

**Begrenzung von Heterologer Enkapsidierung und
Rekombination bei Pathogen-vermittelter Resistenz gegen
das *Plum pox virus* der Pflaume (PPV)**

Vom Fachbereich Gartenbau
der Universität Hannover
zur Erlangung
des akademischen Grades eines

**Doktors der Gartenbauwissenschaften
- Dr. rer. hort. -**

Genehmigte Dissertation von
Dipl.-Ing. agr. Mark Varrelmann
geboren am 10.05.1967 in Celle

angefertigt am
Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz

Hannover im Juni 1999

Referent:

Prof. Dr. Edgar Maiß

Koreferent:

Prof. Dr. Günter Adam

Tag der Promotion: 08.11.1999

Für Lisa und Inga

“I’ve learned to think like a virus; no neurons, a lot of sex, and a lot of errors”

John J. Holland

(Roossinck, M.J., 1997)

Abstract (deutsch):

Begrenzung von Heterologer Enkapsidierung und Rekombination bei Pathogen-vermittelter Resistenz gegen das *Plum pox virus* der Pflaume (PPV)

In dieser Arbeit wurden modifizierte Hüllprotein- und Helferkomponentengene (CP und HCpro) des nicht aphidenübertragbaren Isolates des PPV (PPV-NAT, Genus *Potyvirus*) zur Herstellung von transgenen virusresistenten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen eingesetzt. Mit diesen Pflanzen sollten die mit transgenen virusresistenten Pflanzen verbundenen potentiellen biologischen Risiken der Heterologen Enkapsidierung, Rekombination und Komplementation im Vergleich zu transgenen Pflanzen, die intakte CP-Gene des PPV exprimieren, untersucht und Möglichkeiten gefunden werden, diese Phänomene zu unterdrücken.

Durch die Mutation der Aminosäuren der konservierten Assemblierungsmotive Arginin-Glutamin und Asparaginsäure (RQ und D) im CP-Gen des PPV wurden virale Funktionen wie Zell-zu-Zell Transport und Enkapsidierung der viralen RNA *in-planta* verhindert. Diese modifizierten translatierbaren CP-Gene konnten wie vergleichbare Wild-Typ Gene in transgenen homozygoten *N. benthamiana* Pflanzen PPV-Resistenz erzeugen. Auch ein translatierbares CP des PPV-NAT, mit einer N-terminalen Verkürzung von 83 Aminosäuren konnte in transgenen homozygoten *N. benthamiana* Pflanzen die gleichen Resistenzeigenschaften induzieren. Die unterschiedlichen CP-Gene erzeugten zwei verschiedene Resistenzphänomene, die durch absolute Immunität oder ein Erholungsphänomen nach Auftreten einer systemischen Infektion (Infektions- und Recovery-Resistenz) gekennzeichnet war. Die Ursache dieser Pathogen-vermittelten Resistenz war wahrscheinlich posttranskriptionales "gene-silencing".

Die Heterologe Enkapsidierung fremder infizierender Potyviren konnte in diesen transgenen Pflanzen unterdrückt werden.

Verschiedene virale CP-Assemblierungsmutanten des infektiösen Vollängenklons ("full-length") des PPV (p35PPV-NAT) wurden in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen vom intakten PPV-CP *in-trans* komplementiert. Dies Phänomen ermöglichte den Defektmutanten eine systemische Infektion. Die Komplementation wurde in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen, die mit assemblierungsdefekten CP-Genen des PPV-NAT transformiert wurden, vollständig unterdrückt.

Auch translatierbare Gene der HCpro des PPV-NAT, die in den konservierten, an Blattlausübertragungsfunktionen beteiligten, Aminosäuremotiven Lysin-Isoleucin-Threonin-Cystein und Prolin-Threonin-Lysin (KITC und PTK) mutiert waren, konnten in transgenen homozygoten *N. benthamiana* Pflanzen Resistenz gegenüber PPV erzeugen. Auch die verschieden mutierten HCpro-Gene erzeugten die Resistenzphänomene der Infektions- und Recovery-Resistenz.

Auch die verschiedenen HCpro Mutationen wurden in den p35PPV-NAT "full-length" Klon eingefügt. Die neu erzeugten Mutanten erzeugten teilweise verstärkte Symptome in *N. benthamiana* Pflanzen.

Eine für Rekombinationsuntersuchungen künstlich hergestellte CP-Chimäre des p35PPV-NAT mit dem ausgetauschten *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) Zentralbereich des CP-Gens konnte *N. benthamiana* Pflanzen systemisch infizieren. Eine nach dem gleichem Schema hergestellte Chimäre des p35PPV-NAT mit dem *Potato virus Y* (PVY) CP-Kernbereich konnte *N. benthamiana* Pflanzen nicht systemisch infizieren, wurde jedoch in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen vom intakten transgenen PPV-CP komplementiert. Nach der Passage in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen, die das PPV-CP ohne vollständige 3' nichttranslatierte Region (3'-NTR) exprimierten, konnte die PVY-Chimäre nichttransgene *N. benthamiana* Pflanzen systemisch infizieren. Dabei blieb der ursprünglich ausgetauschte PVY-CP Zentralbereich unverändert; es konnte keine Rekombination zur PPV-Sequenz nachgewiesen werden.

Die verschiedenen CP-Assemblierungsmutanten des p35PPV-NAT wurden in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen, die das intakte CP mit dem vollständigen 3'-NTR des PPV exprimierten, über homologe RNA-Rekombination zur Wild-Typ PPV CP-Sequenz rekonstituiert. Ebenso wurden die CP-Chimären des p35PPV-NAT, bei denen der Kernbereich des CP durch adäquate Sequenzen des ZYMV oder PVY ersetzt wurden, auf die gleiche Art und Weise über homologe RNA-Rekombination zur Wild-Typ Sequenz rekonstituiert. Durch das Weglassen der 3'-NTR in der transgenen Sequenz, konnte das Auftreten der rekonstituierenden Rekombinationen drastisch verringert werden. Damit konnte eine Möglichkeit aufgezeigt werden, virale Sequenzen zur Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz so zu modifizieren, daß Rekombination fast vollständig unterdrückt werden kann.

In Versuchen zur Erzeugung eines Systems zur Herstellung von viralen *in-vivo* Rekombinanten wurden intakte PPV-NAT CP-Gene mit Hilfe des *Potato virus X* Pflanzenexpressionsvektor (pPVX) transient in *N. benthamiana* Pflanzen exprimiert. Diese intakten PPV-NAT CP-Gene rekonstituierten die verschiedenen CP-Assemblierungsmutanten des p35PPV-NAT über homologe Rekombination zur Wild-Typ Sequenz. Diese Rekombination fand jedoch mit einer geringeren Häufigkeit als die in transgenen Pflanzen statt. Auch das vom Pflanzenexpressionsvektor pPVX transient exprimierte CP-Gen des PPV Sauerkirschisolates (PPV-SoC) Isolat rekonstituierte eine CP-Assemblierungsmutanten des p35PPV-NAT, jedoch mit weitaus geringerer Häufigkeit als das PPV-NAT CP-Gen. Damit wurde erstmals die Möglichkeit aufgezeigt, virale Sequenzen auf ihre Unterstützung der Rekombination zu prüfen, ohne dafür transgene Pflanzen herstellen zu müssen.

Schlagworte: Potyvirus, Rekombination, Heterologe Enkapsidierung

Abstract (englisch):

Limitation of heterologous encapsidation and recombination using pathogen derived resistance against *Plum pox virus* (PPV)

In this study, modified coat protein and helper component genes (CP and HCpro) of the non aphid transmissible isolate of PPV (PPV-NAT, genus *potyvirus*) were used for the production of virus-resistant transgenic *Nicotiana benthamiana* plants. With these plants, the possible biological risks of transgenic virus resistant plants, heterologous encapsidation, recombination and complementation, should be examined. Possibilities should be found to suppress these phenomens.

By mutating the two conserved aminoacid motifs Arginine-Glutamine and Aspartic acid (RQ and D) in the coat protein (CP) of PPV, it was shown, that these motifs are responsible for particle assembly and cell-to-cell movement *in planta*. The translatable CP-genes carrying these mutations and an additional mutant with a 83 amino acid deletion at the N-terminus of the CP (Ä83), were able to produce resistance against PPV in transgenic *N. benthamiana* plants like wild-type PPV CP genes. These different homozygous transgenic T₂-lines displayed two different resistance types, which were characterised by absolute immunity or a recovery-phenomen after the occurrence of systemic virus symptoms (immunity and recovery-resistance)

The pathogen-derived resistance phenomens were both probably associated with post-transcriptional gene silencing.

The phenomen of heterologous encapsidation with different challenging potyviruses was effectively suppressed in these plants.

Different CP assembly-mutants of the infectious full-length clone of PPV-NAT (p35PPV-NAT) were not able to produce systemic infections in *N. benthamiana* plants but were complemented *in-trans* by the intact CP in transgenic *N. benthamiana* plants, which led to the formation of virus particles and enabled the mutants to infect the transgenic plants systemically. The complementation was completely suppressed in transgenic *N. benthamiana* plants, which were transformed with assembly defective CP genes of PPV-NAT.

In addition, HCpro-genes of PPV, mutated in the conserved aminoacid motives Lysine-Isoleucine-Threonine-Cysteine and Proline-Threonine-Lysine (KITC und PTK), involved in aphid-transmission, also were able to produce resistance against PPV in transgenic homozygous *N. benthamiana* plants. The above mentioned resistance phenotypes against PPV could be observed as well.

The different HCpro mutations were introduced into the full-length clone of PPV-NAT. The emerging mutants were partially able to produce symptoms with higher severity than the wild-type PPV.

A CP-chimera of p35PPV-NAT with the CP-core of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), constructed for recombination experiments, was able to infect *N. benthamiana* plants systemically. A *Potato virus Y* (PVY) chimera of p35PPV-NAT constructed in parallel, could not infect *N. benthamiana* plants systemically, but was complemented

in-trans by the intact transgenic CP of PPV. After passage in transgenic *N. benthamiana* plants, expressing the intact PPV-CP without the complete 3'-nontranslated region (3'-NTR), the chimera was able to infect *N. benthamiana* plants systemically. The PVY core region in the CP-gene remained unaffected; no recombination event could be detected.

It was shown, that CP assembly mutants of p35PPV-NAT were restored to wild-type sequence by homologous RNA recombination in transgenic *N. benthamiana* plants carrying the intact CP-gene of PPV-NAT with the complete 3'-NTR adjacent to the CP-gene. The CP-chimeras with the core-region replaced by ZYMV and PVY sequences were restored in these plants by homologous recombination as well. The recombination frequency could be drastically reduced, by omitting the 3'-NTR in the transgenic sequence. These results present a possibility to modify viral sequences for the production of pathogen-derived resistance thereby preventing the occurrence of recombinations almost completely.

In experiments for the establishment of a system for the generation of viral *in-vivo* recombinants, intact PPV CP genes were transiently expressed in *N. benthamiana* plants from the viral plant expression vector of *Potato virus X* (pPVX). These intact CP genes restored the different CP-assembly mutants of p35PPV-NAT to wild-type sequence by means of homologous recombination. The recombination was detected with lower frequency than in transgenic plants. In addition, the CP-gene of the PPV-SoC transiently expressed from the pPVX plant expression vector restored a CP-assembly mutant of p35PPV-NAT as well but with much lower frequency. These results demonstrated for the first time, that viral sequences can be tested for supporting recombinations without the necessity of producing transgenic plants.

Keywords: Potyvirus, Recombination, Heterologous Encapsidation

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben, sowie die Arbeit noch nicht als Dissertation oder andere Prüfungsarbeit vorgelegt zu haben.

