

## Viroide: Eine Klasse subviraler Krankheitserreger

Von Hans J. Gross und Detlev Riesner<sup>[\*]</sup>

Infektiöse, hüllproteinfreie Ribonucleinsäure-Moleküle konnten in jüngster Zeit als Erreger von Krankheiten höherer Pflanzen entdeckt und charakterisiert werden. Es handelt sich dabei um ringförmige, aus ca. 360 Nucleotiden aufgebaute Ribonucleinsäuren, die als Viroide bezeichnet werden. Damit ist den Viren und Bakteriophagen eine Klasse noch kleinerer infektiöser Agentien zur Seite gestellt. Viroide sind die ersten eukaryotischen Krankheitserreger, deren chemische Struktur vollständig beschrieben werden konnte. Sie haben strukturelle und dynamische Eigenschaften, die an anderen Nucleinsäuren bisher nicht beobachtet wurden. Das am besten untersuchte Viroid PSTV („potato spindle tuber viroid“) besteht beispielsweise aus genau 359 Nucleotiden, die durch weitgehende Watson-Crick-Basenpaarung ein Stäbchen bilden, in welchem kurze Doppelhelices mit ebenfalls kurzen ungepaarten Bereichen abwechseln. Die Dynamik der Viroide ist durch zwei Eigenheiten charakterisiert: Die außergewöhnliche Kooperativität wird durch die Bildung stabiler Äste garantiert, und die Hauptkonformationsänderung ist ein Übergang zwischen einer gestreckten und einer verzweigten Struktur.

### 1. Einleitung

Als Viroide bezeichnet man eine neue und eigenständige Klasse von Pathogenen, die sich von Viren und Bakteriophagen durch das Fehlen eines Hüllproteins und durch ihre ungewöhnliche Kleinheit unterscheiden (Abb. 1). Als Krankheitserreger wirtschaftlich bedeutender Nutzpflanzen sind sie von erheblichem ökonomischem Interesse; als infektiöse und pathogene Ribonucleinsäuren mit vorher nicht beobachteten Eigenschaften sind sie zugleich attraktive Objekte molekularbiologischer Forschung.

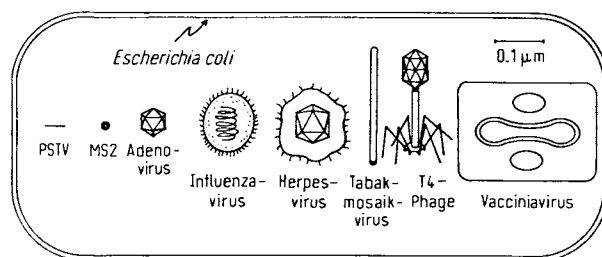


Abb. 1. Größenvergleich des „potato spindle tuber viroid“ (PSTV) mit Viren und dem Bakterium *Escherichia coli*.

[\*] Priv.-Doz. Dr. H. J. Gross  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
D-8033 Martinsried bei München  
Prof. Dr. D. Riesner  
Institut für Organische Chemie und Biochemie  
der Technischen Hochschule  
Petersenstraße 22, D-6100 Darmstadt

Viroide treten insbesondere in tropischen und subtropischen Klimazonen auf. In den gemäßigten und kalten Zonen kommen sie in Gewächshauskulturen vor. So befallen sie die Kartoffel<sup>[1,2]</sup>, Citruskulturen<sup>[3,4]</sup>, die Chrysantheme<sup>[5-7]</sup>, die Gurke<sup>[8]</sup>, Kokospalmen<sup>[9,10]</sup>, den Hopfen<sup>[11]</sup>, die Zierpflanze *Columna erythraea*<sup>[12]</sup> und den Avocado-Baum<sup>[13]</sup>. Auf

der Suche nach den Erregern dieser Pflanzenkrankheiten wurde um 1971/72 von amerikanischen<sup>[1,4]</sup>, kanadischen<sup>[2]</sup> und deutschen Forschern<sup>[3]</sup> gefunden, daß hüllproteinfreie Ribonucleinsäuren von bisher ungeahnter Kleinheit das infektiöse Agens sind. Die Existenz freier infektiöser Nucleinsäuren als Erreger von Pflanzenkrankheiten war seit Anfang der sechziger Jahre bekannt. Von einem neuen Erregertyp konnte man aber erst sprechen, als 1971/72 die außerordentlich geringe Größe dieser Pathogene nachgewiesen wurde. Die neuen Krankheitserreger wurden als Viroide (viroid = Virus-ähnlich) bezeichnet<sup>[1]</sup>. Der Name ist vor allem deshalb gerechtfertigt, weil die nach einer Inkubationszeit von Wochen oder Monaten (eventuell auch von Jahren) auftretenden Symptome einer Viroid-Infektion durchaus denen ähneln, die von den lange bekannten Pflanzenviren erzeugt werden: Hemmung des Wachstums und Verkrümmung oder auch Gelbfärbung der Blätter. Auch die Früchte und Knollen der befallenen Pflanzen können verändert sein, z. B. gelbe Gurken oder spindelförmige Kartoffeln.

Viroide scheinen sich überwiegend durch die Tätigkeit des Menschen auszubreiten, und zwar durch die Werkzeuge, die zum Beschneiden, Veredeln, Ernten etc. verwendet werden. Auch eine Übertragung der Infektion ohne Einwirkung des Menschen, z. B. durch Blütenstaub bei der Befruchtung, ist recht wahrscheinlich.

Insbesondere sind manche Pflanzenkulturen in Entwicklungsländern durch Viroid-Infektionen erheblich gefährdet. So werden auf den Philippinen beispielsweise Kokospalmen-Haine durch das Cadang-Cadang-Viroid vernichtet. Eine Behandlung von Pflanzen mit Krankheitssymptomen ist bisher nicht möglich. Man ist daher bestrebt, die Ausbreitung zu verhindern und Viroid-freie Pflanzen für die Gewinnung von Saatgut zu finden.

Viroide konnten bisher nur in höheren Pflanzen nachgewiesen werden. Ausgehend von der allgemeinen Verbreitung der bekannten Krankheitserreger (Viren, Bakterien, Mycoplasmen etc.) kann jedoch mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß Viroide oder ähnliche Krankheitserreger auch bei Mensch und Tier gefunden werden.

An Viroiden konnte zum ersten Mal die chemische und physikalische Struktur eines Krankheitserregers eukaryotischer Herkunft detailliert ermittelt werden. Damit ist eine wesentliche Voraussetzung für Untersuchungen zur Replikation und pathogenen Wirkung von Viroiden erfüllt. Im folgenden werden hauptsächlich Strukturuntersuchungen beschrieben, da diese einen gewissen Abschluß erreicht haben; die Vorstellungen zur Replikation und Pathogenese bewegen sich dagegen noch weitgehend im Bereich der Hypothesen und werden daher nur kurz am Schluß behandelt. Leser, die stärker an biologischen und mikrobiologischen Details interessiert sind, seien auf spezielle Übersichten hingewiesen<sup>[14]</sup>.

## 2. Biochemische Charakterisierung

Viroide als kleine, infektiöse und hüllproteinfreie Ribonucleinsäuren wurden unabhängig voneinander durch vier Arbeitsgruppen entdeckt: *T. O. Diener*, Beltsville, USA<sup>[1]</sup>, *R. P. Singh*, Fredericton, Kanada<sup>[2]</sup>, *H. L. Sänger*, Gießen<sup>[3]</sup> und *J. S. Semancik*, Riverside, USA<sup>[4]</sup>. Auf diesen neuen Erregertyp wurde man vor allem durch einige seiner Besonderheiten aufmerksam. Im Gegensatz zu vielen Viren und Bakteriophagen waren die neuen Erreger hochempfindlich ge-

genetisch RNA-abbauende Enzyme (RNasen), verhielten sich jedoch ungewöhnlich resistent gegen organische Lösungsmittel. Daraus schloß man auf die Existenz einer sehr einfach gebauten Ribonucleinsäure. Nach Injektion von Viroid-Präparaten entwickelten Versuchstiere keine Antikörper gegen etwa vermutete Viroid-spezifische Proteine. Auffallend war die hohe Beweglichkeit der Erreger im elektrischen Feld und ihre geringe Mobilität im Zentrifugalfeld, woraus man auf ein ungewöhnlich geringes Molekulargewicht schließen konnte. Von der Beobachtung erkrankter Pflanzen im Kartoffelfeld sowie im Citrus- oder Kokospalmen-Hain bis zur Isolierung reiner Viroide war es jedoch noch ein weiter Weg.

Bevor erfolgversprechende Untersuchungen begonnen werden konnten, mußten Testpflanzen gefunden werden, die sich im Gewächshaus in großer Zahl anziehen lassen und auf eine Viroid-Infektion möglichst schnell mit eindeutigen Symptomen reagieren. Zunächst mußte man sich z. B. beim Citrus-Exocortis-Viroid mit jungen Citrus-Stecklingen behelfen, die erst Monate nach der Infektion Symptome zeigen. Bald wurde jedoch in der jungen Tomatenpflanze ein günstigerer Wirt gefunden. Unter optimalen Bedingungen kann man bereits nach wenigen Wochen Symptome beobachten. Außerdem hat die Tomate eine weitere, sehr willkommene Eigenschaft: Die meisten der bisher bekannten Viroide lassen sich auf ihr vermehren und bringen Symptome hervor, wie sie in Abbildung 2a zu sehen sind.

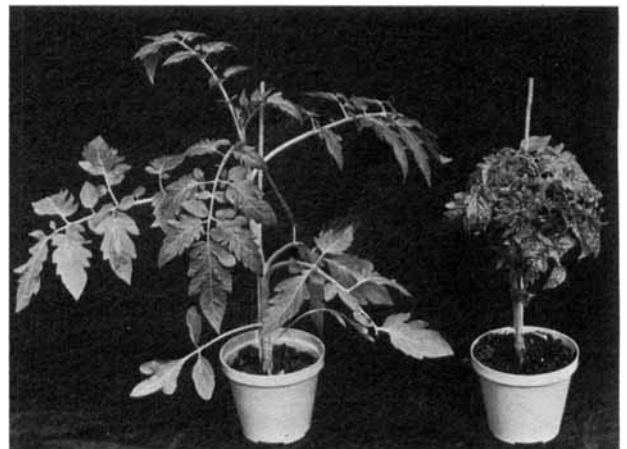


Abb. 2. a) Symptome des Viroid-Befalls. Links gesunde, rechts befallene Tomatenpflanze. b) Infektiositätstest auf Tomatenpflanzen. Die charakteristischen Wachstumsstörungen bei den mittleren Pflanzen zeigen, daß die zur Beimpfung benutzten Fraktionen Viroid enthielten. Von hinten nach vorne wurde mit steigenden Konzentrationen infiziert. (Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Prof. Sänger, Gießen, zur Verfügung gestellt.)

Alle Viroide werden nach einem im Prinzip ähnlichen Schema isoliert<sup>[14,15]</sup>: Blattmaterial wird homogenisiert, mit Phenol extrahiert, und die in der wäßrigen Phase verbleibenden Nucleinsäuren werden mit Ethanol ausgefällt. Dieses Nucleinsäurepräzipitat, das die Infektiosität enthält, wird durch mehrere Fällungs- und Extraktionsschritte von hochmolekularen Nucleinsäuren und insbesondere auch von Polysacchariden befreit, welche die Reinigung erheblich erschweren. Durch mehrfache präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese kann daraus eine Nucleinsäure isoliert werden, die infektiös ist und die in gleichartigen Präparationen aus gesunden Pflanzen fehlt. Bei der Ausarbeitung der Reinigungsverfahren mußten nach jedem Schritt die Viroid-haltigen Fraktionen im biologischen Infektiositätstest identifiziert werden; das bedeutet, daß man zur Analyse eines Fraktionierungsschrittes ganze Serien von Pflanzen infizieren und mehrere Wochen auf Krankheitssymptome warten mußte. Ein solcher Serientest ist in Abbildung 2b zu sehen. Heute kann in Routineuntersuchungen das Auftreten der Viroid-Bande bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese als sicherer Nachweis für Viroide dienen<sup>[15]</sup>. Die Reinigung ist nach wie vor sehr aufwendig und die Ausbeute äußerst gering. Als Durchschnittswert mag gelten, daß aus 5000 infizierten und erkrankten Pflanzen nur etwa 0.1 mg reines Viroid erhalten werden kann. Es mußten daher biochemische und physikalisch-chemische Strukturuntersuchungen an Viroiden mit außerordentlich kleinen Substanzmengen durchgeführt werden.

