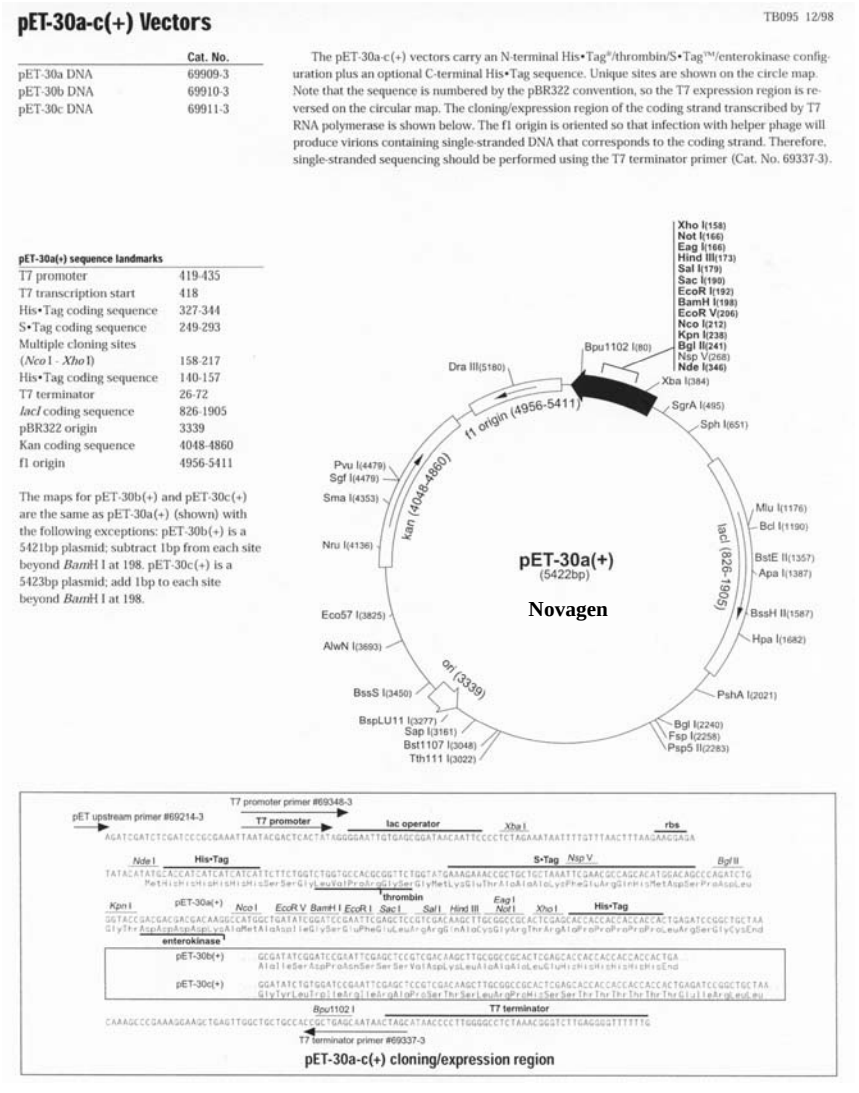
lac promoter region: bases 2-216
CAP binding site: bases 95-132
RNA polymerase binding site: bases 133-178
Lac repressor binding site: bases 179-199
Start of transcription: base 179
M13 Reverse priming site: bases 205-221
LacZα-*ccdB* gene fusion: bases 217-810
LacZα portion of fusion: bases 217-497
*ccd*B portion of fusion: bases 508-810
T3 priming site: bases 243-262
TOPO® Cloning site: bases 294-295
T7 priming site: bases 328-347
M13 Forward (-20) priming site: bases 355-370
Kanamycin promoter: bases 1021-1070
Kanamycin resistance gene: bases 1159-1953
Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 2309-3061 (c)
Ampicillin (*bla*) promoter: bases 3062-3158 (c)
pUC origin: bases 3159-3832
(c) = complementary strand