Hannover, den 28. Juni 1999

Mark Varrelmann

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	-1-
2	MATERIAL	-19-
2.1	Antiseren	-19-
2.2	Bakterienstämme	-19-
2.3	Viren und virale Klone	-20-
2.4	Pflanzenmaterial	-21-
2.5	Enzyme	-23-
2.5.1	Restriktionsenzyme	-23-
2.5.2	DNA/RNA modifizierende Enzyme	-24-
2.5.3	Polymerasen	-24-
2.5.4	Protein modifizierende Enzyme	-24-
2.5.5	Zellwand abbauende Enzyme	-24-
2.6	Plasmide und Klonierungsvektoren	-25-
3	METHODEN	-26-
3.1	Biologische Methoden	-26-
3.1.1	Anzucht von Pflanzenmaterial	-26-
3.1.2	Mechanische Übertragung von Pflanzenviren	-26-
3.2	Molekularbiologische Methoden	-27-
3.2.1	Agrobakterium vermittelte Pflanzentransformation	-27-
3.2.1.1	Anzucht von <i>A. tumefaciens</i>	-27-
3.2.1.2	Anzucht und Erhaltung von <i>N. benthamiana</i> Pflanzen in Gewebekultur	-27-
3.2.1.3	Wachstumsbedingungen im Lichtthermostat	-28-
3.2.1.4	Transformation von <i>A. tumefaciens</i> mittels Elektroporation ...	-28-
3.2.1.5	Plasmidpräparation aus <i>A. tumefaciens</i>	-30-
3.2.1.6	Blattscheibentransformation	-31-
3.2.1.7	Vorbereitung der zu transformierenden Pflanzen	-31-
3.2.1.8	Regeneration und Selektion	-32-
3.2.1.9	â-Glucuronidase-Selektion (<i>gus</i> -Test)	-32-
3.2.1.10	Erzeugung von T ₁ /T ₂ -Generation und Resistenztestung	-33-
3.2.1.11	Homozygotietestung	-34-
3.2.2	Nachweis transgener Insertionen im Pflanzenmaterial	-34-
3.2.2.1	Präparation von DNA aus Pflanzenmaterial	-35-
3.2.2.2	Restriktionsverdau von Pflanzen-DNA	-36-
3.2.2.3	Southern-Transfer von Pflanzen-DNA zur Hybridisierung	-37-
3.2.2.4	Sondenherstellung	-38-
3.2.2.5	Hybridisierung	-39-
3.2.2.6	Sondennachweis ("Chemoluminescent detection")	-40-
3.2.3	Präparation viraler RNA aus Pflanzenmaterial	-40-

3.2.3.1	Gesamt-RNA Präparation	-40-
3.2.3.2	Proteinase-K Verdau zur Isolierung von RNA aus Nukleoprotein	-41-
3.2.3.3	Phenol/Chloroform-Extraktion	-41-
3.2.3.4	Gesamtnukleinsäure-Präparation "total nucleic acid" (TNA) . . .	-42-
3.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	-43-
3.2.4.1	Primer	-43-
3.2.4.2	Reverse-Transkription/PCR (RT/PCR)	-44-
3.2.4.3.	Immunocapture-RT/PCR (IC-RT/PCR)	-45-
3.2.4.4	PCR-Mutagenese	-46-
3.2.5	Klonierung	-46-
3.2.5.1	Präzipitation von Nukleinsäuren (Natriumacetat/Ethanol-Fällung)	-47-
3.2.5.2	Restriktionsverdau analytisch und präparativ	-47-
3.2.5.3	Auffüllen überstehender einzelsträngiger DNA-Bereiche nach Restriktion	-48-
3.2.5.4	Agarose Gelelektrophorese analytisch und präparativ	-48-
3.2.5.5	Präparation von Nukleinsäuren aus Agarosegelen (QIAex) . . .	-50-
3.2.5.6	Säulenreinigung von PCR-Produkten (QIAquick)	-51-
3.2.5.7	Bestimmung der DNA-Konzentration	-51-
3.2.5.8	Vorbereitung von Vektoren zur Klonierung	-51-
3.2.5.9	Ligation von Klonierungsvektor und DNA-Fragment	-53-
3.2.6	Transformation von <i>Escherichia coli</i> (NM522)	-54-
3.2.6.1	Chemische Transformation	-54-
3.2.6.2	Herstellung kompetenter Zellen	-54-
3.2.6.3	Transformation	-55-
3.2.6.4	Quick-Transformation	-55-
3.2.7	Selektion transformierter Zellen	-56-
3.2.8	Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA (Klare Lysate)	-56-
3.2.9	Plasmidpräparation und Reinigung	-58-
3.2.10	Herstellung von Bakteriendauerkulturen	-59-
3.2.11	Sequenzierung	-59-
3.2.11.1	Herstellung von einzelsträngiger DNA (ssDNA)	-59-
3.2.11.2	Sequenzierung von ssDNA nach dem Kettenabbruchverfahren	-60-
3.2.11.3	Kommerzielle Auftragssequenzierung	-62-
3.2.12	Infektion von Pflanzen mit viralen Klonen	-62-
3.2.12.1	Konstruktion einer Partikelkanone	-63-
3.2.12.2	Präparation von Nukleinsäuren zum Partikelbombardment . . .	-66-
3.2.13	Infektion von Blättern mittels Partikelbombardment	-67-
3.2.13.1	Funktionsweise der PDS1000	-67-
3.2.13.2	Durchführung des Partikelbombardments	-68-

3.3	Biochemische und Immunologische Methoden	-69-
3.3.1	Immunglobulinreinigung aus Antiserum	-69-
3.3.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	-70-
3.3.3	Gesamtproteinextraktion aus Pflanzenmaterial	-71-
3.3.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese zur Trennung von Proteinen	-71-
3.3.5	Proteinfärbung in PAA-Gelen mit Coomassie	-73-
3.3.6	Proteinelektroblot ("Westernblot")	-73-
3.3.7	Immunfärbung von Proteinen ("Immunoassay")	-74-
3.3.7.1	Napthol AS-MX Phosphat/Fast-Red Nachweis	-74-
3.3.7.2	NBT/BCIP Nachweis	-74-
3.4	Elektronenmikroskopie	-75-
3.4.1	Herstellung von Objektträgern	-75-
3.4.2	Herstellung von Tropfpräparaten	-76-
3.4.3	Immunadsorptionselektronenmikroskopie (ISEM)	-76-
3.4.4	Dekoration von Präparaten mit Antiseren	-77-
3.4.5	Immungoldmarkierung von Dekorationspräparaten	-77-
3.5	Softwareprogramme	-77-
4	ERGEBNISSE	-78-
4.1	Untersuchungen mit transgenen virusresistenten <i>N. benthamiana</i>	-78-
4.1.1	PCR-Mutagenese von CP und HCpro	-78-
4.1.1.1	PCR-Mutagenese zur Einfügung von CP-RQ, -D, CP-RQ-D und CP-N in das CP-NAT	-82-
4.1.1.2	PCR-Mutagenese zur Einfügung von HC-KITC, -PTK und -KITC-PTK in die HCpro	-84-
4.1.2	Herstellung von pflanzlichen Expressionskassetten in binären Plasmiden	-87-
4.1.3	Transformation des <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Stammes LBA4404	-89-
4.1.4	Pflanzentransformation und Regeneration	-90-
4.1.5	Erzeugung der T ₁ - Generation, Resistenztestung und Erzeugung der T ₂ -Generation	-91-
4.1.6	Homozygotie-Testung und Zusammenhang der Resistenzreaktion der T ₁ - und T ₂ -Generation	-99-
4.2	Charakterisierung der transgenen Linien der T ₂ -Generation	-100-
4.2.1	Bestimmung der Anzahl transgener Insertionen	-101-
4.2.2	Bestimmung der transgenen Proteinexpression	-103-
4.2.3	Untersuchung des Resistenzmechanismus	-104-
4.3	Versuche zur Heterologen Enkapsidierung	-107-
4.4	Herstellung von verschiedenen Mutanten des HCpro-Gens in p35PPV-NAT	-110-
4.4.1	Untersuchungen zur Infektiosität	-112-
4.5	Untersuchungen mit verschiedenen Mutanten des CP-Gens in	

	p35PPV-NAT	-115-
4.5.1	Versuche mit viralen Assemblierungsmutanten	-115-
4.5.1.1	Herstellung von viralen Assemblierungsmutanten	-115-
4.5.1.2	Untersuchungen zur Infektiosität	-116-
4.5.1.3	Nachweis der Komplementation	-116-
4.5.1.4	Unterdrückung der Komplementation in transgenen <i>N. benthamiana</i> mit modifiziertem Hüllproteingen	-118-
4.5.1.5	Nachweis der Rekombination	-119-
4.5.1.6	Untersuchungen zur Assemblierung	-122-
4.5.2	Untersuchungen mit einer Leserastermutante des CP-Gens .	-128-
4.5.2.1	Herstellung einer Leserastermutante	-128-
4.5.2.2	Versuche zur Infektiosität, Komplementation und Rekombination	-128-
4.5.3	Versuche mit Hüllproteinchimären	-130-
4.5.3.1	Herstellung von Hüllproteinchimären	-130-
4.5.3.2	Untersuchungen zur Infektiosität	-134-
4.5.3.3	Untersuchungen zur Komplementation	-135-
4.5.3.4	Nachweis der Rekombination	-138-
4.6	Nachweis der RNA-RNA Rekombination	-141-
4.7	Herstellung eines Systems zur Erzeugung und Überprüfung von viralen <i>in-vivo</i> Rekombinanten	-142-
5	DISKUSSION	-149-
5.1	Untersuchung von transgenen virusresistenten <i>N. benthamiana</i> Pflanzen mit modifizierten Genen des PPV-NAT	-149-
5.2	Versuche mit CP-Chimären des p35PPV-NAT	-157-
5.3	Begrenzung der Heterologen Enkapsidierung	-159-
5.4	Untersuchung von Mutationen im HCpro-Gen von p35PPV-NAT	-162-
5.5	Untersuchungen zur Komplementation	-164-
5.6	Begrenzung der Rekombination in transgenen Pflanzen	-167-
5.7	Herstellung von viralen <i>in-vivo</i> Rekombinanten	-172-
5.8	Möglichkeiten zur Modifikation von viralen Sequenzen zur Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz	-175-
7	LITERATURVERZEICHNIS	-178-
8	ANHANG	-198-

Abkürzungsverzeichnis

"	Sekunde
'	Minute
35S	35S-Promotor des CaMV
3'-NTR	3'-nichttranslatierte Region
5'-NTR	5'-nichttranslatierte Region
% (v/v)	Volumenprozent/Volumen
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Abs. _{nm}	Absorption bei Wellenlänge in Nanometer
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AP	alkalische Phosphatase
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Antiserum
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig
BSA	Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	kopierte DNA ("copy DNA")
Ci	Curie
Cfu	Colony forming units
CP	Hüllprotein (coat protein)
d	desoxy
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat (G/A/T/C)
DI-RNA	"defective-interfering" -RNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("desoxyribonucleic acid")
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat (G/A/T/C)
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DTT	Dithiothreitol
E	Einheiten

E_{405}	Extinktion bei 405 nm
EBIA	Elektroblot-Immunoassay
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
g	Gravitationskonstante 9,81 m/s ²
GaR IgG	IgG aus Ziege gegen Kaninchen IgG
<i>gus</i>	β-Glucuronidase aus <i>E. coli</i>
h	Stunde ("hour")
HCpro	Helferkomponente Protease ("Helpercomponent protease")
IC-RT/PCR	"Immunocapture-Reverse-Transkription"/PCR
IgG	Immunglobuline
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
ISEM	Immunadsorptions-Elektronenmikroskopie ("Immunosorbent Electronmicroscopy")
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Konstante
K _n	Kanamycin
l	Liter
λ	Wellenlänge in nm
Lsg.	Lösung
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	Mehrfachklonierungsort ("multiple cloning site")
MES	Morpholinethansulfonsäure
mg	Milligramm
mM	Millimolar
mMol	Millimol
M _r	Molekulargewicht
mRNA	"messenger"-RNA
ng	Nanogramm
NC	Nitrocellulose

nm	Nanometer
<i>nos</i>	Nopalinsynthetase
<i>nosA</i>	Polyadenylierungssignal aus <i>nos</i>
<i>nptII</i>	Neomycinphosphotransferase II
NTR	nichttranslatierter Bereich ("nontranslated region")
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OD ₅₅₀	optische Dichte bei 550 nm
ORF	offenes Leseraster ("open reading frame")
PAA	Polyacrylamid
pA-CaMV	Polyadenylierungssignal des CaMV
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PEG	Polyethylenglykol
<i>pnos</i>	Polyadenylierungssignal von <i>nos</i>
Pos.	Position
PPV	Scharkavirus der Pflaume (" <i>Plum pox virus</i> ")
PPV-AT	PPV-Isolat aphidenübertragbar ("aphid transmissible")
PPV-NAT	PPV-Isolat nichtaphidenübertragbar ("non-aphidtransmissible")
PPV-SoC	PPV-Isolat aus Sauerkirsche ("Sour Cherry")
PTA	"plate trapped antigen"
RNA	Ribonukleinsäure ("Ribonucleic acid")
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat (G/A/T/C)
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
S	Swedberg (Sedimentationskoeffizient)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Standardabweichung ("Standard Deviation")
SDS	Natriumdodecylsulfat ("Sodium-Dodecyl-Sulfate")
s.o.	siehe oben
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure ("single stranded DNA")
Str	Streptomycin
T7	Bakteriophage T7
Tc	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TGB	"triple gene block" des PVX