Für viele Untersuchungen – man denke besonders an die Sequenzierung – ist eine radioaktive Markierung von Viroiden oder Viroid-Fragmenten unerlässlich. Mehrere grundsätzliche Schwierigkeiten waren hierbei zu überwinden: Es war zwar möglich, Viroide in vivo mit dem radioaktiven Phosphorisotop  $^{32}\text{P}$  zu markieren<sup>[16]</sup>; wegen der langsamen Vermehrung der Viroide und wegen der zeitraubenden Isolierung erhielt man dabei jedoch ein Material, dessen spezifische Radioaktivität für detaillierte Strukturuntersuchungen viel zu gering war.

Durch chemische Markierung in vitro kann radioaktives 5-Iod-cytosin erhalten werden. Diese Methode ist mehrfach bei Viroiden benutzt worden<sup>[17–19]</sup>; sie ist jedoch nur beschränkt anwendbar, da nur Cytosin enthaltende Fragmente markiert werden. Allgemein anwendbar bei Viroiden ist bisher nur die enzymatische  $^{32}\text{P}$ -Markierung in vitro<sup>[21–23]</sup>. Diese Methode beruht auf der Übertragung des  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Phosphats aus  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP auf die freie 5'-Hydroxygruppe von Nucleinsäuren und Nucleinsäure-Fragmenten durch 5'-Polynucleotid-Kinase aus  $T_4$ -Phagen-infizierten *E. coli*-Bakterien. Damit mußten jedoch folgende Nachteile und Erschwernisse in Kauf genommen werden: 1.  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP von hoher Reinheit und spezifischer Aktivität mußte regelmäßig im Labor synthetisiert werden. 2. 5'-Polynucleotid-Kinase mußte aus  $T_4$ -Phagen-infizierten Bakterien absolut frei von Ribonucleasen isoliert werden. 3. Die kurze Halbwertszeit von  $^{32}\text{P}$  zwingt ständig zu schnellem Arbeiten. 4. Die Viroid-Präparate hatten möglichst rein zu sein, da die Gefahr besteht, daß kontaminierende Nucleinsäuren in vitro bevorzugt markiert würden.

Eine sehr exakte Charakterisierung einer Viroid-Probe kann durch Spaltung mit spezifischen Ribonucleasen und anschließende Markierung der so erzeugten Oligonucleotide am 5'-Ende mit  $[\text{}^{32}\text{P}]$ -Phosphat erreicht werden. Die zweidi-

mensionale Trennung des Oligonucleotidgemisches und anschließende Autoradiographie führt zu einem „Fingerprint“ (Abb. 3), der wohl den sichersten Nachweis der Reinheit der Viroid-Präparationen ermöglicht<sup>[21]</sup>. Schon wenige Prozent Verunreinigung durch eine RNA des Wirtes führen zur Entstehung vieler zusätzlicher Oligonucleotide, die sich in Form zusätzlicher schwarzer Flecken im Autoradiogramm bemerkbar machen. Auch können anhand dieser Fingerprints verschiedene Viroid-Spezies identifiziert werden. So wurde auch zum ersten Mal nachgewiesen, daß die Viroide, die verschiedene Pflanzenkrankheiten verursachen, eine unterschiedliche Nucleotidsequenz besitzen müssen<sup>[17,21]</sup>.

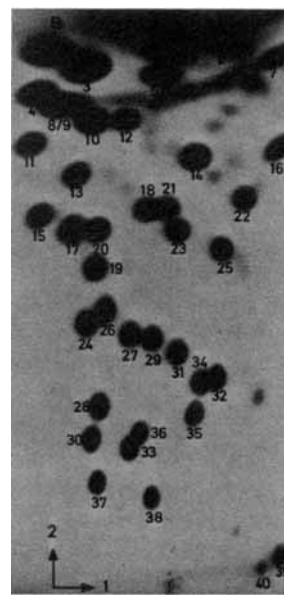


Abb. 3. Fingerprint der Oligonucleotide von PSTV nach Spaltung mit RNase T<sub>1</sub>. PSTV wurde mit RNase T<sub>1</sub> hydrolysiert, und die 3'-terminalen Phosphatreste der resultierenden Oligonucleotide wurden mit Phosphatase entfernt. Nach Inaktivierung der Phosphatase wurden die Oligonucleotide mit  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP und 5'-Polynucleotid-Kinase in vitro radioaktiv markiert und zweidimensional getrennt; 1. Dimension: Elektrophorese bei pH=3.5/5000 V auf Celluloseacetatstreifen [67]; 2. Dimension: Homochromatographie an DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten [68]. Die markierten Oligonucleotide wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht (vgl. auch Abschnitt 4.1). B bedeutet die Position des blauen Farbstoffs Xylen-Cyanol nach optimaler Laufzeit.

### 3. Physikalische Eigenschaften

#### 3.1. Molekulargewicht

Die Größe der Viroide konnte bereits abgeschätzt werden, als deren Isolierung noch längst nicht abgeschlossen war. Dazu wurden die Sedimentationsgeschwindigkeit im Saccharosegradienten und der  $R_s$ -Wert bei Gelelektrophoresen mit den entsprechenden Werten von Ribonucleinsäuren bekannten Molekulargewichts verglichen<sup>[1,3,4,24]</sup>. Die Position der Viroid-Banden mußte wie beschrieben in langwierigen Infektiositätstests ermittelt werden. Bei den genannten Methoden wird primär die Beweglichkeit der Viroide mit denen anderer Nucleinsäuren verglichen; das Molekulargewicht kann demnach nur dann verlässlich bestimmt werden, wenn Viroid und Ribonucleinsäure homologe Strukturen haben, während etwa der Vergleich von kugel- mit stäbchenförmigen Molekülen zu falschen Werten führt. Da zunächst die Form der Viroide unbekannt war, versuchte man teilweise, das Problem durch vollständiges Umwandeln der Nucleinsäure in die einheitliche Struktur des statistischen Knäuels

zu umgehen<sup>[25]</sup>. Wie später gezeigt wurde, stimmt selbst die Struktur geknäuelter Viroide nicht mit der anderer geknäuelter Ribonucleinsäuren überein. Daher ist es auf der einen Seite nicht verwunderlich, daß die Molekulargewichtsangaben in der Literatur von 25000 bis 130000 reichten; auf der anderen Seite wurde aber trotz der großen Ungenauigkeit eindeutig nachgewiesen, daß die neuen Krankheitserreger etwa eine Größenordnung kleiner als der Nucleinsäureanteil der kleinsten Phagen waren und es sich auch von der Größe her um eine neue Klasse molekularer Krankheitserreger handeln mußte. Inaktivierung der Viroide durch UV-Licht oder ionisierende Strahlen ergaben einen strahlensensitiven Trefferbereich mit einem Molekulargewicht von etwa 100000<sup>[26]</sup>.

Nach der vollständigen Reinigung der Viroide konnte das Molekulargewicht in der analytischen Ultrazentrifuge, in der die Konzentrationsverteilung durch die optische Absorption gemessen wird, bestimmt werden<sup>[15]</sup>. Die Methode des Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtes ergibt das Molekulargewicht unabhängig von jeder Voraussetzung über die Form des Moleküls. Diese Untersuchungen führten für die verschiedenen Viroide zu Molekulargewichten zwischen 110000 und 127000. Für das Viroid der Spindelknollensucht der Kartoffel (potato spindle tuber viroid, abgekürzt PSTV), das in Abschnitt 4 eingehend diskutiert wird, wurde  $127000 \pm 5000$  gefunden.

### 3.2. Gestalt

Bei Nucleinsäuren von der Größe der Viroide kann durch hochauflösende Elektronenmikroskopie die Form bestimmt werden. Viroide erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild (Abb. 4a) einheitlich als Stäbchen<sup>[15,27]</sup>. Bei der für Abbildung 4a verwendeten Präparationstechnik liegt die Länge durchschnittlich bei 370 Å und die Dicke bei 20 Å.

Da die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie unter Umständen durch Präparationsartefakte beeinflusst sein könnten, wurde die Gestalt der Viroide auch in hydrodynamischen Experimenten unter physiologischen Bedingungen bestimmt<sup>[15]</sup>. Aus der unabhängigen Ermittlung des Molekulargewichtes und der Sedimentationskonstante läßt sich ein Achsenverhältnis von 20 ableiten – in guter Übereinstimmung mit den elektronenmikroskopischen Befunden.

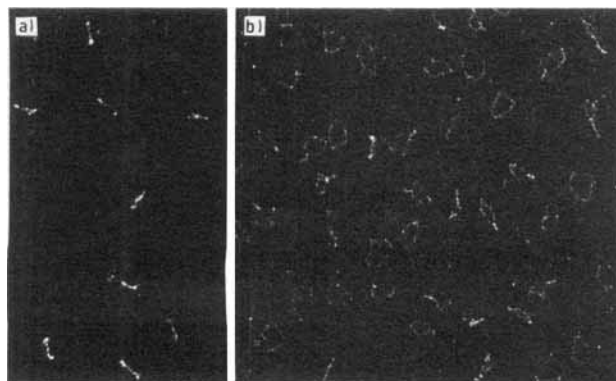


Abb. 4. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Viroiden a) im nativen Zustand: Viroide wurden bei Raumtemperatur mit Benzyldimethylalkylammoniumchlorid gespreitet, mit Uranylacetat kontrastiert und in Dunkelfeldbeleuchtung aufgenommen („alkyl“ =  $C_{12}/C_{16}$  im Verhältnis 60/40); b) im denaturierten oder teilweise denaturierten Zustand: Viroide wurden bei 70 °C in Gegenwart von Harnstoff gespreitet. Vergrößerung 92500fach.

### 3.3. Ringstruktur der Nucleotidkette

In Abschnitt 5 wird detailliert diskutiert werden, wie die Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren zu wohldefinierten Strukturen von Viroiden führt. Hier sei so viel vorweggenommen, daß die charakteristische Doppelhelix, die aus zwei gegenläufigen Strängen aufgebaut ist, sowohl zwischen zwei individuellen Strängen als auch durch Rückfaltung eines einzelnen Stranges entstehen kann. Um die Struktur des Nucleotidstranges ohne Basenpaarung zu untersuchen, werden die Basenpaare durch Harnstoff, durch Formamid oder durch hohe Temperatur getrennt und der Nucleotidstrang auf Wunsch mit Formaldehyd fixiert; danach kann er im denaturierten Zustand untersucht werden. Dabei wurde gefunden, daß das Molekulargewicht im denaturierten und im nativen Zustand gleich ist<sup>[15]</sup> – also können Viroide nur aus einem einzigen Strang bestehen.