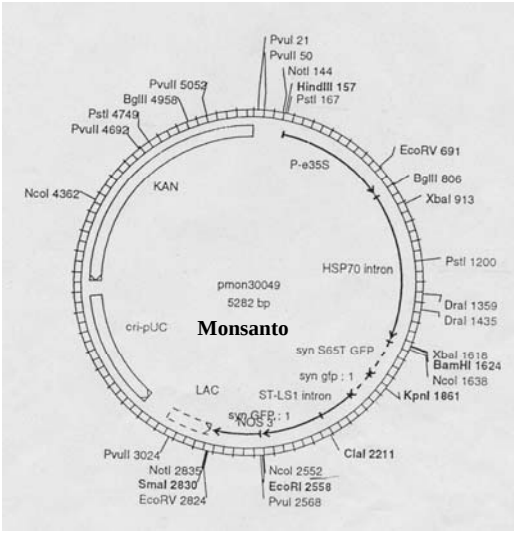


7.3.2 Plasmid des Viroid-Klons pRW 58

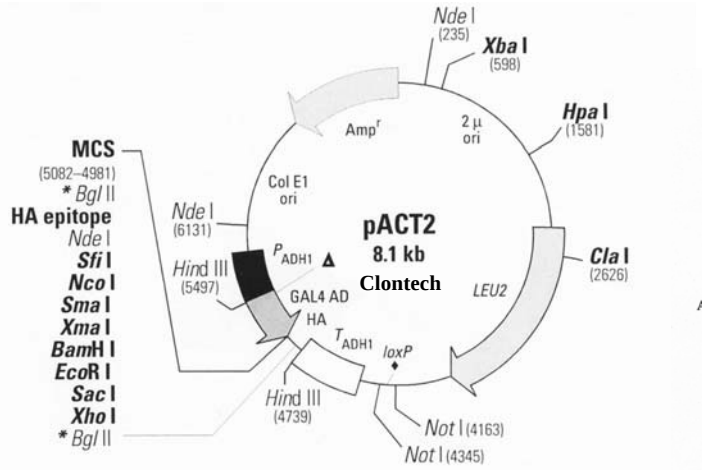


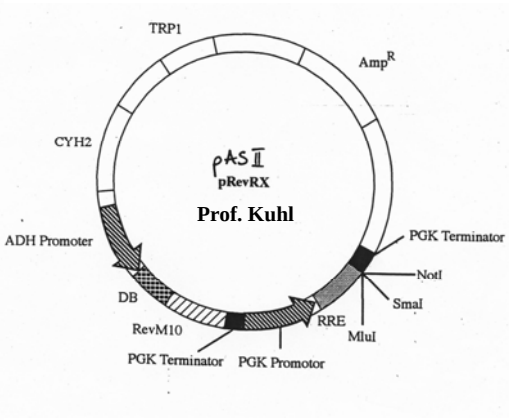
7.3.3 Expressionsvektoren

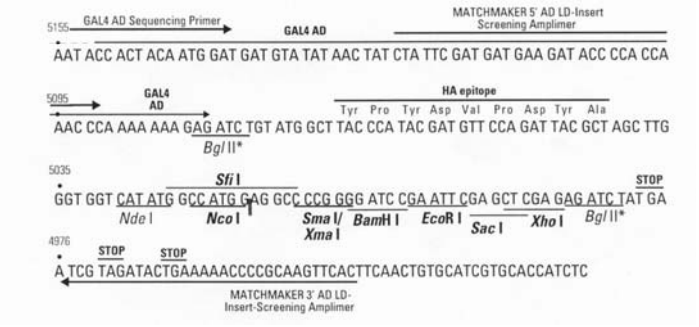




7.3.4 Tri-Hybrid Vektoren







Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werke wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

Hamburg, den 07. November 2007