TKS	Torfkultursubstrat
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit ("Unit")
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen/Minute
V	Volt
vergl.	vergleiche
Vol.	Volumen
VPg	genomgebundenes virales Protein (Viral protein genome -linked)
W	Watt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid
X-gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-beta-D-Glucoronid
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin

Aminosäuren (Fortsetzung)

S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Viren

AIMV	<i>Alfalfa mosaic virus</i>
AMV	<i>Avian myeloblastosis virus</i>
BiMoV	<i>Bidens mottle virus</i>
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>
BNYVV	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
BSMV	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
BStV	<i>Brome streak mosaic virus</i>
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i>
BYMV	<i>Bean yellow mosaic virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CCMV	<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i>
ChVMV	<i>Chilli veinal mottle virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CNV	<i>Cucumber necrosis virus</i>
JGMV	<i>Johnsongrass mosaic virus</i>
LMV	<i>Lettuce mosaic virus</i>
PLRV	<i>Potato leafroll virus</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>

Viren (Fortsetzung)

PRSV	<i>Papaya ringspot virus</i>
PSbMV	<i>Pea seed borne mosaic virus</i>
PSV	<i>Peanut stunt virus</i>
PVC	<i>Potato virus C</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
RCNMV	<i>Red clover necrotic mosaic virus</i>
SMV	<i>Sorghum mosaic virus</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TVMV	<i>Tobacco vein mottling virus</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
WMV2	<i>Watermelon mosaic virus 2</i>
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>

1 EINLEITUNG

Das Scharka-Virus der Pflaume (PPV)

Das Scharka-Virus der Pflaume trägt die international gebräuchlichere Bezeichnung *Plum pox virus* (PPV). Das PPV ist ein Mitglied des Genus *Potyvirus* (Barnett, 1991). Der Typstamm ("Type member") dieses Genus ist das *Potato virus Y* (PVY). Zu den Potyviren gehören etwa ein Drittel aller bisher bekannten Pflanzenviren, darunter zahlreiche wirtschaftlich bedeutende Viren, die an Kulturpflanzen zu schweren Ertragsausfällen führen können (Hollings & Brunt, 1981). Das PPV infiziert hauptsächlich holzige Pflanzen der Gattung *Prunus* und verursacht schwere Ertragsausfälle bis hin zum Totalausfall. Befallen werden vor allem Pflaume (*P. domestica* L.), Pfirsich (*P. persica* L. BATSCH), Aprikose (*P. armeniaca*) und japanische Pflaume (*P. salicina* LINDLEY). Dosba *et al.* (1987) konnten mit dem PPV lokale Infektionen in der Weichselkirsche (*Prunus mahaleb* L.) erzeugen. Einzelne Isolate des PPV (z.B. PPV-SoC) sind zudem in der Lage Kirschen (*P. cerasus* L. und *P. avium* L.) systemisch zu infizieren (Nemchinov *et al.*, 1996). Die Symptome an Pflaume umfassen chlorotische Flecken oder Ringe, diffuse Scheckungen und pockennarbige Veränderungen auf der Oberfläche der Früchte, die zur englischen Namensgebung geführt haben. Weiterhin kann eine braune bis rötliche Verfärbung des Fruchtfleisches beobachtet werden. Zusätzlich ist der Zuckergehalt reduziert und der Säuregehalt der Früchte erhöht. Die durch das Virus hervorgerufenen ökonomischen Schäden sind daher beträchtlich (Kunze & Nikusch, 1986 und Hamdorf, 1992). Als experimentelle krautige Wirtspflanzen für das PPV werden *Nicotiana clevelandii* und *Nicotiana benthamiana* verwendet, in denen sich das Virus systemisch ausbreiten kann und sehr hohe Virustiter erreicht. Weiterhin eignen sich auch *Chenopodium quinoa*, *Ch. foetidum* und *Ch. amaranticolor* als experimentelle Wirtspflanzen, die auf PPV-Infektionen mit chlorotischen bis nekrotischen Lokalläsionen reagieren und nicht systemisch infiziert werden können.

Das PPV besitzt eine fadenförmige Morphologie mit einer Partikellänge von 700-900 nm und einem Partikeldurchmesser von ca. 12 nm. Das Virus wird nicht persistent, hauptsächlich durch *Myzus persicae* Sulz., *Aphis craccivora* Koch, *A. fabae* Scop., *Brachycaudus helichrysi* Kalt. und *Phorodon humuli* Schrank, aber auch durch andere Blattlaus-Spezies, übertragen. Es hat sich von seinem Ursprungsland Bulgarien, wo schon 1915 erste Symptome von PPV Infektionen beschrieben wurden, über Europa

hinweg ausgebreitet (Matthews, 1991). In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Anstrengungen unternommen, um das PPV zu bekämpfen. In der Bundesrepublik wurde die "Verordnung zur Bekämpfung der Scharkakrankheit" erlassen (Anonym, 1988), die auch die Vernichtung von potentiellen Wirtspflanzen im Umkreis von Obstanlagen vorsieht. Mit dieser Maßnahme konnte jedoch keine Eindämmung der Krankheit erreicht werden. Die konventionelle Resistenzzüchtung (Hartmann, 1995) ist in der Lage Pflaumen- und Aprikosensorten zu produzieren, die eine hohe Symptomtoleranz gegenüber dem PPV aufweisen. Dies zeigen auch Untersuchungen von Polák *et al.* (1997). Darunter befanden sich jedoch keine Sorten mit guter Fruchtqualität und Marktfähigkeit (Petruschke, 1990). Mittlerweile sind jedoch Sorten selektiert, die neben der Symptomtoleranz auch eine bessere Fruchtqualität aufweisen (Hartmann *et al.*, 1997). Kegler *et al.* (1998) berichteten von mittlerweile über 300 Pflaumen-, Aprikosen- und Pfirsichsorten, die gegenüber PPV als resistent oder tolerant beschrieben wurden.

Genomorganisation des PPV

Vom PPV existieren unterschiedliche Isolate mit der Fähigkeit von Blattläusen übertragen zu werden (PPV-AT), aber auch Isolate, die diese Fähigkeit nicht besitzen oder im Verlauf der Evolution verloren haben (PPV-NAT). Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden ausschließlich mit einem nicht aphidenübertragbaren Isolat des PPV (PPV-NAT) durchgeführt. Als Mitglied der Potyvirusgruppe besitzt das PPV ein monopartites, sinnpositives, einzelsträngiges Genom von 9741 bp Länge, welches von Untereinheiten des Hüllproteins enkapsidiert ist (Maiss *et al.*, 1989). Die Genomorganisation entspricht der der Potyviren (Carrington *et al.*, 1990), (Riechmann *et al.*, 1992) und (Maiss, 1993). Die RNA der Potyviren besitzt am 5'-Ende ein virales genomgebundenes Protein ["Viral protein genome-linked" (Vpg)], welches membranassoziiert und an der Replikation beteiligt ist (Restrepo-Hartwig & Carrington, 1994). Weiterhin befindet sich am 3'-Ende ein Poly-A-Schwanz ("poly-A-tail"). Die RNA kodiert für ein einziges offenes Leseraster (ORF), welches in ein Polyprotein von ca. 360 kDa translatiert wird. Dieses Polyprotein wird durch viruseigene Proteasen, mittels *cis*- und *trans*-Prozessierungen, in die funktionellen Virusproteine überführt. Die einzelnen Produkte des Polyproteins, in Reihenfolge vom N- zum C-Terminus, sind P1 (Protein 1), HCpro (Helferkomponente Protease), P3 (Protein 3), 6K₁, CI (Zylindrischer Einschlußkörper), 6K₂, NIa (Kerneinschlußkörper a, Vpg), NIb (Kerneinschlußkörper b)

und CP (Hüllprotein). Die 5'-NTR besitzt eine Länge von 147 Bp, die 3'-NTR eine Länge von 221 Bp (Maiss, 1993). Da in dieser Arbeit das CP- und das HCpro-Gen des PPV-NAT für Pflanzentransformationsexperimente zur Erzeugung von Pathogenvermittelter Resistenz unter Berücksichtigung biologischer Sicherheitsaspekte eingesetzt wurden, sind die Funktionen dieser viralen Genprodukte von besonderem Interesse. Eine ausführliche Zusammenfassung der einzelnen Funktionen potyviralear Proteine wurde kürzlich von Revers *et al.* (1999) publiziert.

Das CP der Potyviren hat verschiedene Funktionen im Infektions- und Replikationszyklus des Virus. Es enkapsidiert die virale RNA. Nach Shukla *et al.* (1988) sind N- und C-Terminus des CPs von Potyviren oberflächenlokalisiert. Der N-Terminus ist innerhalb der Potyviren sehr sequenzvariabel und weist auf spezifische Wirt/Virus Interaktionen hin (Maiss, 1993). In dem Bereich des N-Terminus des CP des PPV befindet sich ein innerhalb der Potyviren konserviertes Aminosäuretriplekt DAG²⁸⁵⁷⁻⁵⁹ (Aminosäurepositionen PPV-NAT Maiss *et al.*, 1989), welches für die Blattlausübertragbarkeit verantwortlich ist (Atreya *et al.*, 1990; Atreya *et al.*, 1991; Maiss *et al.*, 1993; Atreya *et al.*, 1995; Kantrong *et al.*, 1995 und Salomon & Bernardi, 1995). Innerhalb des in dieser Arbeit verwendeten CP-NAT des nicht aphidenübertragbaren Isolat PPV-NAT ist dieses Motiv zu DAL mutiert. Innerhalb der Kern-Region ("core-region") und nahe des C-Terminus des CP von Potyviren befinden sich die hochkonservierten Aminosäuremotive (RQ und D). Dolja *et al.* (1991) postulierten anhand von Sequenzvergleichen eine Salzbrücke ("salt bridge") zwischen diesen beiden Aminosäuremotiven, die zur Ausbildung der funktionellen Tertiärstruktur beitragen sollen. Jagadish *et al.* (1991) zeigten erstmalig die Assemblierung eines potyviralear CPs des JGMV ohne Anwesenheit der vollständigen viralen RNA in *E. coli* und *S. cerevisiae*. Jagadish *et al.* (1993) konnten weiterhin im System *E. coli* die Beteiligung der Aminosäuren RQ und D des JGMV-CP an der Partikelassemblierung zeigen. Eine *in-vitro* Mutagenese beider Motive verhinderte erfolgreich die Assemblierung. Diese Ergebnisse konnten von Jacquet *et al.* (1998a) für das ZYMV-CP im gleichen bakteriellen System bestätigt werden. Hier wurden jedoch die beiden Motive nicht mutagenisiert, sondern deletiert. Von Dolja *et al.* (1992) konnte die Beteiligung dieser Motive des TEV CP nicht nur an der Partikelassemblierung in Protoplasten, sondern auch am Zell-zu-Zell-Transport durch Mutagenese, *gus*-Markierung des viralen Genoms und ISEM nachgewiesen werden. Für die Initiation der Partikelassemblierung ist wahrscheinlich der extreme 5'-Bereich der

viralen RNA verantwortlich. Dies konnte von Wu & Shaw (1998) am Beispiel des TVMV indirekt gezeigt werden. Das CP-Gen der Potyviren ist zusammen mit der 3'-NTR an der Genomamplifizierung beteiligt (Haldeman-Cahill *et al.*, 1998). Blanc *et al.* (1997) wiesen eine spezifische Interaktion ausschließlich zwischen dem aphidenübertragbaren CP und der HCpro von TVMV nach, welche die Bindung von Viruspartikeln an die Mundwerkzeuge von Aphiden vermittelt. Weiterhin ist das CP von Potyviren an der systemischen Ausbreitung in der Pflanze beteiligt (Dolja *et al.*, 1995; Andersen & Johansen, 1997 und Rojas *et al.*, 1997). Lopez-Moya & Pirone (1998) wiesen eine Beteiligung des CP-N-Terminus an der systemischen Ausbreitung nach. Damit sind jedoch wahrscheinlich nicht alle Funktionen des CP beschrieben. Hong *et al.* (1995) wiesen eine Interaktion zwischen dem CP und dem Nlb des TVMV in *S. cerevisiae* nach. Die Autoren vermuteten eine Beteiligung des CP am Replikationssystem des Virus oder an der Regulation der Plus- und Minusstrangsynthese. Merits *et al.* (1998) wiesen eine unspezifische RNA-Bindung des CP nach. Welche Bereiche des CP für diese Funktionen verantwortlich gemacht werden können, ist jedoch bisher noch unklar.