Auf den elektronenmikroskopischen Bildern von hochreinen denaturierten Viroiden waren die Stränge fast ausschließlich als Ringe zu sehen<sup>[15]</sup> (Abb. 4b). Die Vermutung lag nahe, daß es sich um kovalent geschlossene Ringe handelte, denn unter den Präparationsbedingungen sollten alle Basenpaare dissoziiert sein. Das Ergebnis konnte auch rein chemisch bestätigt werden<sup>[15]</sup>: Die in Abschnitt 2 beschriebene 5'-Phosphorylierungsreaktion gelingt nämlich am nativen Viroid nicht, und die versuchte Metaperiodat-Oxidation der vicinalen 2'- und 3'-OH-Funktion der Ribose am freien 3'-Ende mit anschließender  $B^3H_4$ -Reduktion, die jedes freie 3'-OH-Ende einer Ribonucleinsäure markiert, führt bei Viroiden ebenfalls nicht zu radioaktivem Einbau. Die Entdeckung der kovalent geschlossenen Ringstruktur der Viroide, die durch elektronenmikroskopische Untersuchungen anderer Laboratorien und an anderen Viroid-Spezies inzwischen bestätigt wurde<sup>[20,28]</sup>, darf als große Überraschung gewertet werden, denn kovalent geschlossene RNA-Ringe waren vorher in der Natur nicht gefunden worden. Nur bei DNA waren bisher Ringe bekannt, jedoch mit viel größeren Molekulargewichten. Kürzlich wurden auch zirkuläre RNA-Moleküle unterschiedlicher Größe im Cytoplasma einiger eukaryotischer Zellen gefunden<sup>[29]</sup>; als Strukturbeweis dienten jedoch bisher nur elektronenmikroskopische Aufnahmen.

Viroid-Präparationen enthalten neben den zirkulären Molekülen einen je nach Präparationsmethode variierenden Anteil linearer Moleküle<sup>[15,28]</sup>. Lineare Moleküle können sehr leicht durch  $Mg^{2+}$ -katalysierte Spaltung aus Ringen entstehen, und die so erzeugten linearen Viroid-Stränge sind sehr wenig oder gar nicht infektiös<sup>[30]</sup>; in welchen Mengen jedoch lineare Viroide natürlicherweise in der befallenen Pflanzenzelle vorkommen, etwa als Vorstufe beim Reifungsprozeß von Viroiden, ist nicht geklärt<sup>[30,31]</sup>.

### 4. Nucleotidsequenz von PSTV

Die vollständige Primärstruktur eines Viroids, des Erregers der Spindelknollensucht der Kartoffel, wurde 1978 zum ersten Mal ermittelt<sup>[23]</sup>. Diese Arbeit mag zunächst im Vergleich zur Sequenzierung des Bakteriophagen MS2<sup>[32]</sup> mit seinen fast 3600 Ribonucleotiden als relativ einfach erscheinen, aber es war, wie bereits erwähnt, im Gegensatz zum MS2-Phagen beim Viroid keine  $^{32}P$ -Markierung in vivo möglich. Außerdem stand die Viroid-RNA nur in minimalen

Mengen zur Verfügung. Da bei Viroiden bisher auch keine vollständige enzymatische Umschreibung mit definiertem Anfang in komplementäre DNA möglich ist, konnten auch nicht die chemischen DNA-Sequenzierungsverfahren angewendet werden, die in den letzten Jahren bis zur Routine ausgearbeitet worden sind<sup>[33]</sup>. Mit einer Sequenzierung allein nach <sup>32</sup>P-Markierung in vitro (siehe Abschnitt 2) mußte daher ein relativ neuer und wenig erprobter Weg beschritten werden.

#### 4.1. Vollständige Hydrolyse mit spezifischen Ribonucleasen

Ein Fingerprint von PSTV nach vollständiger Hydrolyse mit Ribonuclease T<sub>1</sub>, die auf der 3'-Seite von Guanosin spaltet, wurde bereits in Abbildung 3 gezeigt. Wird die Spaltung mit pankreatischer Ribonuclease vorgenommen, die auf der 3'-Seite von Pyrimidinen spaltet, dann erhält man einen anderen charakteristischen Fingerprint<sup>[21]</sup>. Die 40 5'-<sup>32</sup>P-markierten Oligonucleotide des „RNase T<sub>1</sub>“-Fingerprints (Abb. 3) und die 32 entsprechenden Oligonucleotide des „pankreatischen“ Fingerprints wurden einzeln eluiert. Von jedem Oligonucleotid wurde zunächst das 5'-terminale Nucleotid identifiziert. Vollständige Hydrolyse der einzelnen Oligonucleotide mit Nuclease P<sub>1</sub><sup>[34]</sup> ergibt 5'-Mononucleotide, von denen nur dasjenige jeweils eine 5'-<sup>32</sup>P-Markierung trägt, welches vom (markierten) 5'-Ende des Oligonucleotids stammt. Dieses wird durch Dünnschichtchromatographie mit authentischen Nucleotiden und Autoradiographie des Chromatogramms identifiziert. Die Reihenfolge der Nucleotide eines 5'-<sup>32</sup>P-markierten Oligonucleotids erhält man durch kontrollierte Spaltung mit Nuclease P<sub>1</sub>. Diese Spaltung muß so gelenkt werden, daß im Idealfall bei den meisten Oligonucleotiden statistisch nur eine der Phosphodiesterbindungen gespalten wird, wobei ein geringer Anteil überhaupt noch nicht angegriffen wird. Das Gemisch der Abbauprodukte wird wieder durch Elektrophorese und Chromatographie zweidimensional getrennt und das Chromatogramm autoradiographiert. Die elektrophoretische Mobilität von Oligonucleotiden in der ersten Dimension hängt von der Basenzusammensetzung ab. Die Laufstrecke der Oligonucleotide in der zweiten Dimension ist annähernd umgekehrt proportional der Kettenlänge, d. h. das längste Oligonucleotid hat die geringste chromatographische Beweglichkeit. Der Verlust eines oder mehrerer Nucleotide vom 3'-Ende äußert sich in der Autoradiographie des entsprechenden Chromatogramms durch ein spezifisches Abbau-Muster (Abb. 5a). Daraus kann die Nucleotidsequenz unter Berücksichtigung der Abstände und Winkel zwischen aufeinanderfolgenden Abbauprodukten direkt abgelesen werden.

#### 4.2. Partialhydrolyse

Nun mußten die Oligonucleotide der pankreatischen und der RNase-T<sub>1</sub>-Spaltung zu einer Gesamtsequenz geordnet werden. Bei einer „normalen“, linearen RNA würde man das 5'- oder das 3'-Ende enzymatisch mit [<sup>32</sup>P]-Phosphat markieren und mit verschiedenen Verfahren die vollständige Struktur von beiden Enden her vorgehend erarbeiten. Bei der zirkulären Viroid-RNA mußte ein anderer Weg beschritten werden. Wenige Mikrogramm PSTV wurden unter verschiedenen Bedingungen mit jeweils verschiedenen Enzy-

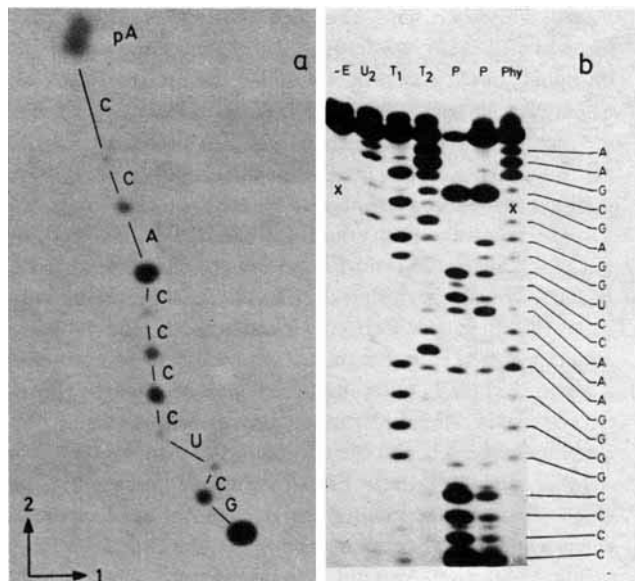


Abb. 5. Sequenzanalyse 5'-<sup>32</sup>P-markierter RNA-Fragmente. a) Das Fragment Nr. 37 aus dem RNase-T<sub>1</sub>-Fingerprint von PSTV (Abb. 3) wurde mit Nuclease P<sub>1</sub> [34] kontrolliert gespalten, so daß ein Gemisch von Abbauprodukten entsteht, die alle am 5'-Terminus <sup>32</sup>P-markiert sind und sich in ihrer Kettenlänge unterscheiden. Nach zweidimensionaler Trennung (Elektrophorese/Homochromatographie) und Autoradiographie kann die Reihenfolge der Nucleotide aus den Mobilitätsunterschieden benachbarter Oligonucleotide (in 5'-3'-Richtung von oben nach unten) direkt abgelesen werden [35]. b) Das PSTV-Fragment Nr. 69 (siehe Abb. 7) wurde in acht aliquote Anteile aufgeteilt. Diese wurden mit den RNasen U<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, pankreatischer RNase (P) und Phy I kontrolliert gespalten, um anschließend die Adenosine, Guanosine, Pyrimidine und Cytidine durch Elektrophorese an Polyacrylamid und Autoradiographie lokalisieren zu können [36, 37]. Die Nucleotidsequenz kann (in 5'-3'-Richtung von unten nach oben) direkt aus dem Autoradiogramm abgelesen werden. X bedeutet die Position des blauen Farbstoffs Xylen-Cyanol nach optimaler Laufzeit. Die Spaltung mit P wurde zweimal durchgeführt, um optimale Bedingungen zu treffen.

men kontrolliert gespalten, so daß möglichst viele lange PSTV-Fragmente entstehen. Solche Bedingungen sind: Tiefe Temperatur und/oder niedrige RNase-Konzentration, oder hohe Salzkonzentration, wodurch die Sekundärstruktur des



Abb. 6. Trennung langer 5'-<sup>32</sup>P-markierter PSTV-Oligonucleotide. Nach kontrollierter Spaltung von PSTV mit Nuclease aus *S. aureus* und enzymatischer Markierung der Oligonucleotide wurden diese durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt. 1. Dimension: 10proz. Polyacrylamid, pH=3.5; 2. Dimension: 20proz. Polyacrylamid, pH=8.3 [69, 70]. Die Oligonucleotide wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und durch Ausschneiden und elektrophoretische Elution isoliert.

Viroids stabilisiert wird. Das Gemisch solcher langen Fragmente wurde dann, wiederum nach 5'-Markierung mit [<sup>32</sup>P]-Phosphat, durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt. Ein entsprechendes Autoradiogramm ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Durch Ausschneiden winziger Stücke können aus dem Polyacrylamidgel nach elektrophoretischer Elution gewöhnlich 50 bis 70 lange 5'-markierte Viroid-Fragmente rein erhalten werden. Die Nucleotidsequenz solcher langer Viroid-Fragmente aus ca. 20 bis über 100 Nucleotiden wurde mit elektrophoretischen Verfahren erarbeitet, die in letzter Zeit entwickelt worden sind<sup>[36, 37]</sup>. Ein aliquoter Anteil eines Fragments wird mit der Guanosin-spezifischen RNase T<sub>1</sub> unter limitierenden Bedingungen gespalten. Von den Abbauprodukten des ursprünglichen RNA-Fragments werden nur diejenigen in der Autoradiographie sichtbar, die am 5'-Ende <sup>32</sup>P-markiert sind und am 3'-Ende einen Guanosin-Rest enthalten. Die Anzahl der Fragmente entspricht der Zahl der Guanosin-Reste; die Länge der Fragmente hängt vom Abstand dieser Guanosine vom [5'-<sup>32</sup>P]-Phosphat ab. Die elektrophoretische Trennung dieses Hydrolysats in 0.35 mm dünnen Polyacrylamid-Schichten ergibt ein Bandenmuster, aus dem die Anordnung von Guanosinen in einer Sequenz abgelesen werden kann (Abb. 5b).

Weitere aliquote Anteile des RNA-Fragments werden entsprechend mit RNase U<sub>2</sub> oder mit pankreatischer RNase behandelt, um die Adenosine bzw. die Pyrimidine in einer Sequenz zu lokalisieren. Zur Unterscheidung von Uridin und Cytidin dienen die RNase Phy I aus *Physarum polycephalum*<sup>[38]</sup> oder die Endonucleasen aus *Staphylococcus aureus* und aus *Neurospora crassa*<sup>[39]</sup>. Mit RNase T<sub>2</sub>, die jede Phosphodiesterbindung spaltet, erhält man das Zählraster (Abb. 5b).