Die HCpro der Potyviren spaltet sich mit Hilfe der eigenen Proteasefunktion durch *cis*-Prozessierung vom Polyprotein ab (Carrington *et al.*, 1989). Cronin *et al.* (1995) wiesen eine Beteiligung der HCpro des TEV am Langstreckentransport nach. Von Maia & Bernardi (1996) konnten nukleinsäurebindende Eigenschaften der PVY HCpro nachgewiesen werden. Wie in Untersuchungen von Mischinfektionen nachgewiesen wurde könnte die HCpro als ein Pathogenitätsverstärker wirken (Pruss *et al.* 1997). Anandalakshmi *et al.* (1998) wiesen die Fähigkeit der HCpro nach, posttranskriptionales "gene silencing" zu unterdrücken (siehe "Pathogen-vermittelte Resistenz"). Die wichtigste Funktion besteht jedoch wahrscheinlich in der Beteiligung an der Blattlausübertragbarkeit. Die spezifische Interaktion zwischen dem CP und der HCpro von Potyviren bewirkt die Bindung von Viruspartikeln an die Mundwerkzeuge von Aphiden und ermöglicht so die nicht persistente Übertragung. Blanc *et al.* (1997) zeigten dies am Beispiel des TVMV. Ammar *et al.* (1994) lokalisierten den Bindungsort der HCpro, an dem die HCpro die Bindung zwischen Blattlaus und Viruspartikel vermittelt, als den maxillaren Nahrungskanal, die Kutikeln, das Cibarium und den Vorderdarm von *M. persicae* für die Übertragung des TEV. In der HCpro des PPV befinden sich zwei innerhalb der Potyviren hochkonservierte Aminosäuremotive (KITC³⁹⁶⁻⁹⁸, PTK⁶⁵⁴⁻⁵⁶). Atreya & Pirone (1993) konnten, durch Mutation des Lysins (K)

im KITC Motiv zu einer Aminosäure mit entgegengesetzten chemischen Eigenschaften, einen völligen Verlust der Blattlausübertragbarkeit des TVMV erreichen. Weiterhin traten eine Attenuierung der Symptome und eine reduzierte Virusakkumulation auf. Huet *et al.* (1994) zeigten am Beispiel der HCpro des ZYMV, daß die Mutation von Threonin (T) zu Alanin (A) im PTK Motiv zu einem völligen Verlust der Blattlausübertragbarkeit führte. Thornbury *et al.* (1990) fanden bei PVC, dem nicht blattlausübertragbarem Stamm des PVY, im KITC Motiv eine Mutation von Lysin (K) zu Glutaminsäure (E). Die gleiche Mutation im KITC Motiv konnte in der HCpro eines nicht blattlausübertragbaren Isolats des ZYMV nachgewiesen werden (Grumet *et al.* 1992). Wurde diese Mutation über Mutagenese künstlich in die HCpro von TVMV eingefügt, konnte die Blattlausübertragbarkeit verhindert werden (Atreya *et al.* 1992). Blanc *et al.* (1998) konnten im gleichen PVY/PVC System zeigen, daß das KITC Motiv für eine Bindung der HCpro an die Mundwerkzeuge der Aphiden verantwortlich ist. Das PTK Motiv der ZYMV HCpro konnte von Peng *et al.* (1998) durch Austausch zu PAK für eine Bindung der Virionen verantwortlich gemacht werden. Diese Untersuchungen liefern eine Vielzahl von Anhaltspunkten dafür, daß die HCpro von Potyviren über eine Brücke von zwei Aminosäuremotiven die Übertragung der Viruspartikel vermittelt.

Pathogen-vermittelte Resistenz

Um Pathogen-vermittelte Resistenz gegenüber Pflanzenviren zu beschreiben, ist es notwendig die Phänomene der Präimmunität, im englischen auch als "cross protection" bezeichnet, und der Hüllprotein-vermittelten Resistenz zu erläutern. "Cross protection" beschreibt ein Phänomen, bei dem eine Infektion von Pflanzen mit Virusisolaten, die keine oder nur schwache Symptome und Schädigungen verursachen, einen Schutz gegenüber Isolaten des gleichen Virus verleihen, die bei einer alleinigen Infektion diese Pflanze schädigen würden (McKinney, 1929). Dieses Prinzip wird im praktischen Anbau zum Schutz vor Viruserkrankungen eingesetzt (Costa & Müller, 1980). Zu einem späteren Zeitpunkt konnte von Loebenstein (1962) gezeigt werden, daß die alleinige Inokulation des gereinigten CP des TMV auf Wirtspflanzen schon einen Schutz gegenüber dem TMV verleiht. Das Konzept der Pathogen-vermittelten Resistenz über gentechnische Einführung von Genen des Pathogens in die jeweiligen Wirte und der Erzeugung einer Resistenz wurde erstmals von Sanford & Johnston (1985) am Beispiel von *E. coli* und dem Bakteriophagen Q α vorgeschlagen.

1986 gelang Powell *et al.* die Transformation von *Nicotiana tabacum* mit dem CP-Gen des TMV und damit die Erzeugung einer als Hüllprotein-vermittelten Resistenz bezeichneten Schutzwirkung.

In den letzten Jahren ist eine Vielzahl von viralen Genen unterschiedlichster Wirt/Virussysteme zur Pflanzentransformation und zur Erzeugung von Virusresistenz verwendet worden. Zusammenstellungen finden sich bei Sturtevant & Beachy (1993); Wilson (1993); Lomonosoff (1995) und Beachy (1997). Am häufigsten wurde und wird das jeweilige virale Hüllproteingen zur Pflanzentransformation eingesetzt. Es werden auch Gene von Nichtstrukturproteinen wie Replikasen, Transport Proteinen ("movement proteins"), DI-RNA und nichttranslatierbare Gene zur Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz erfolgreich eingesetzt.

Der zugrundeliegende Resistenzmechanismus der Pathogen-vermittelten Resistenz ist auch heute noch nicht abschließend aufgeklärt. Powell *et al.* (1990) zeigten für das TMV, daß ausschließlich das exprimierte CP des TMV für den Resistenzeffekt verantwortlich ist. Loesch-Fries *et al.* (1987) zeigten für das CP des AIMV und Hemenway *et al.* (1988) am Beispiel des PVX, daß die Konzentration des viralen translatierten Hüllproteins einen Einfluß auf den beobachteten Resistenzeffekt ausübt. Die Autoren vermuteten eine Verhinderung der Freisetzung der viralen RNA nach Zelleintritt durch das transgene CP.

Lapidot *et al.* (1993) zeigten, daß nur ein defektes Transportprotein des TMV in transgenen Pflanzen Resistenz vermitteln kann, nicht jedoch das intakte. Schon 1990 zeigten Golemboski *et al.* eine Schutzwirkung gegenüber dem TMV in transgenen *N. tabacum*, jedoch bei Verwendung des nichttranslatierbaren Polymerase-Gens des TMV ohne die Anwesenheit von viralem Protein.

Lindbo & Dougherty (1992a) und Baulcombe (1994) fanden jedoch, sowohl unter Verwendung von Nichtstrukturgenen, wie auch von nichttranslatierbaren Hüllproteingenen eine Resistenzwirkung ohne das Vorhandensein von viralem translatierten Protein. Dabei konnten sie einen umgekehrten Zusammenhang zwischen transgener Expression und erhaltener Resistenzwirkung feststellen. Bei diesem Resistenzphänomen ist ausschließlich die transgene RNA für die Resistenzwirkung verantwortlich. Für diese Resistenz wurde die Bezeichnung RNA-vermittelte Resistenz vorgeschlagen (Dougherty *et al.*, 1994 und English *et al.*, 1996). Von Baulcombe (1996) wurde ein genereller Mechanismus postuliert, der als "posttranscriptional-gene-silencing" (PTGS) bezeichnet wird. Er führt zur sequenz-

spezifischen Degradation der viralen RNA [“RNA-mediated virus resistance” (RmVR)]. Mittlerweile sind eine Vielzahl von Arbeiten zum Thema des “gene-silencing” und dessen Mechanismen, unter Aufstellung von drei sich ähnelnden und überschneidenden Modellen, durchgeführt worden (Baulcombe, 1996; Baulcombe & English, 1996; Angell & Baulcombe, 1997; Ruiz *et al.*, 1998; Van den Boogart *et al.*, 1998 und Wassenegger & Pelissier, 1998).

Alle drei Modelle für den Mechanismus des PTGS und der RmVR, wie sie von Van den Boogart *et al.* (1998) zusammengefaßt wurden, seien kurz erläutert. Die transkribierte RNA des Transgens ist nicht nur Ziel eines sequenzspezifischen RNA-Degradationsmechanismus, sie ist auch deren Initiator. Über diesen Degradationsmechanismus wird nicht nur die transgene RNA posttranskriptional, sondern auch die replizierende virale RNA, sequenzspezifisch abgebaut.

Das erste Modell basiert auf einem Grenzwert der transgenen RNA-Konzentration, also auf dem Transkriptionsniveau. Übersteigt die RNA-Konzentration einen gewissen Wert, so produziert eine RNA-abhängige RNA-Polymerase kurze “antisense” RNA-Moleküle, homolog zu der Zielsequenz. Die Anlagerung dieser “antisense” Moleküle an die transgene und die replizierende virale RNA führt zur Ausbildung einer Duplexstruktur, welche das Zielmolekül für eine Doppelstrang-spezifische RNase darstellen könnte. Smith *et al.* (1994) schlugen dies aufgrund von mRNA Untersuchungen in transgenen Pflanzen, die mit translatierbaren und nicht-translatierbaren CP-Genen des PVY transformiert worden waren, vor. Die Autoren folgerten, daß die Auslösung des RNA-Degradationsmechanismus von einem Grenzwert der transgenen mRNA gesteuert wird. Nach diesem Modell stellt der RNA-Degradationsmechanismus einen Regulationsmechanismus für überexprimierte Gene dar. Lindbo & Dougherty (1992b) sowie Lindbo *et al.* (1993) wiesen mit dem translatierbaren CP-Gen des TEV in transgenen Pflanzen zwei unterschiedliche Resistenzphänomene nach. Ein Teil der transgenen Linien zeigte eine Immunität (“Infektions-Resistenz”), wogegen andere eine “Recovery-Resistenz” aufwiesen. Dabei trat zuerst eine systemische Infektion auf, der Neuzuwachs war jedoch zunehmend symptomschwächer und schließlich vollständig virusfrei. Bei einer Neuinfektion waren diese neugebildeten Blätter dann Infektions-resistent. Smith *et al.* (1994) stellten ein Modell zur Erklärung dieser verschiedenen Resistenzphänomene auf. Bei einer Infektions-resistenten transgenen Linie befindet sich die mRNA Konzentration des Transgens oberhalb des Grenzwertes und die infizierende virale RNA gleicher

Sequenz wird, ebenso wie die transgene RNA, degradiert. Bei transgenen Linien, die eine Recovery-Resistenz aufweisen, erhöht erst die replizierende virale RNA die mRNA-Konzentration soweit, daß der Schwellenwert überschritten wird und der sequenzspezifische Degradationsmechanismus aktiviert wird.

Goodwin *et al.* (1996) führten die Unterschiede der beiden Phänotypen auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Anzahl der transgenen Insertionen der viralen Sequenz und dem auftretenden Resistenzphänomen zurück. In dieser Arbeit führten ein bis zwei Kopien der viralen Sequenz zu einer Recovery-Resistenz, während drei oder mehr Kopien eine Infektions-Resistenz erzeugten. Die Autoren schlußfolgerten, daß drei oder mehr Kopien des Transgens zu einem höheren Transkriptionslevel, und damit zu einer Überschreitung des RNA-Schwellenwertes, führen. In Pflanzen mit einer Recovery-Resistenz wird der Schwellenwert, mit der darauf folgenden Degradation, erst durch die infizierende virale RNA erreicht. Tanzer *et al.* (1997) konnten zeigen, daß Pflanzen, die eine Infektions-Resistenz gegenüber dem TEV besaßen, bei einer Infektion im jungen Entwicklungsstadium eine Recovery-Resistenz aufwiesen. Dieses Modell der entwicklungspezifischen Unterschiede in der Resistenzreaktion wird von Elmayan & Vaucheret (1996) unterstützt. Sie zeigten, daß homozygote transgene Pflanzen, die eine Einzelkopie des *gus*-Gens unter Kontrolle des 35S-Promotors tragen, eine RNA-Degradation früher in der Entwicklung erzeugen, als die entsprechenden heterozygoten Pflanzen. Die Autoren postulierten daher für das PTGS einen Dosis-Effekt der transgenen Transkripte.

Andere Untersuchungsergebnisse (English *et al.*, 1996) konnten mit der Schwellenwert-Theorie der RNA-Degradation nicht erklärt werden. Die Autoren beschrieben einen Pflanzenexpressionsvektor (PVX), welcher das *gus*-Gen unter Kontrolle eines subgenomischen Promotors zur Pflanzenexpression trägt. Die systemische Infektion dieses chimären PVX-Klons wurde in *gus*-transgenen Pflanzen, die posttranskriptionales "gene-silencing" des *gus*-Gens aufwiesen, unterdrückt. Es konnte gezeigt werden, daß das Ziel des Resistenzmechanismus in der 3'-Region des *gus*-Gens zu finden ist und mit der Methylierung in diesem Bereich korreliert. Die Autoren schlugen die Methylierung als Grund für die Erzeugung von verkürzten, aberranten mRNAs vor, da es aufgrund der Methylierung zu einer vorzeitigen Termination der Transkription im 3'-Bereich kam. Eine Korrelation zwischen DNA-Methylierung und PTGS konnten auch Van Houdt *et al.* (1997) nachweisen. Metzloff *et al.* (1997) schlugen RNA-Doppelstränge als Aberration für die Degradations-

markierung vor. Dies wurde auch von Hamilton & Baulcombe (1998) unterstützt. Die Autoren zeigten in transgenen Pflanzen, die ein posttranskriptionales "gene silencing" aufwiesen, das Vorhandensein von kurzen "antisense" RNA Fragmenten des transgenen Transkriptes. Sie schlugen eine Basenpaarung dieser Fragmente mit dem transgenen Transkript vor, welche damit eine entscheidende Rolle bei der Markierung für eine sequenzspezifische Degradation der RNA spielen könnten. Damit wird der Unterschied zur Schwellenwerttheorie deutlich, denn nach diesem Modell ist posttranskriptionales "gene-silencing" nicht nur von der RNA-Konzentration abhängig, sondern wird zusätzlich über eine qualitative Markierung der mRNA ausgelöst.

In einem dritten Ansatz stellten Baulcombe & English (1996) ein Modell der DNA-DNA-Paarung von homologen transgenen Sequenzen auf, die bei mehrfacher Insertion eines Transgens an verschiedenen Loci auftreten können. Dabei stellen die transgenen Sequenzen einen "silencer-" und einen "receptor-locus" dar. Durch die DNA-Interaktion wird die Transkription des Rezeptors verändert und führt zur Bildung von aberranten RNAs. Wenn diese aberrante RNA produziert wird, dient sie bevorzugt als Template für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase und markiert die transgene RNA, wie auch in den anderen Modellen beschrieben. Für die DNA-Paarung und das daraus resultierende PTGS ist ein Promotor nicht notwendig (Voinnet *et al.*, 1998). Dieses Modell kann jedoch die Resistenz von transgenen Pflanzen gegenüber RNA-Viren nur in dem Fall erklären, wenn die virale transgene Sequenz in mindestens zwei Kopien vorliegt.

Diese unterschiedlichen Erklärungsansätze des PTGS schließen sich jedoch nicht zwingend gegenseitig aus. Zum Beispiel bestünde die Möglichkeit, daß auch die aberrante RNA erst dann als Ziel für eine Nuklease dient, wenn ihre Konzentration einen gewissen Schwellenwert überschritten hat. Ebenso wäre es denkbar, daß die DNA-DNA-Interaktion erst zur Transkription von aberranter RNA führt.

Das Phänomen des PTGS, welches an vielen Beispielen in dikotylen Pflanzen gezeigt werden konnte, wurde auch zum ersten Mal für monokotyle *Saccharum* spp. hybrid (Zuckerrohr), welche mit dem nichttranslatierbaren CP-Gen des SMV transformiert waren, gezeigt (Ingelbrecht *et al.* 1999).

Kürzlich konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Infektion einiger Viren das PTGS eines *gus*-Transgens oder eines viralen Transgens blockieren kann (Brigneti *et al.*, 1998 und Anandalakshmi *et al.*, 1998). Die Autoren schlußfolgerten, daß das PTGS einen natürlichen pflanzlichen Mechanismus der Virusabwehr oder Virusresistenz

darstellen könnte, der die Akkumulation viraler RNA in der Pflanze beeinträchtigt. Pang *et al.* (1997) konnten zeigen, daß auch mit dem um die Hälfte verkürzten viralen N-Gen (387 Bp statt 866 Bp) des TSWV RNA-vermittelte Resistenz in transgenen Pflanzen gegenüber TSWV erzeugt werden kann. Diese Untersuchungen konnten von Sijen *et al.* (1996) unterstützt werden, die zeigten, daß ein Teil des viralen Transportprotein-Gens des CPMV das Ziel für den RNA-Degradationsmechanismus in transgenen Pflanzen, die mit dem vollständigen Gen transformiert wurden, darstellt. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß auch unvollständige virale Gene ausreichend sein können, um Virusresistenz in transgenen Pflanzen zu erzeugen.

Potyviren und Pathogen-vermittelte Resistenz

Aus dem Bereich der wirtschaftlich bedeutenden Potyviren ist eine große Anzahl von Genen oder Genabschnitten zur Pflanzentransformation und zur Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz verwendet worden. Darunter befinden sich sämtliche Gene des Potyvirusgenoms, mit Ausnahme des HCpro-Gens. In verschiedenen Fällen konnte auch mit nichttranslatierbaren Genen oder antisense-Sequenzen eine Resistenz erzeugt werden. Einen Überblick über die Pflanzentransformationen, die zu einer Resistenzvermittlung geführt haben, gibt Tab.1.

Tab. 1: Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz gegenüber Potyviren

Autoren	Virus	Gen oder Genabschnitt
Audy <i>et al.</i> (1994)	PVY	NIb, tr.
Clough & Hamm (1995)	ZYMV	CP, tr.
Dinant <i>et al.</i> (1993)	LMV	CP, tr.
Dougherty <i>et al.</i> (1994)	TEV	5'-NTR+CP, ntr.
Fang & Grumet (1993)	ZYMV	CP, tr. und as.
Farinelli & Malnoe (1993)	PVY	CP, tr.
Fitch <i>et al.</i> (1994)	PRSV	CP, tr.
Guo <i>et al.</i> (1997)	PPV	NIb, tr.
Hammond & Kamo (1995)	BYMV	660 bp CP-3'-NTR, as.
Ingelbrecht <i>et al.</i> (1999)	SMV	CP, ntr.

as.: antisense, tr.: translatierbar, ntr.: nichttranslatierbar

Tab. 1: Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz gegenüber Potyviren (Fortsetzung)

Autoren	Virus	Gen oder Genabschnitt
Jones <i>et al.</i> (1998)	PSbMV	NIb, tr.
Korte <i>et al.</i> (1995)	PPV	CI, CP-NAT, tr. und ntr.
Lindbo & Dougherty (1992)	TEV	CP, ntr.
Maiti <i>et al.</i> (1993)	TVMV	NIa, tr.
Moreno <i>et al.</i> (1998)	TVMV	P1, P3, tr.
Namba <i>et al.</i> (1992)	WMV+ ZYMV	CP, tr.
Ravelonandro <i>et al.</i> (1993)	PPV	CP, tr.
Regner <i>et al.</i> (1992)	PPV	CP, tr.
Scorza <i>et al.</i> (1994)	PPV	CP, tr.
Silva-Rosales <i>et al.</i> (1994)	TEV	CP verkürzt, tr. und ntr.
Smith <i>et al.</i> (1994)	PVY	CP tr., ntr. und as.
Swaney <i>et al.</i> (1995)	TEV	6K ₁ und NIa tr. und ntr.
Tavert-Roudet <i>et al.</i> (1998)	PPV	P1 tr.
Timpe <i>et al.</i> (1992)	PPV	CP-AT tr.
Vardi <i>et al.</i> (1993)	PVY	NIa tr.
Wittner <i>et al.</i> (1998)	PPV	CI tr.

as.: antisense, tr.: translatierbar, ntr.: nichttranslatierbar

Freisetzung und Kommerzialisierung transgener virusresistenter Pflanzen

Die Anzahl der Freisetzungsexperimente transgener virusresistenter Pflanzen hat in den letzten Jahren vor allem in den USA stark zugenommen. Eine Vielzahl von wirtschaftlich bedeutenden Kulturpflanzen, transformiert mit unterschiedlichen viralen Genen, werden im Freiland untersucht.

Mittlerweile sind drei virusresistente Pflanzen, die mit translatierbaren CP-Genen transformiert wurden, in den USA für den kommerziellen Anbau zugelassen. Dazu gehört ZYMV und WMV2 resistenter Kürbis, der mit CP-Genen beider Viren transformiert wurde. Die CP-Gene beider Viren stammen aus aphidenübertragbaren Isolaten und sind mit nichttranslatierten Bereichen des CMV ausgestattet. Weiterhin ist Kürbis zugelassen, der zusätzlich zum CP des WMV2 und des ZYMV mit dem CP des CMV ausgestattet ist. Auch das CMV-CP ist mit nichttranslatierten Bereichen des

CMV versehen. Die dritte Pflanze, die kommerziell in den USA angebaut werden darf ist Papaya, welche mit dem translatierbaren CP-Gen des PRSV transformiert wurde. Im vereinfachten Freisetzungsverfahren dürfen Versuche mit zwei transgenen virusresistenten Kartoffellinien durchgeführt werden, die mit dem nichttranslatierbaren aphidenübertragbarem CP-Gen des PVY oder dem ORF1, gemeinsam mit dem CP-Gen des PLRV (ORF2), transformiert wurden (White, 1999).

Sicherheitsaspekte transgener virusresistenter Pflanzen

Die Erzeugung von transgenen virusresistenten Pflanzen, unter Verwendung viraler Gene, hat gegenüber konventioneller Resistenzzüchtung den Vorteil, daß die Virusresistenz relativ einfach und schnell erzeugt werden kann. Wie jedoch bei allen anderen transgenen Pflanzen, die mittels gentechnischer Veränderungen erzeugt wurden, wird auch hier die Frage nach eventuellen Sicherheitsrisiken gestellt. Die potentiellen Risiken sind Synergismus, Heterologe Enkapsidierung, Komplementation und Rekombination.

Synergismus

Der Synergismus von Pflanzenviren bei Mischinfektionen zweier verschiedener Viren ist ein wenig untersuchter Bereich. Bei Mischinfektionen kann es zu einer Symptomverstärkung und zu einer vermehrten Replikation eines der beiden infizierenden Viren kommen (Pruss *et al.*, 1997 und Hu *et al.*, 1998). Bei diesem Phänomen kommt es jedoch nicht zu einer Veränderung der genetischen Konstitution eines der beiden Viren. Shi *et al.* (1997) zeigt, daß dieser Effekt nicht nur auf Mischinfektionen beschränkt ist. Auch transgene virale Sequenzen können diesen synergistischen Effekt auf andere infizierende Viren ausüben. Ähnliche Ergebnisse konnten von Palukaitis (1998) gezeigt werden.

Heterologe Enkapsidierung

Die Heterologe Enkapsidierung ist definiert als der Einbau von fremden Hüllproteinuntereinheiten in die Partikel eines Virus. Sie wurde zuerst bei Mischinfektionen verschiedener Isolate des BYDV nachgewiesen (Creamer & Falk, 1990). Bei Mischinfektionen wird zwischen einer vollständigen Heterologen Enkapsidierung (Transkapsidierung) und dem nur teilweisen Einbau des fremden Hüllproteins ("phenotypic mixing") unterschieden (Wen & Lister, 1991). Die Heterologe

Enkapsidierung spielt für die potentiellen Sicherheitsrisiken transgener virus-resistenter Pflanzen eine Rolle, da mit dem heterologen Hüllprotein auch Funktionen, wie z.B. Blattlausübertragbarkeit auf das fremde Virus übertragen werden könnten. Werden transgene Pflanzen mit translatierbaren CP-Genen transformiert und diese exprimiert, so kommt es bei einer Infektion mit nahe verwandten Viren zu einem heterologen Einbau des transgenen CPs in die Partikel des infizierenden Virus. Dies ist mittlerweile mehrfach in transgenen Pflanzen nachgewiesen worden (Farinelli *et al.*, 1992 und Candelier-Harvey & Hull, 1993). Maiss *et al.* (1995) zeigten in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen, die mit dem translatierbaren PPV-AT Hüllproteingen transformiert waren, in 42,5-100 % der untersuchten Partikel eine Heterologe Enkapsidierung mit infizierendem PVY. Mit Viren aus unterschiedlichen Genera (PVX, TMV und BNYVV) konnte keine Heterologe Enkapsidierung nachgewiesen werden. In der gleichen transgenen Linie konnte zu ähnlichen prozentualen Anteilen eine Heterologe Enkapsidierung mit anderen Potyviren (PStV, ChVMV und BiMoV) nachgewiesen werden (Maiss *et al.*, 1995). Die Wiederherstellung der Blattlausübertragbarkeit des ZYMV, nach Heterologer Enkapsidierung mit einem aphidenübertragbarem Hüllprotein des PPV in transgenen Pflanzen, konnte von Lecoq *et al.* (1993, 1994) nachgewiesen werden.