#### 4.3. Überlappende Fragmente und vollständige Sequenz

Da Fragmente sequenziert wurden, die aus Partialsplattungen mit Nucleasen unterschiedlicher Basenspezifität stammten, überdecken verschiedene Fragmente sehr oft den gleichen Sequenzabschnitt des Viroids. Die Kreissegmente in Abbildung 7 zeigen einen großen Teil der sequenzierten Fragmente. Anhand der überlappenden Sequenzen konnten die Teilsequenzen zur vollständigen Sequenz des PST-Viroids zusammengefügt werden (äußerer Kreis in Abb. 7). Da die Überlappungen den gesamten zirkulären Viroid-Strang überdecken, beweist die Sequenzanalyse endgültig die Ringstruktur des PST-Viroids.

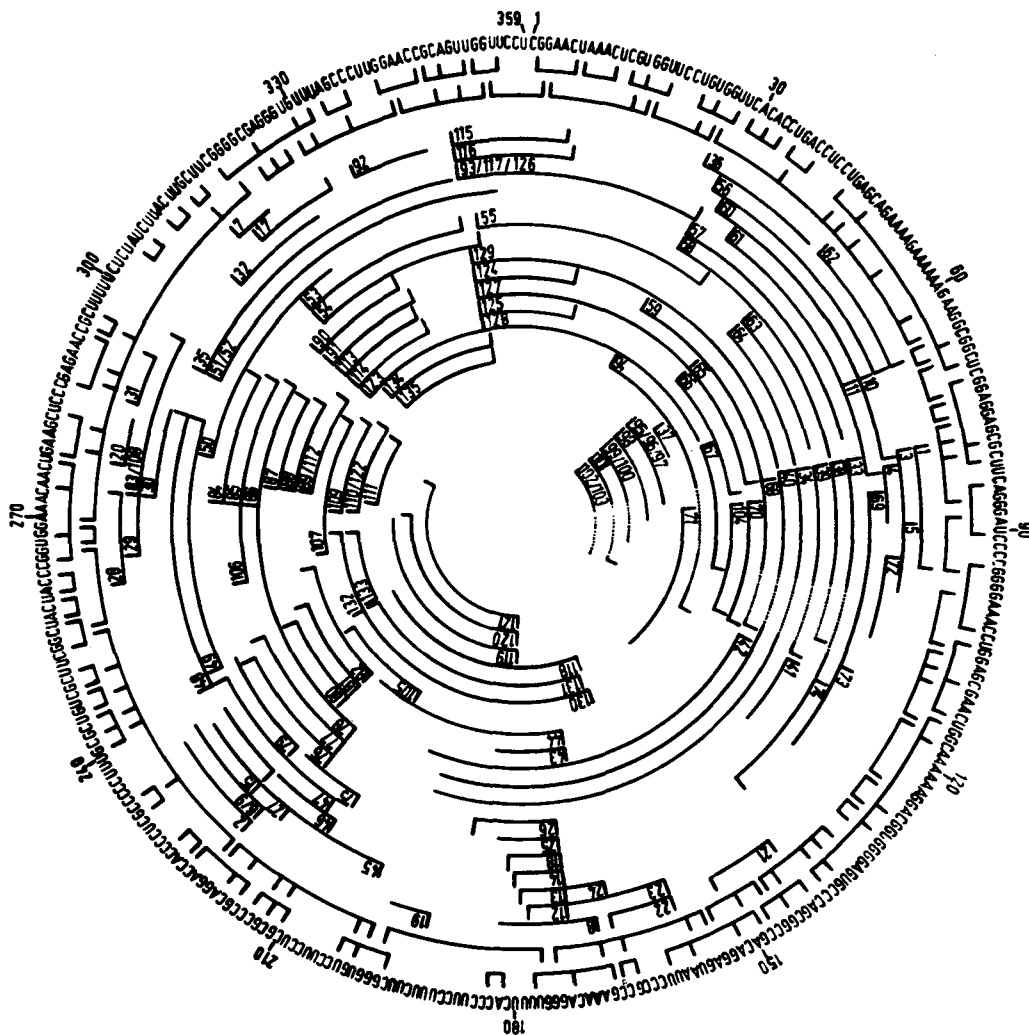


Abb. 7. Primärstruktur von PSTV. Die Nucleotide wurden im Uhrzeigersinn von 1 bis 359 numeriert. Die Klammern in den beiden äußeren Kreisen markieren die Produkte der vollständigen Spaltung mit RNase A bzw. RNase T<sub>1</sub>. Die numerierten Segmente im Inneren bezeichnen lange PSTV-Fragmente, deren Nucleotidsequenz ermittelt wurde. Aus der Kombination dieser Informationen ergibt sich die außen geschriebene zirkuläre Primärstruktur von PSTV.

## 5. Struktur in Lösung

### 5.1. Strukturhierarchie von Nucleinsäuren

Die Nucleotidsequenz, auch Primärstruktur genannt, ist die unterste Stufe einer Strukturhierarchie, die als höhere Stufen die Sekundär- und die Tertiärstruktur umfaßt. Das Konzept einer Strukturhierarchie ist je nach Typ des Makromoleküls unterschiedlich, da die Strukturen durch verschiedene Arten von Wechselwirkungen stabilisiert werden und sich die sterischen Restriktionen unterscheiden (für Proteine vgl. [40]). Das Sekundärstrukturelement von Nucleinsäuren ist die Watson-Crick-Doppelhelix, in der gegenüberstehende Adenin- und Uracil- (bei DNA Thymin-)Basen über zwei sowie Guanin- und Cytosinbasen über drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. In Doppelhelices mit nicht vollkommen komplementärer Sequenz treten auch Guanin/Uracil-Paare auf. Als Sekundärstruktur einer Nucleinsäure wird das gesamte zweidimensionale Schema aller möglichen Basenpaare bezeichnet. Basenpaare bilden sich dabei nur durch einfache Rückfaltung eines Einzelstranges oder durch Zusammenlegen zweier Einzelstränge. Es sollen keine Basenpaare zwischen weiter entfernten Einzelstrangbereichen, deren Nachbarschaft in sich schon hochstrukturiert ist, geformt werden. Zur Verdeutlichung wird in Abbildung 8a eine typische Sekundärstruktur gezeigt; die zusätzlichen Basenpaare in Abbildung 8b – sofern sie sterisch überhaupt möglich wären – werden dagegen nicht mehr als Sekundärstruktur bezeichnet.

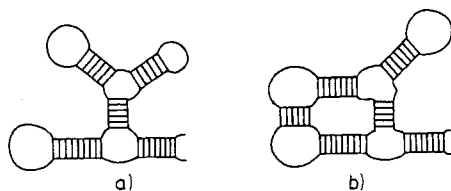


Abb. 8. Beispiele für die Sekundärstruktur von Nucleinsäuren. a) Nucleinsäure mit reiner Sekundärstruktur, b) Nucleinsäure mit Sekundär- und Tertiärstruktur.

Die Sekundärstruktur ist damit ein theoretisches Modell, das den Zustand niedrigster freier Energie beschreibt und nur „normale“ AU-, GC- und GU-Basenpaare berücksichtigt.

Wenn als Tertiärstruktur allgemein die dreidimensionale Struktur eines Makromoleküls bezeichnet wird, besitzt konsequenterweise jede Nucleinsäure eine Tertiärstruktur. Wir möchten hier eine etwas engere Definition benutzen: Mit Tertiärstruktur werden solche Strukturen bezeichnet, die durch Wechselwirkungen hervorgerufen werden, die nicht durch die Sekundärstruktur bedingt sind. Als Beispiel wäre die Zusammenfaltung der Kleeblatt-Sekundärstruktur der Transfer-RNA zur kompakten Tertiärstruktur, wie sie aus der Röntgen-Strukturanalyse bekannt ist<sup>[41, 42]</sup>, zu nennen. Jedes chemische oder physikalische Experiment zur Ermittlung der Struktur ist ein Test auf Sekundär- und Tertiärstruktur gleichzeitig.

### 5.2. Sekundärstruktur von PSTV

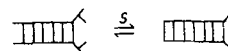
Die Suche nach der energetisch günstigsten Sekundärstruktur vollzieht sich in zwei Schritten: Zunächst werden sy-

stematisch Modelle mit hohem Basenpaarungsgrad entworfen, und dann wird für jedes dieser Modelle die Differenz der freien Energie im Vergleich zum völlig ungepaarten Zustand berechnet. Für den ersten Schritt hat sich ein halb computerisiertes, halb graphisches Verfahren<sup>[43]</sup>, das für die Anwendung auf eine Ringstruktur geringfügig modifiziert wurde, bewährt<sup>[44]</sup>. Bei diesem Verfahren werden in einer Matrizendarstellung alle möglichen intramolekularen Helices aufgelistet und aus diesen Helices Gesamtstrukturen entworfen. In erster Näherung gilt als Kriterium für eine günstige Gesamtstruktur eine möglichst hohe Gesamtzahl an Basenpaaren, wobei aber auch Strukturen mit 10–20% weniger

Tabelle 1. Stabilitätsparameter von Ribonucleinsäuren. Die Werte für die Gleichgewichtskonstanten sowie Reaktionsenthalpien und -entropien können aus der Literatur entnommen werden [45]. Die Parameter der Fortsetzung von Basenpaaren (siehe 1) hängen nicht nur vom Typ des zu schließenden Basenpaares ab, sondern auch vom Typ des vorhergehenden. Zur Schleifenbildung (siehe 2) tragen der Faktor  $\gamma$ , der die Wahrscheinlichkeit der Basenpaarung nach Annäherung der Basen auf einen bestimmten Abstand beschreibt, und die Schleifengleichgewichtsfunktion  $\rho(p+1)$  bei, die die Wahrscheinlichkeit der Annäherung im Hinblick auf die Geometrie der Schleife beschreibt.  $l_{\text{tot}}$  = Gesamtzahl der Nucleotide des Moleküls.

#### 1) Basenpaarung

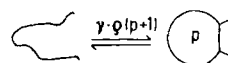
$\Delta G_{\text{GC}}, \Delta G_{\text{GA}}, \Delta G_{\text{AA}}^{\circ}$  experimentell  
CC CU UU



#### 2) Schleifenbildung

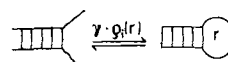
##### a) Haarnadeln

$p < 13$ : experimentell,  
Monte-Carlo-Rechnungen  
 $p \geq 13$ :  $\rho(p+1) = 0.319 \cdot p^{-3/2}$



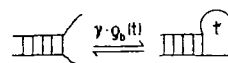
##### b) Interne Schleifen

$r \leq 8$ : experimentell  
 $r > 8$ :  $\rho_i = \rho(r+1)$



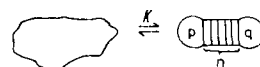
##### c) Einseitige Schleifen

$t \leq 8$ : experimentell  
 $t > 8$ :  $\rho_h(t) = \rho(t+1)$



#### 3) Basenpaarung in Ringen

$$K = \gamma \frac{\rho(p+1) \cdot \rho(q+1)}{\rho(l_{\text{tot}})} \cdot s^{n-1}$$



Basenpaaren in den zweiten, quantitativen Schritt zur Berechnung der freien Energie einbezogen werden.

Dazu betrachtet man die Gesamtstruktur als Produkt einer vielstufigen Folgereaktion bekannter Elementarreaktionen und addiert alle Beiträge zur freien Energie der Gesamtstruktur. Die Elementarreaktionen mit ihren thermodynamischen Größen – aus vielen Untersuchungen an Oligonucleotiden bekannt – sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Abbildung 9 zeigt die günstigste Sekundärstruktur des PST-Viroids<sup>[23, 44]</sup>. Diese Struktur ist energetisch weit vor allen anderen Möglichkeiten ausgezeichnet. Geringfügige Verschiebungen in Bereichen kleiner Helices und großer Schleifen sind möglich, aber thermodynamisch unwahrscheinlich<sup>[44]</sup>. Strukturen mit Verzweigungen nach Art des Schemas in Abbildung 8 verringern die Zahl der Basenpaare um mindestens 30 und ergeben eine um 50% ungünstigere freie Energie. Bei tiefen Temperaturen ist die thermodynamisch günstigste Struktur diejenige mit der größtmöglichen Zahl von Basenpaaren. Tatsächlich konnte nach Abschluß der Sequenzierungsarbeiten ein Modell allein aufgrund maximaler



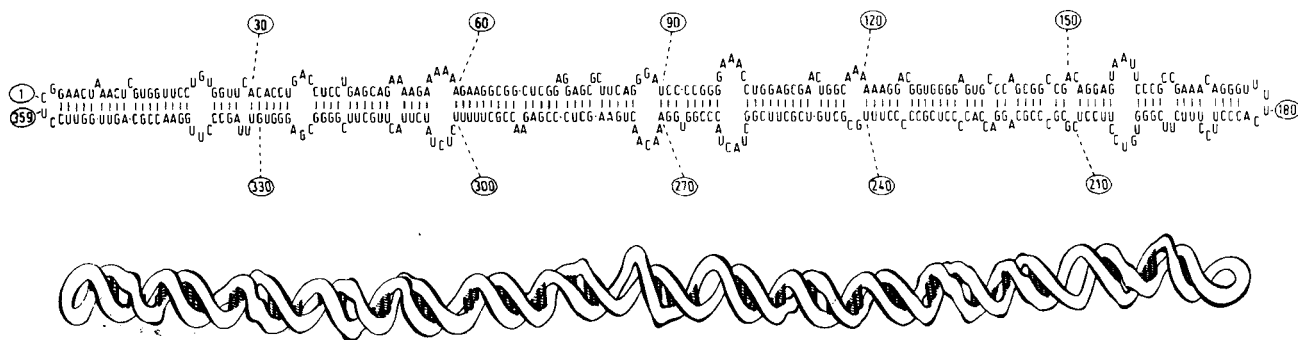


Abb. 9. Struktur von PSTV. Oben: Basenpaarungsschema; unten: dreidimensionale Darstellung.

Basenpaarung unter Berücksichtigung der chemischen und enzymatischen Zugänglichkeit der einzelsträngigen Regionen (vgl. Abb. 10) angegeben werden<sup>[23]</sup>, das mit dem thermodynamisch optimierten Modell fast übereinstimmt.

### 5.3. Experimente zur Sekundär- und Tertiärstruktur von PSTV

Eine Reihe von chemischen, physikalischen und enzymatischen Methoden, die bereits an anderen Nucleinsäuren erfolgreich angewendet wurden, konnten mit geringfügigen Modifikationen für Viroide übernommen werden. Sie sollen hier nicht im Detail beschrieben werden; ihre prinzipielle Methodik ist vielmehr in der schematischen Darstellung in Abbildung 10 angedeutet. Hinzuzurechnen sind die thermodynamischen und kinetischen Methoden, denen Abschnitt 6 gewidmet ist. Es wurden auch NMR-Untersuchungen durch-

geführt, die jedoch aufgrund der geringen Auflösung der Spektren nur die Tatsache der hohen Basenpaarung ohne weitere Details bestätigen konnten<sup>[49]</sup>.

Von den in Abbildung 10 angedeuteten Untersuchungen sollen die Experimente zur Oligonucleotidbindung etwas näher beschrieben werden, da die hier benutzte methodische Variante speziell für die Untersuchungen an Viroiden entwickelt wurde<sup>[48]</sup>. Als besonders effektive Oligonucleotide wurden nämlich spezifische Transfer-RNAs verwendet, die über ihre Anticodontripletts Basenpaare mit komplementären Anticodontripletts<sup>[50]</sup> oder mit einzelsträngigen Bereichen anderer Nucleinsäuren bilden können. Dabei werden Bindungskonstanten zwischen  $10^5$  und  $10^6 \text{ M}^{-1}$  erreicht, etwa eine bis zwei Größenordnungen über denen von Tri- oder Tetranucleotiden. Die Bindung kann in einigen Fällen spektroskopisch, sonst hydrodynamisch verfolgt werden. Auf diese Weise wurde eine Reihe einzelsträngiger Bereiche in der Viroid-Struktur auf ihre Zugänglichkeit zur Bindung an spezifische tRNAs hin abgetastet; die Ergebnisse sind in Abbildung 10a zusammengestellt. Wenn immer Bindung gemäß dem Sekundärstrukturmodell möglich sein sollte, wurde sie auch experimentell verifiziert.

Die Ergebnisse aller Untersuchungen lassen sich auf einen einfachen Nenner bringen. Die Geometrie (aus Elektronenmikroskopie und Hydrodynamik), die freie Zugänglichkeit der doppelsträngigen Bereiche für die Farbstoffbindung und die freie Zugänglichkeit der einzelsträngigen Bereiche für chemische Modifikationen, enzymatische Spaltung und Oligonucleotidbindung zeigen eindeutig, daß das PST-Viroid keine zusätzliche Tertiärstruktur besitzt, die die Geometrie verändern oder die freie Zugänglichkeit einschränken könnte. Man kann daher das Sekundärstrukturmodell un-

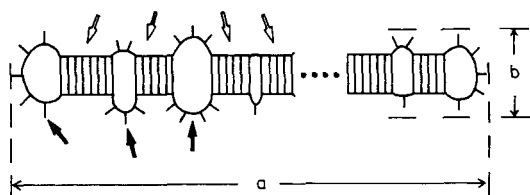


Abb. 10. Struktursonden für Viroide.  $\nabla$ : Zugänglichkeit der Doppelhelices für Farbstoffbindung [44, 46] und doppelstrangspezifische Nucleasen [47]; bei PSTV sind allerdings die Doppelhelices zu kurz, um von der doppelstrangspezifischen RNase III gespalten zu werden [47].  $\blacktriangle$ : Zugänglichkeit der ungepaarten Bereiche für enzymatische Spaltung [22, 23], chemische Modifikation von Cytidin zu Uridin mit Bisulfit [22, 23] sowie Oligonucleotidbindung [48]. a: Länge im elektronenmikroskopischen Bild [15, 25]; a/b: Achsenverhältnis aus der unabhängigen Bestimmung des Molekulargewichtes und des Sedimentationskoeffizienten [15].

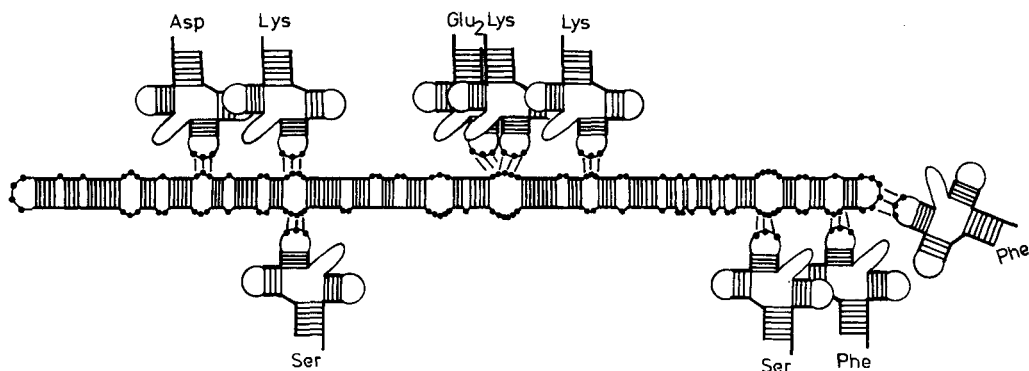


Abb. 10a. Bindung von spezifischen Transfer-RNAs an ungepaarte Bereiche von PSTV. Für alle eingezeichneten tRNA-Spezies wurde experimentell Bindung nachgewiesen. Für zwei weitere Spezies, bei denen keine Bindung nachgewiesen werden konnte, existiert auch keine zum Anticodon komplementäre Sequenz in einer ungepaarten Region von PSTV [48]. tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Lys</sup> und tRNA<sup>Phe</sup> enthalten im Anticodon-Bereich seltene Nucleotide, deren optische Absorption oder Fluoreszenz sich durch die Bindung an das Viroid charakteristisch ändert und die zu einer direkten optischen Titration benutzt wurden.



mittelbar als Grundlage einer dreidimensionalen Darstellung benutzen (Abb. 9b). Näherungsweise bleibt der Eindruck eines Stücks Doppelhelix erhalten; die internen Einzelstrangbereiche sind die Unregelmäßigkeiten in der Struktur, die einerseits dem Molekül eine gewisse Flexibilität verleihen, andererseits aber, wie die tRNA-Bindung zeigt, als wechselwirkungsaktive Bereiche anzusehen sind.

Die Tatsache, daß die Struktur einer RNA wie hier bei PSTV vollständig durch die Wechselwirkungen der Sekundärstruktur charakterisiert ist, ist wohl nicht die Regel, sondern die Ausnahme unter den Ribonucleinsäuren. Transfer-RNA, Messenger-RNA, ribosomale RNA und einzelsträngige virale RNA haben ausgeprägte, teilweise globuläre Tertiärstrukturen, die sich durch die zweidimensionalen Basenpaarungsschemata nur völlig unzureichend charakterisieren lassen. Man sollte auch nicht verschweigen, daß gerade durch die Abwesenheit einer zusätzlichen Tertiärstruktur die Untersuchungen an Viroiden zu eindeutigen Schlußfolgerungen führten und PSTV (vgl. Abschnitt 6) trotz des Molekulargewichts von 120000 einer exakten thermodynamischen und kinetischen Behandlung zugänglich ist.

Als Krönung einer Strukturbeschreibung gilt normalerweise die Röntgen-Strukturanalyse, die einen kompletten Satz von Atomkoordinaten für ein ganzes Viroid liefern könnte, zur Zeit aber aufgrund des Substanzmangels nicht möglich ist. Nur von einer Einkristallanalyse könnte man die genaue Konformation der internen Einzelstrangbereiche erwarten, während sich mit Röntgen-Fiberaufnahmen wohl kaum neue Strukturdetails aufklären ließen. Da nach bisheriger Vorstellung die Einzelstrangbereiche in Lösung flexibel sind, könnte es immerhin möglich sein, daß gerade diese Regionen unscharf erscheinen. Es ist also durchaus nicht sicher, ob sich der enorme Aufwand lohnt.

## 6. Dynamik der Struktur

Die Eigenschaften der Strukturumwandlungen von Nucleinsäuren lassen auf die beteiligten Strukturen rückschließen. Auch in vivo sind Nucleinsäuren keine starren Strukturen, sondern können in mehreren Konformationen funktionell aktiv sein.

### 6.1. Denaturierungskurven

Durch Temperaturerhöhung kann eine Nucleinsäure denaturiert, d. h. vom doppelhelicalen Zustand in den Zustand der geknäuelten Einzelstränge überführt werden. Dieser Übergang läßt sich durch eine Absorptionserhöhung bei 260 nm leicht verfolgen; die zugehörige Kurve wird als optische Denaturierungskurve oder – weniger exakt, aber allgemein üblich – als Schmelzkurve bezeichnet. Solche Kurven sind mehrfach an Viroiden gemessen worden<sup>[15,49,51–54]</sup>. Abbildung 11 zeigt sie zusammen mit Kurven von tRNA<sup>[55]</sup> und doppelsträngiger viraler RNA<sup>[56]</sup>. Phänomenologisch sind Denaturierungskurven durch die Mittelpunktstemperatur ( $T_m$ ), also die Temperatur, bei der die Hälfte der GesamthyPOCHROMIE erreicht ist, und die Übergangsbreite ( $\Delta T_{1/2}$ ), das Temperaturintervall zwischen den halben Höhen der Denaturierungskurve, die einer Gauß-Verteilung ähnelt, charakterisiert. Die enge Korrelation zwischen Struktur und Struk-

turumwandlung ist unmittelbar aus dem Vergleich der drei abgebildeten Kurven ersichtlich. Ohne auf die Theorie der kooperativen Umwandlungen von Biopolymeren quantitativ einzugehen (vgl. hierzu<sup>[55,57,58]</sup>), soll so viel zum allgemeinen Verständnis vorweg geschickt werden: Bei einzelsträngigen Nucleinsäuren wie tRNA und 5S-RNA denaturieren mehrere kurze Doppelhelices geringer Enthalpie (vgl. Abb. 8) näherungsweise unabhängig voneinander, was zu einer Überlagerung von mehreren breiten Umwandlungskurven führt. Im Fall der homogen doppelsträngigen Nucleinsäuren dagegen denaturiert eine große Zahl benachbarter Basenpaare in einem hochkooperativen Prozeß; dadurch wird die Enthalpie vieler Basenpaare in einem einzigen Schritt umgesetzt, und es resultiert gemäß der van't-Hoff-Beziehung ein Übergang in einem sehr schmalen Temperaturbereich.