Komplementation

Im System der transgenen virusresistenten Pflanze und einem infizierenden Virus bedeutet Komplementation, daß ein transgenes virales Protein die Funktionalität einer Mutante, die in diesem korrespondierenden Gen einen Defekt besitzt, wiederherstellt, indem das transgene Protein die Funktion des defekten viralen Proteins übernimmt. Beispiele für eine homologe Komplementation in transgenen Pflanzen sind bei Deom *et al.* (1987), Osbourn *et al.* (1990); Holt & Beachy (1991); Schoelz & Wintermantel (1993); Li & Carrington (1995) und Spillane *et al.* (1997) angegeben, wobei eine virale Defektmutante durch das entsprechende transgene intakte Protein komplementiert wurde. Kaplan *et al.* (1995) wiesen die Komplementation durch transgenes CMV 3a Protein in *N. tabacum* nicht nur von 3a defektem CMV, sondern auch von anderen Cucumoviren mit einem Ausbreitungsdefekt in *N. tabacum* Pflanzen nach (BMV und PSV). Untersuchungen von Cooper *et al.* (1996) mit ausbreitungsdefektem CMV und TMV konnten diese Ergebnisse unterstützen. Ein weiteres Beispiel Heterologer Komplementation von viralen Defektmutanten konnte von Morozov *et al.* (1997)

gegeben werden. In diesem Fall handelte es sich jedoch um transient exprimierte funktionelle Transportproteine verschiedener Viren anderer Virusgruppen, die ein ausbreitungsdefizientes PVX komplementierten. Jakab *et al.* (1997) schlossen aus diesen Phänomenen, daß sich in transgenen virusresistenten Pflanzen ökologische Nischen für virale Defektmutanten bilden könnten, die somit bezüglich dieses Gens vom natürlichen Selektionsdruck befreit wären. Das Szenario, welches nach diesen Untersuchungen vorstellbar, aber keinesfalls nachgewiesen ist, ist die systemische Infektion von transgenen Pflanzen mit Viren, die aufgrund einer *in-trans* Komplementation dazu befähigt sind. Diese Möglichkeit müßte dann jedoch auch bei natürlich auftretenden Mischinfektionen in Betracht gezogen werden. Die Voraussetzung für eine Komplementation ist die Translation des Transgens. Nichttranslatierbare Gene, die auch Resistenz in transgenen Pflanzen vermitteln, können einen Gendefekt eines Virus nur über Rekombination rekonstituieren, nicht jedoch die Proteinfunktion komplementieren (s.u.). Transgene virusresistente Pflanzen, die an der Schwelle zur Kommerzialisierung stehen oder sich bereits im Anbau befinden, sind zum Teil mit translatierbaren funktionellen Genen transformiert (s.o.).

Rekombination

Innerhalb der RNA-Viren scheint die Rekombination eine wichtige Rolle für die Genomreparaturmechanismen, Erzeugung von Diversität, Adaption und virale Evolution zu spielen (Lai, 1992; Dolja & Carrington, 1992; Aranda *et al.*, 1997; MacFarlane, 1997 und Roossinck, 1997). Eine Zusammenfassung zu diesem Thema wurde von Simon & Bujarski (1994) erstellt.

Die Replikation viraler RNA ist durch eine hohe Fehlerrate, bedingt durch die fehlende Fehlerkorrekturlesefähigkeit ("proofreading") der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase (RdRp), gekennzeichnet. Diese Eigenschaft, in Zusammenhang mit einer sehr häufigen Replikation, führt zu einer dynamischen Viruspopulation (Quasi-Spezies) mit vielen Sequenzvarianten, die unter dem Selektionsdruck stehen, ein funktionelles Genom beizubehalten (Holland & Domingo, 1998).

Rekombinationen sind für verschiedenen Pflanzenviren nachgewiesen worden, Beispiele hierfür sind die Bromoviren (Nagy & Bujarski, 1996), Tobraviren (MacFarlane, 1997), Tombusviren (Robinson *et al.*, 1987), (White & Morris, 1994), Tobamoviren (Shirako & Brakke, 1994), Cucumoviren (Van der Kuyl *et al.*, 1991 und Fraile *et al.*, 1997), Nepoviren (Rott *et al.*, 1991 und Le Gall *et al.*, 1995) und

Hordeiviren (Edwards *et al.*, 1992).

Im Genus *Potyvirus* konnten RNA-Rekombinationen von Cervera *et al.* (1993) nachgewiesen werden. In diesem Fall wurden natürlich vorkommende Rekombinationsereignisse aus Sequenzhomologievergleichen abgeleitet. Gal-On *et al.* (1998) konnten den ersten experimentellen Nachweis für eine Rekombination zweier künstlich erzeugter defekter RNA-Spezies des ZYMV erbringen.

Die weit verbreitete und akzeptierte Definition der RNA-Rekombination, basierend auf der Sequenzhomologie der rekombinierenden RNA Moleküle, wurde von Lai (1992) aufgestellt. Die Definition stellt die homologe Rekombination der heterologen Rekombination gegenüber. Die homologe Rekombination findet zwischen gleichen oder zumindest ähnlichen Sequenzen statt, die heterologe Rekombination hingegen tritt zwischen RNA Molekülen auf, die keine Homologie und keine Beziehung zueinander aufweisen. Die homologe Rekombination kann weiter in präzise und unpräzise Rekombination unterteilt werden, je nachdem wie genau das "crossing-over" die homologen Sequenzen neu verbindet. Eine alternative Klassifizierung, die die Mechanismen der Rekombination mit einbezieht, ist von Nagy & Simon (1997) vorgeschlagen worden.

Für den Mechanismus der Rekombination bestehen zur Zeit zwei sich stark voneinander unterscheidende Modelle. Auf der einen Seite besteht das "cleavage-ligation" Modell auf der anderen Seite das RdRp vermittelte "copy-choice" Modell, wobei für das "cleavage-ligation" Modell nur wenig experimentelle Evidenz zu finden ist (Aaziz & Tepfer, 1999). Weitaus stärker akzeptiert ist das "RdRp-copy-choice" Modell. Die Rekombination findet während der Replikation oder auch RNA-Synthese statt, wobei die RdRp auf dem RNA-Donorstrang die Synthese des entstehenden Stranges unterbricht und zum Akzeptorstrang wechselt ("template-switch"), um dort die Synthese zu vervollständigen (Cooper *et al.*, 1974). Diese Theorie der Beteiligung der RdRp wird durch Untersuchungen von Nagy *et al.* (1995) und Figlerowicz *et al.* (1997), die am Beispiel des BMV nachweisen, daß Mutationen der viralen Replikase die Rekombination beeinflussen, unterstützt. In fast allen veröffentlichten Untersuchungen an Pflanzenviren wurden rekombinante Viren unter hohem Selektionsdruck nachgewiesen, wobei die rekombinanten Viren, die keinen Selektionsvorteil aufwiesen, wahrscheinlich nicht nachweisbar waren. Diese mögliche Unterschätzung der Häufigkeit von viralen Rekombinationen ist systemimmanent. Es ist daher keine generelle Aussage über die Rekombinations-

häufigkeit möglich, sondern nur über die Häufigkeit von Rekombinationsereignissen, die zu einem intakten Virus mit einem Selektionsvorteil gegenüber der jeweiligen Defektmutante führen. Es scheint, als würden unterschiedliche Pflanzenviren nicht mit der gleichen Häufigkeit rekombinieren. Revers *et al.* (1996) fanden bei detaillierten phylogenetischen Studien verschiedener Potyvirusisolate eine Vielzahl von Rekombinationsereignissen, wogegen Candresse *et al.* (1997) bei dem Vergleich verschiedener CMV Sequenzen keine Rekombinationsereignisse nachweisen konnten. Dabei ist allerdings anzumerken, daß CMV ein tripartites Genom besitzt und in der Lage ist, Pseudorekombinanten zu bilden. Dies bedeutet, daß ohne zu rekombinieren einzelne subgenomische Funktionen zwischen unterschiedlichen Viren ausgetauscht werden können (Habili & Francki, 1974 und Salanki *et al.*, 1997).

Seit der ersten Einführung von viralen Genen in Pflanzen, zur Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz, wird die Frage diskutiert, ob und in welchem Umfang die Nukleinsäuren des Transgens mit viralen Nukleinsäuren von infizierenden Viren rekombinieren können (De Zoeten, 1991 und Tepfer, 1993). Im Falle einer homologen Rekombination könnte eine virale Defektmutante rekonstituiert werden. Beim Auftreten einer heterologen Rekombination könnten ein Teil oder das gesamte Transgen in das Genom eines anderen Virus inkorporiert werden. Diese permanente Veränderung in der genetischen Konstitution könnte unter Umständen die Konkurrenzfähigkeit, die Wirts- und Vektorspezifität und die Virulenz des Virus beeinflussen. Da das transgene virale Transkript in jeder Zelle vorhanden ist, wird angenommen, daß die Rekombination zwischen transgenen viralen Genen oder Transkripten und infizierenden Viren häufiger als natürliche Rekombination in Mischinfektionen auftritt. Dies wird jedoch im Zusammenhang mit RNA-vermittelter Resistenz, bei der ein Auftreten von nur geringen Transkriptkonzentrationen beobachtet werden kann, diskutiert (Chasan, 1993) (s.o.). Bei einem derartigen Resistenzphänomen könnte die Wahrscheinlichkeit für ein Rekombinationsereignis unter Umständen noch geringer sein als in Mischinfektionen.

Eine Rekombination in transgenen Pflanzen mit viralen Genen, sowohl von RNA- wie auch von DNA-Viren, konnte in verschiedenen Arbeiten beobachtet werden.

Greene & Allison (1994) wiesen die Rekonstitution einer CCMV CP-Deletionsmutante mit dem transgenen intakten Teil des CP-Gens nach. Mit einer ausbreitungsdefizienten Deletionsmutante von RCNMV konnten Lommel & Xiong (1991) ein ähnliches Rekombinationsereignis in transgenen Pflanzen, die das intakte Gen des

“movement-proteins” beinhalteten, nachweisen. Weitere Nachweise, hier jedoch von DNA-Viren, wurden von Gal *et al.* (1992) und Frischmuth & Stanley (1998) geführt. Eine isolatübergreifende Rekombination konnte von Schoelz & Wintermantel (1993) mit zwei Isolaten des CaMV nachgewiesen werden. Viren der Caulimovirusgruppe unterscheiden sich in sofern von RNA-Viren, daß ein “template-switch” der RT Teil des viralen Replikationszyklus ist. Alle diese Arbeiten basierten auf künstlich erzeugten Mutanten, bei denen das defekte Virus einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt wurde und die Rekombination einen starken Selektionsvorteil für das rekonstituierte Virus darstellte. Der Nachweis einer Rekombination, bei dem das infizierende Virus keinen Ausbreitungsdefekt besaß, jedoch über Rekombination mit transgener viraler Sequenz seine Pathogenität erhöhte, konnte von Wintermantel & Schoelz (1996) nachgewiesen werden. In diesem Fall lag ein eher moderater Selektionsdruck vor. Borja *et al.* (1999) zeigten die Wiederherstellung mittels RNA-Rekombination einer CP-Deletionsmutante von TBSV in transgenen Pflanzen, die das intakte CP exprimierten. Die Rekonstitution fand auch hier unter eher moderatem Selektionsdruck statt, da die CP-Deletionsmutante in der Lage war, die Pflanze systemisch zu infizieren. Das über Rekombination ins Genom inkorporierte Wild-Typ CP-Gen mußte dem rekonstituierten Virus einen Selektionsvorteil gegenüber der Mutante verschafft haben. Welche Funktion hier wiederhergestellt wurde, ist jedoch nicht bekannt.

Zielstellung

1. Heterologe Enkapsidierung

In dieser Arbeit sollten transgene PPV-resistente *N. benthamiana* Pflanzen erzeugt werden, die mit modifizierten CP-Genen transformiert werden sollten. Die translatierbaren CP-Gene sollten so verändert sein, daß sie Resistenz vermitteln, jedoch eine Heterologe Enkapsidierung mit fremden Potyviren in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen nicht unterstützen. Die zu erzeugenden transgenen Pflanzen sollten bezüglich der transgenen Expression, der Kopienzahl, des Resistenzverhaltens und des zugrunde liegenden Resistenzmechanismus charakterisiert werden.