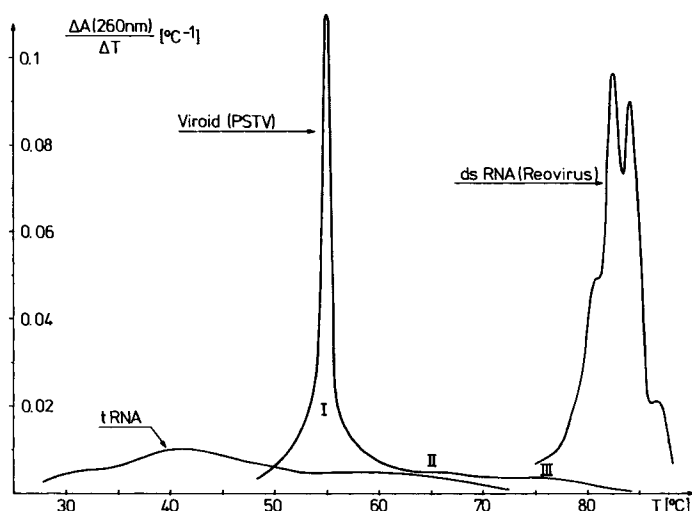


Abb. 11. Optische Denaturierungskurven von PSTV [54], tRNA [55] und doppelsträngiger (ds) RNA aus Reovirus [56]. Die Kurven sind in der heute allgemein gebräuchlichen differenzierten Form dargestellt. Mehrstufige Übergänge sind leicht am Auftreten mehrerer Gipfel zu erkennen. Die Interpretation der mit II und III bezeichneten Bereiche der Kurve von PSTV als getrennte Übergänge folgt aus umfangreichen kinetischen Experimenten [54]. Die Kurven gelten für pH-Wert = 7 und 0.02 M Na<sup>+</sup>.

Viroiden vereinigen zwei thermodynamische Eigenschaften, die nach dem bisher Gesagten gegensätzlich erscheinen. Die Umwandlungstemperatur liegt zwar im charakteristisch niedrigen Bereich der einzelsträngigen Nucleinsäuren, die Kooperativität der Umwandlung ist aber so hoch wie die der homogen doppelsträngigen. In kalorimetrischen Denaturierungskurven, in denen die zusätzliche Wärmekapazität  $\Delta c_p$  gemessen wird, ergab sich ein sehr ähnlicher Kurvenverlauf<sup>[59]</sup>. Der zeitliche Ablauf der Denaturierung, der in Relaxationsmessungen nach dem Temperatursprungverfahren gemessen wurde, war zu 80–90% durch eine homogene Einstufenreaktion zu beschreiben, was die hohe Kooperativität des Übergangs unterstreicht<sup>[52,54]</sup>. Die Denaturierungskurven aller anderen untersuchten Viroiden verhalten sich qualitativ gleich; quantitativ weichen jedoch  $T_m$  und  $\Delta T_{1/2}$  um wenige Grade bzw. Zehntelgrade voneinander ab<sup>[53]</sup>.

Frühere Rechnungen – zu einer Zeit, als die Sequenz des PST-Viroids noch nicht bekannt war – führten zu einem allgemeinen Sekundärstrukturmodell, das diese Eigenschaften erklärt<sup>[53]</sup>. Das Modell beruhte auf den bekannten experimentellen Daten über Viroiden wie  $T_m$ ,  $\Delta T_{1/2}$ , Größe, Ring-

förmigkeit, G:C-Gehalt und kalorimetrisch gemessene Reaktionsenthalpie, basierte aber nicht auf einer speziellen Sequenz. Ausgehend von den Stabilitätsparametern für Ribonucleinsäuren (Tabelle 1) wurden optische Denaturierungskurven berechnet und mit den experimentellen verglichen. Gute Übereinstimmung wurde für ein Modell erreicht, in dem kurze Doppelhelices (vier bis sieben Basenpaare) und kleine ungepaarte Bereiche (zwei bis sechs ungepaarte Basen) in einer unverzweigten Serie angeordnet waren. Ein solches allgemeines Modell ist mit dem spezifischen Modell für PSTV vollkommen in Einklang.

## 6.2. Mechanismus der Denaturierung

Die Eigenschaften der Strukturumwandlung wurden inzwischen nicht nur anhand eines allgemeinen Sekundärstrukturmodells, sondern auch auf der Basis der speziellen PSTV-Struktur interpretiert<sup>[44,54]</sup>. Die verbesserte experimentelle Analyse hatte gezeigt, daß nach Durchlaufen der hochkooperativen Strukturumwandlung noch zwei weitere Strukturumwandlungen meßbar sind (in Abb. 11 mit II und III bezeichnet). Es müssen also nach der Dissoziation des größten Teils der Struktur noch Teilbereiche des Viroids basengepaart sein. Mit kinetischen Methoden konnten trotz der geringen Hypochromie die physikochemischen Parameter und die daraus resultierenden strukturellen Parameter der zugehörigen doppelhelicalen Äste wie Zahl der Basenpaare, Größe der ungepaarten Schleife und G:C-Gehalt bestimmt werden.

Die stabilen Bereiche haben eine für Nucleinsäuren ungewöhnliche Eigenschaft. Aus thermodynamischen<sup>[54]</sup>, enzymatischen<sup>[44]</sup> und elektronenmikroskopischen Untersuchungen<sup>[44]</sup> geht hervor, daß sie nicht Bestandteil der nativen Struktur sind, sondern während des hochkooperativen Übergangs gebildet werden. In Tabelle 2 sind die neugebildeten Schleifenbereiche aufgelistet; berechnete und experimentelle Werte stimmen gut überein. Es gibt keine Restbereiche der nativen Struktur, für die eine ähnliche Übereinstimmung hätte erzielt werden können.

Unter Berücksichtigung der neugebildeten Äste ließ sich der detaillierte Denaturierungsmechanismus von PSTV ableiten (Abb. 12). In einem hochkooperativen Schritt löst sich die gesamte Struktur unter Neubildung von drei stabilen Ästen auf (siehe dazu Tabelle 2). Die im gestrichelten Kasten

dargestellten Zustände sind kinetische Intermediärzustände, da sie nicht in meßbaren Gleichgewichtskonzentrationen vorliegen. Die hier gezeigte Folge der Zwischenzustände ist mit allen experimentellen Ergebnissen, besonders den kinetischen, in Einklang. Alle stabilen Äste entstehen nach dem gleichen Prinzip (siehe Pfeile). Ein bereits denaturiertes Seg-

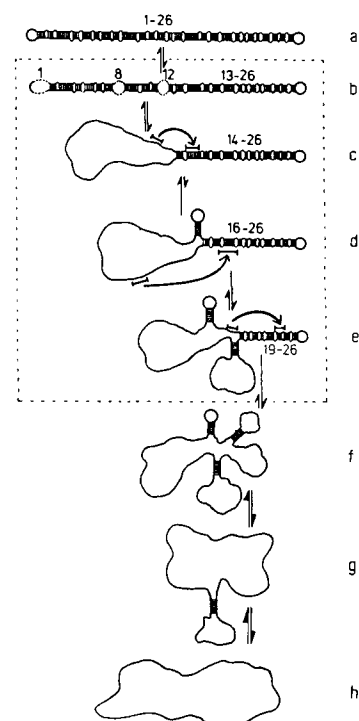


Abb. 12. Denaturierung von PSTV. Die Zahlen 1–26 bezeichnen die 26 Doppelhelices der nativen Struktur. Die Zustände im gestrichelten Kasten (b–e) sind kinetische Intermediärzustände. Die Übergänge a→f, f→g und g→h entsprechen den mit I, II und III bezeichneten Bereichen der Denaturierungskurve in Abb. 11.

ment kann mit einem teilweise in Helices, teilweise in ungepaarten Bereichen befindlichen Segment einen besonders stabilen Ast bilden. Dadurch übt der linke Teil des Moleküls einen stark destabilisierenden Einfluß auf den rechten Teil aus und induziert eine Art weitreichender Kooperativität, ohne daß andere als die bekannten „nächste-Nachbar-Wechselwirkungen“ (siehe Tabelle 1) angenommen wurden. Der Verlauf der Denaturierung läßt sich auch in einem ein-

Tabelle 2. Vergleich von berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Eigenschaften der stabilen Äste von PSTV [54]. Die Berechnungen gelten für 1 M NaCl. Unter diesen Bedingungen können Komplikationen vermieden werden, die aus den Polyelektrolyteigenschaften der Nucleinsäuren resultieren. Die gemessenen Werte sind auf 1 M NaCl extrapoliert [54].

|  | $T_m$ [°C] |      | G:C-Gehalt [%] |        | Schleifengröße |      | Basenpaare |      |
|--|------------|------|----------------|--------|----------------|------|------------|------|
|  | ber.       | gef. | ber.           | gef.   | ber.           | gef. | ber.       | gef. |
|  | 91         |      | 67             |        | 14             |      | 9          |      |
|  | 89–94      |      | 77 ± 5         |        | 20 ± 10        |      | 2 × 7–11   |      |
|  | 95         |      | 75             |        | 24             |      | 9          |      |
|  | 105        | 102  | 90             | 90 ± 5 | 82             | > 40 | 10         | 10   |

fachen  $\Delta G^0(T)$ -Diagramm darstellen (Abb. 13). Ohne Berücksichtigung der stabilen Äste würde man für die native Struktur eine zweistufige Dissoziation mit den Umwandlungstemperaturen  $T_1$  und  $T_2$  berechnen. Ab  $T_1$  ( $< T_1$ ) ist jedoch die verzweigte Struktur die stabilste, die dann stufenweise bei den experimentell gemessenen Werten  $T_{II}$  und  $T_{III}$  dissoziiert. Die halbgeöffnete gestreckte Struktur liegt also bei keiner Temperatur in meßbaren Konzentrationen vor.

Die Dynamik der Viroide ist durch zwei Eigenheiten charakterisiert, die bisher an keiner anderen Nucleinsäure beobachtet werden konnten: Die außergewöhnliche Kooperativität wird durch die Bildung stabiler Schleifen garantiert, und die Hauptkonformationsänderung ist keine einfache Denaturierung durch Trennung von Basenpaaren, sondern ein Übergang zwischen einer gestreckten und einer verzweigten Struktur.

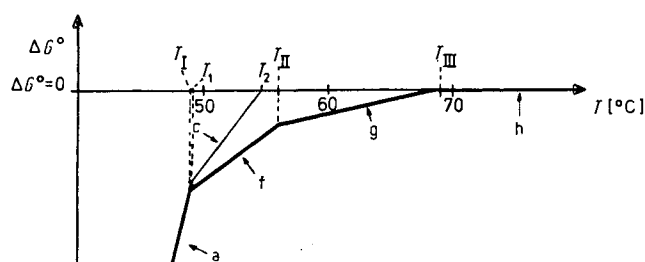


Abb. 13.  $\Delta G^0(T)$ -Diagramm für die Konformationen von PSTV. Die Differenz ist jeweils zum vollständig denaturierten Zustand gebildet. Die dicke Linie gehört zu den thermodynamisch stabilsten Strukturen.  $T_I$ ,  $T_{II}$  und  $T_{III}$  sind die Umwandlungstemperaturen der drei Übergänge (vgl. Abb. 11 und 12). Die dünne Linie zwischen  $T_I$  und  $T_2$  gehört zu einem hypothetischen Zustand, der auftreten würde, wenn bloße Dissoziation und keine Neubildung stabiler Äste möglich wäre.