2. Komplementation

Auch in dieser Arbeit sollten transgene virusresistente Pflanzen mit translatierbaren Genen hergestellt werden, die unter Umständen fremden infizierenden Viren virale

Funktionen über Komplementation zur Verfügung stellen könnten. Daher sollte das Phänomen der Komplementation von Defektmutanten des PPV in transgenen PPV-resistenten *N. benthamiana* Pflanzen genauer untersucht und Möglichkeiten gefunden werden, dieses Phänomen zu unterdrücken. Weiterhin sollten modifizierte HCpro-Gene des PPV erstmals zur Pflanzentransformation verwendet werden und damit auf ihre resistenzvermittelnde Eigenschaft überprüft werden. Die translatierbaren HCpro-Gene sollten bezüglich ihrer Blattlausübertragungseigenschaften funktionslos gemacht werden. Damit sollte verhindert werden, daß diese Funktion einer transgenen HCpro fremden infizierenden Viren zur Verfügung gestellt wird. Auch diese zu erzeugenden Pflanzen sollten bezüglich der oben angegebenen Eigenschaften charakterisiert werden.

3. Rekombination

Eine weitere wichtige Aufgabe in dieser Arbeit war, den experimentellen Nachweis für das Auftreten von Rekombinationen des PPV in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen, die das PPV CP exprimieren, zu erbringen. Nach erfolgtem Rekombinationsnachweis sollten Möglichkeiten untersucht werden, das Auftreten von Rekombinationen des PPV in transgenen Pflanzen zu verhindern oder zu reduzieren. Über die ursprüngliche Zielstellung hinaus wurde versucht ein System zu etablieren, um rekombinante Viren *in-vivo* aus verschiedenen Defektmutanten zu erzeugen. Dies System ermöglicht unter Umständen Rekombinationsuntersuchungen mit dem Ziel, virale Sequenzen zur Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz zu finden, die keine Rekombination unterstützen, ohne dafür transgene Pflanzen herstellen zu müssen. Weiterhin könnte dies System die Möglichkeit bieten, *in-vivo* virale Rekombinante zu erzeugen, die bereits auf ihre Replikations- und Ausbreitungsfähigkeit selektiert sind. Diese Untersuchungen könnten dazu beitragen, den Rekombinationsmechanismus und die daran beteiligten viralen Proteine zu untersuchen.

Die gewonnenen Erkenntnisse aus den Ergebnissen der Resistenzzeugung, den Untersuchungen zur Komplementation, zur Heterologen Enkapsidierung und zur Rekombination sollten verwendet werden, um Schlußfolgerungen für die zukünftige Herstellung von transgenen virusresistenten Pflanzen zu ziehen.

2 MATERIAL

2.1 Antiseren

Die folgend aufgelisteten Antiseren wurden in dieser Arbeit zur Detektion oder Immunadsorption von verschiedenen Proteinen des PPV und PVX im PTA-ELISA, IC-RT/PCR, ISEM, bei der Dekoration von elektronenmikroskopischen Präparaten und im Immunnachweis ("Immunoassay") nach Westernblot (EBIA) verwendet.

Antiserum gegen	Bezeichnung	Herkunft
HCpro PPV rekombinant (Rohserum)	AS 568	Prof. Dr. E. Maiß
CP PPV rekombinant (Rohserum)	AS 570	Prof. Dr. E. Maiß
CP PPV rekombinant (IgG,, OD 1,0)	IgG 570	siehe 3.3.1
CP PVX (IgG)	PVX-IgG	Loewe

Die folgenden Antiseren wurden zur Detektion von Digoxigenin oder von Kaninchenantikörpern im ELISA, bei der Dekoration von elektronenmikroskopischen Präparaten, im EBIA oder im Sondennachweis nach Southern-Hybridisierung verwendet.

Antiserum gegen	Bezeichnung	Herkunft
Digoxigenin (AP-konjugiert)	Anti-DIG-AP	Boehringer Mannheim
Kaninchenantikörper (AP-konjugiert)	GaR-AP	Sigma
Kaninchenantikörper (10 nm Gold-konjugiert)	GaR-Gold	Aurion

2.2 Bakterienstämme

Art, Gattung	Bezeichnung	Beschreibung
<i>E. coli</i>	NM 522	F' lacI ^Q Ä(lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺ /supE thi Ä(lac-proAB)Ä(hsdMS-mcrB)5 (r _k ⁻ m _k ⁻ McrBC ⁻)
<i>A. tumefaciens</i>	LBA 4404	(Hoekema <i>et al.</i> , 1983)

2.3 Viren und virale Klone

Viren

Name	Wirtspflanze	Abkürzung	Herkunft
<i>Plum pox virus</i> , nicht aphidenübertragbar	<i>N. benthamiana</i> (experimentell)	PPV-NAT	Prof. Dr. E. Maiß
<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun nn	TMV	Dr. D.-E. Lesemann (BBA)
<i>Tobacco vein mottling virus</i>	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun nn	TVMV	Dr. D.-E. Lesemann (BBA)
<i>Potato virus X virus</i>	<i>N. benthamiana</i> (experimentell)	PVX	Dr. D.-E. Lesemann (BBA)
<i>Potato virus Y</i> , N-Stamm	<i>N. benthamiana</i> (experimentell)	PVY-N	Dr. D.-E. Lesemann (BBA)
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	<i>C. sativus</i>	ZYMV	DSMZ Braunschweig
<i>Chilli veinal mottle virus</i>	<i>N. benthamiana</i> (experimentell)	ChiVMV	DSMZ Braunschweig
<i>Brome streak mosaic virus</i>	<i>H. vulgare</i>	BrSMV	Dr. R. Götz

Virale Klone

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene infektiöse virale “full-length” Klone eingesetzt, die nachfolgend kurz beschrieben sind.

p35PPV-NAT

Von PPV-NAT stand ein infektiöser “full-length” Klon unter Kontrolle des 35S Promotors (CaMV) zur Verfügung (p35PPV-NAT) (Maiss *et al.*, 1992). Bei Infektion von Wirtspflanzen des PPV wie *Nicotiana benthamiana* mit diesem Plasmid werden, ausgehend vom 35S Promotor, im Zellkern *in-vivo* Transkripte der gesamten viralen Erbinformation hergestellt. Eine Abb. des Klones befindet sich im Anhang 8.1.

pPVX201

Für diese Arbeit wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. Baulcombe (John Innes Centre, The Sainsbury Laboratory, Norwich, England) ein infektiöser “full-length” Klon des *Potato virus X* zur Verfügung gestellt (pPVX201). In dem Klon befindet sich die virale Erbinformation unter Kontrolle des 35S Promotors zur direkten Infektion von

Pflanzen mit Plasmiden für die Erzeugung von *in-vivo* Transkripten. Der Klon besitzt einen verdoppelten subgenomischen Promotor des Hüllproteingens und ist mit einer MCS ausgestattet, die es ermöglicht, beliebige ORF unter Kontrolle des subgenomischen CP-Promotors des PVX, in mit diesem chimären Konstrukt infizierten Pflanzen, zu exprimieren (Baulcombe *et al.*, 1995). Eine Abbildung der Plasmidkarte des pPVX201, befindet sich im Anhang 8.1.

2.4 Pflanzenmaterial

***Nicotiana benthamiana* 17.27.1.**

N. benthamiana ist die experimentelle Wirtspflanze für das PPV. Als nichttransgene Wirtspflanze für sämtliche Infektionsversuche wurde eine Linie von *N. benthamiana* gewählt, die Gewebekultur, Pflanzentransformation und Regeneration durchlaufen hat, jedoch nichttransgen ist (Timpe *et al.*, 1992).

***Nicotiana benthamiana* 17.27.4.**

Diese transgene homozygote T2-Linie von *N. benthamiana* wurde mit dem vollständigen funktionsfähigen CP-Gen von PPV-AT (Abb. 1, A) in einer pflanzlichen Expressionskassette in Tandemanordnung mit einer transgenen Insertion (siehe 4.2.1) transformiert (Timpe *et al.*, 1992). Alle Pflanzen dieser Linie besitzen eine Recovery-Resistenz gegenüber dem PPV. Pflanzen dieser Linie können mit PPV infiziert werden. Nach etwa zwei Wochen zeigen die Pflanzen ein Erholungsphänomen und der Neuaustrieb ist symptomfrei.

***Nicotiana benthamiana* 4.30.45. und 4.30.60.**

Diese transgenen homozygoten T2-Linien von *N. benthamiana* wurden mit dem vollständigen funktionsfähigen CP-Gen von PPV-NAT (Abb. 1, B) in einer pflanzlichen Expressionskassette mit einer transgenen Insertion (siehe 4.2.1) transformiert (Korte *et al.*, 1995). Die Linie 4.30.45. besaß die gleiche oben erwähnte Recovery-Resistenz. Von den 35 getesteten Pflanzen zeigten 25 eine Recovery-Resistenz, 5 eine Infektions-Resistenz und 5 keine Resistenzreaktion. Fünf Wochen nach der Inokulation mit PPV konnten in Recovery-resistenten Pflanzen dieser Linie mittels ISEM im Neuaustrieb keine PPV-Partikel mehr nachgewiesen werden, obwohl in primärinfizierten Blättern Viruspartikel vorhanden waren. Die Linie 4.30.60. zeigte eine

Infektionsresistenz gegenüber dem PPV, das heißt, es war nicht möglich, die Pflanzen dieser Linie durch mechanische Inokulation mit dem PPV zu infizieren. Von den 35 getesteten Pflanzen zeigten 30 eine Infektions-Resistenz und 3 eine Recovery-Resistenz. In Infektions-resistenten Pflanzen dieser Linie konnten fünf Wochen nach Inokulation mittels ISEM weder in primärinfizierten Blättern noch in Blättern des Neuzuwachses PPV Partikel nachgewiesen werden. Die pflanzlichen Expressionskassetten der verschiedenen transgenen *N. benthamiana* sind in Abb. 1 dargestellt.

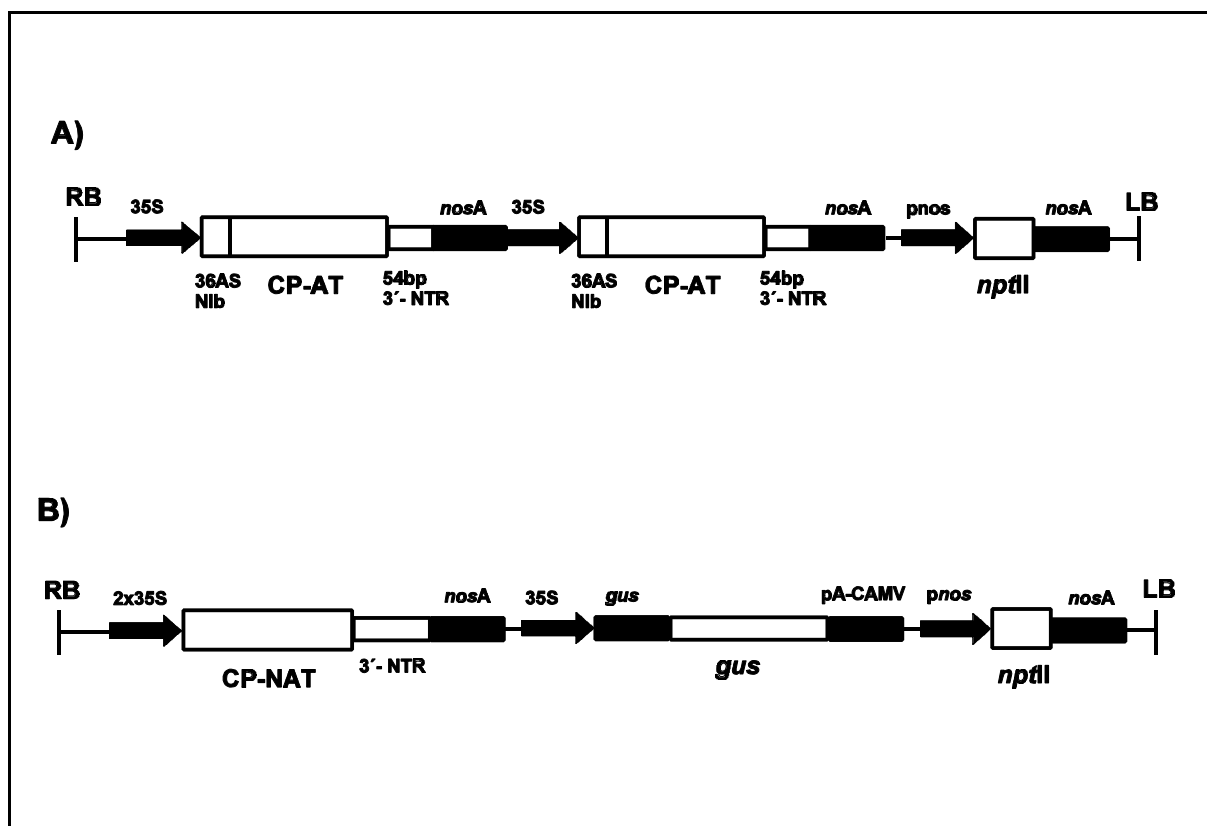


Abb. 1: Pflanzliche Expressionskassetten aus unterschiedlichen transgenen *N. benthamiana*

A): Linie 17.27.4. B): Linie 4.30.45. und 4.30.60., 35S:CaMV 35S-Promotor, pA-CaMV: CaMV Polyadenylierungssignal,, pnos: nopalinsynthetase Promotor, 3'-NTR: 3'-nichttranslatierter Bereich, Nib: Nuclear Inclusion body b, nptII: neomycin phosphotransferase, gus: β -Glucuronidase.