## 7. Struktur und Funktion

Viroide sind durch eine Kombination von drei strukturellen Eigenschaften vor allen Ribonucleinsäuren ausgezeichnet: Zirkularität, besondere Sekundärstruktur und Dynamik der hochkooperativen Umwandlung. Diese drei Merkmale sind keineswegs voneinander unabhängig zu sehen.

Wieweit läßt sich die an PSTV erarbeitete Struktur auf andere Viroide übertragen? Bei tRNA war die Ermittlung mehrerer Strukturen notwendig, bis das Kleeblatt-Modell weitgehende Anerkennung fand. Bei den Viroiden sind wir in einer ganz anderen Situation: Aus dem Vergleich der thermodynamischen Eigenschaften mehrerer Viroide<sup>[53,54]</sup> kann geschlossen werden, daß sie alle nach demselben Prinzip (entsprechend Abb. 9a und 9b) aufgebaut sind. Modelluntersuchungen an zirkulären RNA-Molekülen der gleichen Größe und Nucleotidzusammensetzung wie Viroide, aber mit statistischer Sequenz, zeigten<sup>[44]</sup>, daß solche Viroid-analogen Strukturen 20 bis 30 Basenpaare weniger als PSTV enthalten, thermisch weniger stabil sind und eine deutlich herabgesetzte Kooperativität der Strukturumwandlungen aufweisen. Wie sich diese theoretische Aussage experimentell äußern würde, ist in der simulierten Denaturierungskurve einer solchen Zufallssequenz (Abb. 14) gezeigt. Der Unterschied drückt sich besonders drastisch in der Kooperativität aus. Die vergleichenden mechanistischen Untersuchungen an Viroiden<sup>[44,54]</sup> haben ergeben, daß das Denaturierungsschema nach Abbildung 12, bei dem eine verzweigte Struktur auftritt, im Prinzip auf alle anderen untersuchten Viroide zu

übertragen ist. Dieses Schema hätte allerdings wenig Chancen, in einer Zufallssequenz verwirklicht zu sein. Die spezifischen Eigenschaften müssen also für jedes Viroid durch eine andere, aber spezielle Nucleotidsequenz vorprogrammiert sein. Nur eine begrenzte Zahl von Nucleotidsequenzen führt

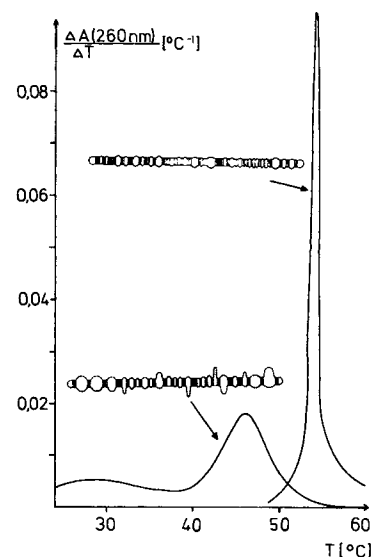


Abb. 14. Thermodynamischer Vergleich von PSTV mit einer Viroid-analogen Zufallssequenz. Die Kurve der Viroid-analogen Zufallssequenz (unten) ist zunächst für 1 M Ionenstärke berechnet und dann auf die Bedingungen der gemessenen Kurve von PSTV (oben, vgl. auch Abb. 11) extrapoliert.

zu Molekülen mit den Eigenschaften der Viroide. Anders als bei tRNA sind also bei Viroiden bereits nach genauer Kenntnis einer einzigen Struktur (Abb. 9) definierte Aussagen über die Struktur weiterer Viroide möglich.

Bisher ist es noch nicht gelungen, den ungewöhnlichen strukturellen und dynamischen Eigenschaften entsprechende biologisch relevante Funktionen zuzuordnen. Wir können somit über solche Zusammenhänge nur Vermutungen anstellen und möchten das weite Feld der teilweise recht gegensätzlichen Hypothesen nicht systematisch abdecken.

Die Bedeutung der Zirkularität ergibt sich aus dem Befund, daß die zirkulären Viroide um mehrere Größenordnungen infektiöser sind als entsprechende lineare Moleküle (siehe Abschnitt 3). Sicherlich bietet die Ringstruktur einen erheblichen Schutz gegen den Angriff von Exonucleasen, also Enzymen, die einen Nucleinsäurestrang vom Ende her abbauen.

Die gestreckte, aus alternierend angeordneten kurzen Helices und ungepaarten, einzelsträngigen Bereichen aufgebaute native Viroid-Struktur ist wohl als ein gelungener Kompromiß zwischen maximaler struktureller Stabilität und funktioneller Flexibilität zu interpretieren. Das bedeutet, daß die native Struktur wenig unterhalb der Umwandlungstemperatur noch vollkommen intakt ist, daß die vollständige Umwandlung aber viel leichter erreicht wird als etwa in homogen doppelsträngiger RNA. Aneinanderreihungen von Doppelhelices und ungepaarten Bereichen, wenn auch wesentlich kürzer als in Viroiden, wurden auch in Replikationsinitiationsbereichen von Phagen-DNA gefunden<sup>[60]</sup>. Wir können allerdings nur vermuten, daß die komplexe Dynamik der Strukturumwandlung eine Funktion bei der Replikation der Viroide haben könnte. Bis heute sind weder die Enzyme des Wirtes bekannt, die an der Replikation der Viroide beteiligt

sind, noch ist eine spezifische Viroid-Replikation im zellfreien System gelungen. Daß hierbei RNA- oder DNA-Polymerasen des Wirts eine wesentliche Rolle spielen, erscheint recht sicher: Die Viroid-RNA ist zu klein, um die Information für die Synthese einer eigenen Polymerase zu enthalten. Aus Inhibitionsversuchen hat man Hinweise, daß die DNA-abhängige RNA-Polymerase II direkt oder indirekt an der Viroid-Replikation beteiligt ist<sup>[61]</sup>. In gesunden Pflanzen bewirkt Polymerase II die Synthese von Messenger-RNA. Die Tatsache, daß Polymerase II im Zellkern lokalisiert ist, könnte mit früheren Befunden korrelieren, daß auch das Viroid in mit Zellkernen angereicherten Fraktionen gefunden wurde<sup>[3,62]</sup>. Allerdings ist bisher keineswegs entschieden, ob der zum Viroid komplementäre Strang in Form von DNA oder RNA vorliegt, ob Viroid-Sequenzen schon Bestandteil des Genoms der gesunden Pflanze sind oder vollkommen neu bei der Infektion in die Zelle eingebracht werden. Für jede dieser – gegensätzlichen – Möglichkeiten sind in der Literatur experimentelle Hinweise zu finden<sup>[63]</sup>. Einige dieser Ergebnisse haben wegen unreiner Proben und Nichtberücksichtigung der speziellen Viroid-Struktur wenig Überzeugungskraft. Der Befund, daß zum Viroid komplementäre Sequenzen in Form von RNA vorliegen und nur in infizierten Pflanzen zu finden sind, hat inzwischen mehreren Nachprüfungen standgehalten. Die zum Viroid komplementäre RNA ist allerdings weder nach Größe noch nach Funktion weitergehend charakterisiert. Intensiv ist auch nach Proteinen, die auf Viroiden codiert sein könnten, gesucht worden. Aus der Sequenz von PSTV könnte man Viroid-codierte Peptide bis zu einer Länge von 283 Aminosäuren ableiten<sup>[23]</sup>; experimentell sind jedoch solche Peptide bisher nicht identifiziert worden. Vieles spricht für die Hypothese, daß Viroide nicht als Informationsträger eines Proteins dienen, sondern allein für ihre eigene Struktur codieren.

## 8. Ausblick

Bei den Viroiden mit ihren ungewöhnlichen strukturellen und dynamischen Eigenschaften ist ein neuartiges Bauprinzip der Natur verwirklicht. Zum ersten Mal ist es gelungen, die vollständige molekulare Struktur eines Krankheitserregers eukaryotischer Herkunft zu ermitteln, eines pathogenen und infektiösen Moleküls, welches wahrscheinlich nur für seine Struktur, nicht aber für eigene Proteine codiert. Da das Prinzip der Viroid-Struktur geklärt erscheint, wird man an mehrere Wege denken, auf denen man dieses exotische biologische System weiter bearbeiten kann:

Da Replikation und pathogene Wirkung der Viroide mit herkömmlichen Vorstellungen kaum in Einklang zu bringen sind, wird in nächster Zeit viel in dieser Richtung getan werden. Man erhofft sich nicht nur ein besseres Verständnis der Viroid-Funktion, sondern erwartet auch eine erweiterte Kenntnis molekularbiologischer Grundlagen.

Der anwendungstechnische Aspekt, der für die Landwirtschaft und das Gärtnereiwesen erhebliche Bedeutung hat, wird in Zukunft stärker betont werden, zumal zu erwarten ist, daß man weitere Pflanzenkrankheiten als Viroid-Infektionen identifizieren können wird. Bisher sind keinerlei Pflanzenschutzmittel gegen diese Infektionen bekannt. Die Kenntnis der Struktur und die fortschreitende Kenntnis der Funktion sollte auch Möglichkeiten für Viroid-spezifische Inhibitoren eröffnen.

Nicht zuletzt sind Viroide auch für medizinische Probleme von großem Interesse. Es ist vielfach vermutet worden, daß Viroid-ähnliche Krankheitserreger auch bei Mensch und Tier vorkommen. Aus dem weiten Feld der Spekulationen sollen die Scrapie-Krankheit des Schafes, die Kuru-Krankheit und das Jacob-Creutzfeldt-Syndrom des Menschen erwähnt werden, da zu diesen Krankheiten die meisten experimentellen Ergebnisse vorliegen. Es handelt sich in den drei genannten Fällen um degenerative Erkrankungen des Zentralnervensystems, die den „slow-virus“-Infektionen zugeordnet werden und deren Erreger bisher nicht identifiziert werden konnten. Aus den widersprüchlichen Ergebnissen ist zumindest herauszulesen, daß es sich um Erreger subviraler Größe handeln muß<sup>[64–66]</sup>. Bei solchen Untersuchungen werden in zunehmendem Maße Viroide als Arbeitshypothese und als Vergleich herangezogen, aber erst die Zukunft wird lehren, ob Viroide als Erregertyp auf Pflanzen beschränkt sind oder ob Ähnliches auch bei Mensch und Tier existiert.

*Die eigenen Arbeiten, die in diesem Beitrag diskutiert wurden, entstammen der sehr engen wissenschaftlichen Kooperation mit Prof. H.-L. Sänger (Gießen). Außerdem waren unsere Mitarbeiter H. Alberty, Dr. H. Domdey, Dr. K. Henco, Dr. P. Jank, J. Langowski, Dr. Ch. Lossow, Dr. M. Raba, U. Rokohl und U. Wild beteiligt. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft und der Fonds der Chemischen Industrie haben das Projekt großzügig gefördert.*

Eingegangen am 8. November 1979 [A 312]

- [1] T. O. Diener, *Virology* 45, 411 (1971).
- [2] R. P. Singh, M. C. Clark, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 1077 (1971).
- [3] H. L. Sänger, *Adv. Biosci.* 8, 103 (1972).
- [4] J. S. Semancik, L. G. Weathers, *Nature New Biol.* 237, 242 (1972).
- [5] M. Hollings, O. M. Stone, *Ann. Appl. Biol.* 74, 333 (1973).
- [6] T. O. Diener, R. H. Lawson, *Virology* 51, 94 (1973).
- [7] C. P. Romaine, R. K. Horst, *Virology* 64, 86 (1975).
- [8] H. J. M. van Dorst, D. Peters, *Neth. J. Plant Pathol.* 80, 85 (1974).
- [9] J. W. Randles, *Phytopathology* 65, 163 (1975).
- [10] J. W. Randles, E. P. Rillo, T. O. Diener, *Virology* 74, 128 (1976).
- [11] M. Sasaki, E. Shikata, *Proc. Jpn. Acad. B* 53, 109 (1977).
- [12] R. A. Owens, D. R. Smith, T. O. Diener, *Virology* 89, 388 (1978).
- [13] W. Thomas, N. A. Mohamed, *Aust. Plant Pathol. Newslett.*, März 1979, 1; J. L. Dale, R. N. Allen, *ibid.* März 1979, 3; P. Palukaitis, T. Hatta, D. M. Alexander, R. H. Symons, *Virology* 99, 145 (1979).
- [14] T. O. Diener, A. Hadidi, R. A. Owens in K. Maramorosch, H. Koprowski: *Methods in Virology*. Academic Press, New York 1977, Vol. 6, S. 185 ff.; E. Dickson in T. C. Hall, J. W. Davies: *Nucleic Acid in Plants*. Vol. V-A., CRC Press, Cleveland, im Druck; T. O. Diener: *Viroids and Viroid Diseases*. Wiley, New York 1979; H. L. Sänger, *Robert-Koch-Mitt.* 1, 71 (1979).
- [15] H. L. Sänger, G. Klotz, D. Riesner, H. J. Gross, A. K. Kleinschmidt, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 3852 (1976).
- [16] H. L. Sänger, K. Ramm in R. Markham, D. R. Davies, D. A. Hopwood, R. W. Horne: *Modifications of the Information Content of Plant Cells*. North Holland, Amsterdam 1975, S. 229 ff.
- [17] E. Dickson, W. Prensley, H. D. Robertson, *Virology* 68, 309 (1975).
- [18] E. Dickson, T. O. Diener, H. D. Robertson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75, 951 (1978).
- [19] E. Dickson, H. D. Robertson, C. L. Niblett, R. K. Horst, M. Zaitlin, *Nature* 277, 60 (1979).
- [20] J. Randles, T. Hatta, *Virology* 96, 47 (1979).
- [21] H. J. Gross, H. Domdey, H. L. Sänger, *Nucleic Acids Res.* 4, 2021 (1977).
- [22] H. Domdey, P. Jank, H. L. Sänger, H. J. Gross, *Nucleic Acids Res.* 5, 1221 (1978).
- [23] H. J. Gross, H. Domdey, Ch. Lossow, P. Jank, M. Raba, H. Alberty, H. L. Sänger, *Nature* 273, 203 (1978).
- [24] R. P. Singh, J. J. Michniewicz, S. A. Narang, *Can. J. Biochem.* 52, 809 (1974).
- [25] T. O. Diener, D. R. Smith, *Virology* 53, 359 (1973).
- [26] J. S. Semancik, T. J. Morris, L. G. Weathers, *Virology* 53, 448 (1973).
- [27] J. M. Sogo, Th. Koller, T. O. Diener, *Virology* 55, 70 (1973).
- [28] W. McClements, P. Kaesberg, *Virology* 76, 477 (1977).
- [29] Hsu Ming-Ta, M. Coca-Prados, *Nature* 280, 339 (1979).

- [30] H. L. Sänger, K. Ramm, H. Domdey, H. J. Gross, K. Henco, D. Riesner, FEBS Lett. 99, 117 (1979).
- [31] R. A. Owens, F. Erbe, A. Hadidi, R. L. Steere, T. O. Diener, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 117 (1977).
- [32] W. Fiers, R. Contreras, F. Duerinck, G. Haegmean, I. Merregaert, W. Min Jou, A. Raeymakers, G. Vokkaert, M. Ysebaert, J. van de Kerckhove, F. Nolf, M. van Montagu, Nature 256, 273 (1975).
- [33] A. M. Maxam, W. Gilbert, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 560 (1977).
- [34] M. Fujimoto, A. Kuninaka, H. Yoshino, Agric. Biol. Chem. 9, 1555 (1974).
- [35] M. Silberklang, A. Prochiantz, A.-L. Haenni, U. L. RajBhandary, Eur. J. Biochem. 72, 465 (1977).
- [36] H. Donis-Keller, A. M. Maxam, W. Gilbert, Nucleic Acids Res. 4, 2527 (1977).
- [37] A. Simoncsits, G. G. Brownlee, R. S. Brown, J. R. Rubin, H. Guilley, Nature 269, 833 (1977).
- [38] D. Pilly, A. Niemeyer, M. Schmidt, J. P. Bargetzi, J. Biol. Chem. 253, 437 (1978).
- [39] G. Krupp, H. J. Gross, Nucleic Acids Res. 6, 3481 (1979).
- [40] G. E. Schulz, Angew. Chem. 89, 24 (1977); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 16, 23 (1977).
- [41] A. Rich, U. L. RajBhandary, Annu. Rev. Biochem. 45, 805 (1976).
- [42] S.-H. Kim, Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 17, 181 (1976).
- [43] I. Tinoco, Jr., O. C. Uhlenbeck, M. D. Levine, Nature 230, 362 (1971).
- [44] D. Riesner, K. Henco, U. Rokohl, G. Klotz, A. K. Kleinschmidt, H. Domdey, P. Jank, H. J. Gross, H. L. Sänger, J. Mol. Biol. 133, 85 (1979).
- [45] Stabilitätsparameter von Ribonucleinsäuren sind z. B. enthalten in: P. N. Borer, B. Dengler, I. Tinoco, Jr., O. C. Uhlenbeck, J. Mol. Biol. 86, 843 (1974); J. Gralla, D. M. Crothers, *ibid.* 73, 497 (1973); D. Pörschke, O. C. Uhlenbeck, F. H. Martin, Biopolymers 12, 1313 (1973); J. Gralla, D. M. Crothers, J. Mol. Biol. 78, 301 (1973); H. Rubin, N. R. Kallenbach, J. Chem. Phys. 62, 2766 (1975); J. E. Scheffler, E. L. Elson, R. L. Baldwin, J. Mol. Biol. 48, 145 (1970). Eine Diskussion über die Verwendbarkeit der teilweise voneinander abweichenden Parameter für die Berechnung der Stabilität von Viroiden findet sich in [44, 53, 54].
- [46] R. P. Singh, R. E. Williams, Can. J. Biochem. 56, 934 (1978).
- [47] E. Dickson, Thesis, Rockefeller University, New York 1976.
- [48] U. Wild, K. Ramm, H. L. Sänger, D. Riesner, Eur. J. Biochem. 103, 227 (1980).
- [49] J. S. Semancik, T. J. Morris, L. G. Weathers, B. F. Rodorf, D. R. Kearns, Virology 63, 160 (1975).
- [50] H. Grosjean, D. G. Soll, D. M. Crothers, J. Mol. Biol. 103, 499 (1976).
- [51] T. O. Diener, Virology 50, 606 (1972).
- [52] K. Henco, D. Riesner, H. L. Sänger, Nucleic Acids Res. 4, 177 (1977).
- [53] J. Langowski, K. Henco, D. Riesner, H. L. Sänger, Nucl. Acids Res. 5, 1589 (1978).
- [54] K. Henco, H. L. Sänger, D. Riesner, Nucleic Acids Res. 6, 3041 (1979).
- [55] D. Riesner, R. Römer in J. Duchesne: Physico-chemical Properties of Nucleic Acids, Academic Press, London 1973, Vol. II, S. 237ff.
- [56] G. Steger, H. Müller, D. Riesner, Biochim. Biophys. Acta, im Druck.
- [57] J. Engel, G. Schwarz, Angew. Chem. 82, 468 (1970); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 9, 389 (1970).
- [58] D. Poland: Cooperative Equilibria in Physical Biochemistry. Clarendon Press, Oxford 1978.
- [59] H. Klump, D. Riesner, H. L. Sänger, Nucleic Acids Res. 5, 1581 (1978).
- [60] Eine umfassende Darstellung befindet sich in: „DNA: Replication and Recombination“, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43 (1979).
- [61] H.-P. Mühlbach, H. L. Sänger, Nature 278, 185 (1979).
- [62] T. O. Diener, Virology 43, 75 (1971).
- [63] Diskussion der experimentellen Details zu diesen Möglichkeiten: T. O. Diener, Science 205, 859 (1979).
- [64] St. Prusiner, W. J. Hadlow, D. E. Garfin, S. P. Cochran, J. R. Baringer, R. E. Race, C. M. Eklund, Biochemistry 17, 4993 (1978).
- [65] T. G. Malone, R. F. Marsh, R. P. Hanson, J. S. Semancik, Nature 278, 575 (1979).
- [66] C. Gibbs, D. C. Gajdusek, R. Latarjet, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 6268 (1978).
- [67] F. Sanger, G. G. Brownlee, B. G. Barrell, J. Mol. Biol. 13, 373 (1965).
- [68] G. G. Brownlee, F. Sanger, Eur. J. Biochem. 11, 395 (1969).
- [69] R. E. Lockard, B. Alzner-DeWeerd, J. E. Heckman, J. MacGree, M. W. Tabor, U. L. RajBhandary, Nucleic Acids Res. 5, 37 (1978).
- [70] R. T. Walker, U. L. RajBhandary, Nucleic Acids Res. 5, 57 (1978).

## Photochemische Umlagerungen und Fragmentierungen von Benzol-Derivaten und anellierten Arenen

Von Gerd Kaupp<sup>[\*]</sup>

In diesem Aufsatz werden die zahlreichen, häufig nur in der Originalliteratur genannten intramolekularen Reaktionen elektronisch angeregter Benzolderivate – geordnet nach Reaktionstypen – systematisch analysiert. Es können alle bekannten Reaktionstypen berücksichtigt werden. Sie gliedern sich in Reaktionen des Benzolrings (Ionisierung, Ringöffnung, Ringveranderung), Reaktionen mit Seitenkettenbeteiligung ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Spaltungen, Homolyse, Heterolyse), Reaktionen von Substituenten mit Seitenketten (Cyclisierung, Entalkylierung, Schutzgruppenabspaltung) und Reaktionen von Seitenketten mit dem aromatischen Ring (Substitution, Addition, Entaromatisierung, Cyclisierung). Die Wahl zwischen energetisch möglichen konkurrierenden Reaktionen wird überwiegend von geometrischen Faktoren bestimmt. Die Anwendungen der empirischen Effekte in der preparativen Chemie sind sehr vielseitig. Zahlreiche hier besprochene Reaktionen werden bereits industriell ausgewertet (z. B. in der Photochromie, UV-Stabilisierung, Photographie, Informationsspeicherung, Druck-, Lackierungs- und Polymertechnologie sowie Pharmazie).

### 1. Einleitung

Das Gebiet der Arenphotochemie ist ungewöhnlich stark bearbeitet worden. Alle Benzolderivate absorbieren Licht in bequem zugänglichen Wellenlangsbereichen. Ein großer Teil der vielen Reaktionstypen kann bisher nur der Original-

literatur entnommen werden. Daß angeregte Moleküle zwischen diesen Reaktionstypen sowie Lumineszenz und chemisch unproduktiven Desaktivierungen wählen müssen, ist eine Folge der meist hohen Energieüberschüsse nach der Lichtabsorption. Die Fülle des Materials verlangt nach einer Ordnung. Mit theoretischen Konzepten läßt sich derzeit offenbar nur ein Teil der intramolekularen photochemischen Reaktionen der Arene systematisieren<sup>[1]</sup> – und selbst dabei besteht die Gefahr, daß die Untergruppe der „verbotenen

[\*] Prof. Dr. G. Kaupp  
Chemisches Laboratorium der Universität  
Albertstrae 21, D-7800 Freiburg