2.5 Enzyme

2.5.1 Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungssequenz (5'-3')	Hersteller	Konzentration
<i>AatII</i>	AGGCCT	MBI	4 U/ μ l
<i>ApaI</i>	GTCCAC	Biolabs	10 U/ μ l
<i>BamHI</i>	GGATCC	MBI	10 U/ μ l
<i>BglII</i>	AGATCT	MBI	10 U/ μ l
<i>Bsp120I</i>	GGGCC	NEB	10 U/ μ l
<i>Ecl136II</i>	GAGCTC	MBI	10 U/ μ l
<i>EcoRI</i>	GAATTC	MBI	10 U/ μ l
<i>EcoRV</i>	GATATC	Promega	10 U/ μ l
<i>EspI</i>	GCTNAGC	MBI	10 U/ μ l
<i>HindIII</i>	AAGCTT	MBI	10 U/ μ l
<i>KpnI</i>	GGTACC	MBI	10 U/ μ l
<i>NcoI</i>	CCATGG	MBI	10 U/ μ l
<i>NgoMI</i>	GCCGGC	NEB	10 U/ μ l
<i>NheI</i>	GCTAGC	MBI	10 U/ μ l
<i>PstI</i>	CTGCAG	MBI	12 U/ μ l
<i>SacI</i>	GAGCTC	MBI	10 U/ μ l
<i>SacII</i>	CCGCGG	MBI	10 U/ μ l
<i>SalI</i>	GTCGAC	MBI	10 U/ μ l
<i>SplI (BsiWI)</i>	CGTACG	MBI	7 U/ μ l
<i>XbaI</i>	TCTAGA	MBI	10 U/ μ l
<i>XhoI</i>	CTCGAG	NEB	10 U/ μ l

2.5.2 DNA/RNA modifizierende Enzyme

Enzym	Hersteller	Konzentration
RNaseA	Fluka	75 U/mg
RQ1 DNase	Promega	1 U/ μ l
T4 DNA-Ligase	MBI	1 U/ μ l
Klenow-Fragment	MBI	10 U/ μ l

2.5.3 Polymerasen

Enzym	Hersteller	Konzentration
<i>Taq</i> -Polymerase (rekombinant, keine erkennbare 3' - 5' Korrekturlesung)	MBI	1 U/ μ l
AMV Reverse Transkriptase	Invitrogen	10 U/ μ l
T7 DNA-Polymerase	Pharmacia	8 U/ μ l

2.5.4 Protein modifizierende Enzyme

Enzym	Hersteller	Konzentration
Proteinase K	Appligene	20 mg/ml

2.5.5 Zellwand abbauende Enzyme

Enzym	Hersteller	Konzentration
Lysozym	Merck	20.000 E/mg

2.6 Plasmide und Klonierungsvektoren

Plasmidbezeichnung	Beschreibung	Hersteller
pT7T319U	Phagemid	Promega
pSL1180	Klonierungsvektor	Pharmacia
LITMUS28	Klonierungsvektor	NEB
pTQGUSN(<i>Nhe</i> I) pTQGUSH(<i>Hind</i> III)	Klonierungsvektor zur Herstellung pflanzlicher Expressionskassetten	Prof. Dr. E. Maiß
pLX222	Binärer Vektor	Landsmann <i>et al.</i> (1988)
pBluescript-II SKM	Phagemid	Promega
pBluescript-C SKM	Phagemid	Promega

Die Plasmidkarten der einzelnen Vektoren mit den jeweils relevanten Restriktionsschnittstellen befinden sich im Anhang 8.2. Die Plasmidkarten wurden mit dem Programm Vector NTI (siehe 3.6) angefertigt.

3 METHODEN

Alle Methoden sind, den notwendigen Arbeitsabläufen entsprechend in Fließschemata angegeben, um die Reproduzierbarkeit zu vereinfachen. Um eine gute Übersichtlichkeit zu gewährleisten, befinden sich alle Bestandteile für die jeweils verwendeten Lösungen im Anhang 8.8. Die verwendeten Geräte sind tabellarisch im Anhang 8.7 aufgelistet.

3.1 Biologische Methoden

3.1.1 Anzucht von Pflanzenmaterial

Nicotiana spec.

Die Samen von transgenen oder nichttransgenen *N. benthamiana* wurden in 10er Töpfen auf angefeuchtetes Torfkultursubstrat Pikiererde (TKS Typ-P) ausgestreut und mit einem Petrischalendeckel gegen Austrocknung abgedeckt. Nach einer Woche bei 20/22 °C Heizungstemperatur/Lüftungstemperatur (HT/LT) und zusätzlichem Assimilationslicht (PAR) konnten die Keimlinge zu 30 Stück pikiert werden. Nach weiteren drei bis vier Wochen unter gleichen Kulturbedingungen und Ausbildung von ca. vier Laubblättern wurden die Pflanzen in 10er Töpfe getopft.

3.1.2 Mechanische Übertragung von Pflanzenviren

Zum Zweck der mechanischen Übertragung von Pflanzenviren zur Viruserhaltung oder für Untersuchungen zur Resistenztestung, Rekombination oder Bestimmung von Heterologer Enkapsidierung, wurde ein mittelgroßes Blatt (0,5 g) einer infizierten Pflanze mit deutlichen Virussympptomen, die etwa drei Wochen zuvor inokuliert worden war, in 2 ml 0,03 M HEPES (pH 7,0) gemörsert (Verdünnung 1/5). Es folgte ein Einstäuben von drei Blättern der zu infizierenden Pflanze mit Cellite. Die Virussuspension wurde mit einem breiten Glasstab leicht drei- bis viermal über die Blattoberfläche gerieben, um die notwendigen Verletzungen der Zellwand für eine Virusinfektion zu schaffen. Abschließend wurden die Pflanzen leicht mit Wasser überbraust. Die Kulturbedingungen entsprachen denen zur Pflanzenanzucht.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Agrobakterium vermittelte Pflanzentransformation

Die Agrobakterien vermittelte Pflanzentransformation wurde mit binären Plasmiden nach der Blattscheibentransformationsmethode mit Kokultivierung nach Horsch *et al.* (1985) durchgeführt. Dabei verursachen die Agrobakterien an verletzten Pflanzenzellen eine Übertragung der auf der T-DNA lokalisierten Gene des Ti-Plasmides in das Pflanzengenom. Die Theorie der Herstellung von binären Plasmiden, Entfernung von Auxin-, Cytokinin-, und Opingenen (Pathogenitätsfaktor), sowie die Einklonierung eines *E. coli* Replikationsursprung wird in Glick (1994) ausführlich erläutert.

3.2.1.1 Anzucht von *A. tumefaciens*

Der *A. tumefaciens* Stamm LBA4404 (Hoekema *et al.*, 1983) wurde freundlicherweise von Dr. J. Landsmann (BBA) für Pflanzentransformationsexperimente zur Verfügung gestellt. *A. tumefaciens* LBA4404 wächst, fraktioniert auf LB-Platten ausgestrichen, bei 28 °C innerhalb von zwei Tagen zu Einzelkolonien (siehe 8.3). Zur Pflanzentransformation wurde eine Einzelkolonie von *A. tumefaciens* LBA4404 in 20 ml LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika bei 28 °C und 250 Upm bis zu einer OD_{550nm} von 0,5-0,8 (max. 1,0) kultiviert. Dauerkulturen (DK) von *A. tumefaciens* wurden angelegt, indem im 1,5 ml Eppendorfgefäß 850 µl Bakteriensuspension aus 2 x ü.N.-Kultur mit 150 µl Glycerin_{87%} (autoklaviert) gemischt und bei -20 °C gelagert wird. Aus diesen Dauerkulturen konnte wiederum ein fraktionierter Ausstrich auf Agarplatten erfolgen.

3.2.1.2 Anzucht und Erhaltung von *N. benthamiana* Pflanzen in Gewebekultur

Als Ausgangsmaterial wurden untransformierte Samen von *N. benthamiana* verwendet. *N. benthamiana* Samen sollten vor Aussaat für Gewebekultur nach folgender Methode oberflächensterilisiert werden:

- Ca. 200-300 Samen in ein Eppendorfgefäß einfüllen.
- Inkubation für 10 min in 1 ml 0,25 % Natriumhypochlorid (aktives Chlor).

- Eppendorfgesäß regelmäßig invertieren.
- Natriumhypochlorid-Lsg. mit Pipette entnehmen.
- 2 x mit 1 ml EtOH_{70%} spülen (zügig arbeiten, EtOH verhindert die Keimung).
- Reste von EtOH vollständig entfernen.
- 3 x mit A bidest. (autoklaviert) spülen.
- Auslegen der Samen zur Keimung auf MS0-Medium in Kulturgefäßen (4-6 Samen/Gewebekulturgefäß).
- Inkubation in einem Lichtthermostaten für ca. 8 Wochen bis ausreichend Blattfläche für Blattscheibentransformationen zur Verfügung steht.

3.2.1.3 Wachstumsbedingungen im Lichtthermostat

Die Wachstumsbedingungen im Lichtthermostaten waren auf 16 h Licht, 8 h Dunkelheit, 26 °C Tagestemperatur und 22 °C Nachttemperatur eingestellt.

3.2.1.4 Transformation von *A. tumefaciens* mittels Elektroporation

Für die Transformation von *A. tumefaciens* mit binären Plasmiden zum Zwecke der Pflanzentransformation stehen prinzipiell drei unterschiedliche Methoden zur Verfügung. "triparental mating" (An, 1987), Chemische Transformation über abwechselndes Einfrieren und Wiederauftauen "freeze-thaw" (Chen *et al.*, 1994) und Transformation über Elektroporation (Mattanowich *et al.*, 1989). Die Elektroporation ist im Vergleich zum "triparental mating" sehr einfach durchzuführen und liefert eine sehr viel höhere Transformationsrate als die "freeze-thaw" Methode. Sie wurde daher in dieser Arbeit verwendet.

Die Aufnahme der Plasmid-DNA in Bakterienzellen wird durch Anlegen eines elektrischen Feldes hoher Stärke induziert. Über den Mechanismus der DNA-Aufnahme ist nur sehr wenig bekannt. Wie bei der chemischen Transformation sollen sich in der Bakterienzellwand aufgrund des Elektroschocks kurzzeitig Poren ausbilden, die eine DNA-Aufnahme nach Kontakt mit der Lipiddoppelmembran ermöglichen (Glick, 1994).

Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens*

Zur Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* LBA4404 wurde eine kombinierte Methode aus der Anleitung für den Elektroporator der Fa. Invitrogen, von Nagel *et al.* (1990) und von Mattanovich *et al.* (1989) gewählt. Die Transformationsrate beträgt bis zu 10^{10} Transformanden/ μg DNA für die Elektroporation von *E. coli*. Sie ist für *A. tumefaciens* mit $1-1,5 \times 10^6$ angegeben. Da hier jedoch nur superhelical aufspiralisierte ("supercoiled") Plasmide transformiert wurden, die aufgrund ihrer Sekundärstruktur eine sehr viel höhere Transformationsrate besitzen, spielte die Transformationsrate nur eine untergeordnete Rolle.

Die Zellen wurden auf folgende Art und Weise vorbereitet (siehe 8.3):

- Ausstreichen von *A. tumefaciens* LBA4404 auf LB + 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Str-Platten.
- Inkubation für 48 h bei 28 °C.
- Animpfen von 20 ml LB+Str., ü.N.-Kultur bei 250 Upm und 28 °C.
- Zugabe von 10 ml der ü.N.-Kultur zu 1 l LB-Medium (LB mit 5 g statt 10 g NaCl)
- Inkubation für ca. 3-4 h bis zu einer OD_{550} von 0,5-0,8 bei 28 °C.
- Kühlen des Kolbens für 15-30' auf Eis und alle weiteren Arbeitsschritte auf Eis durchführen.
- Zellen bei 4000 x g für 15' bei 4 °C in RC5B Rotor SLA1500 abzentrifugieren.
- Möglichst vollständige Abnahme des Überstandes.
- Resuspendieren des Bakterienpellets in 1 l eiskaltem 1 mM HEPES pH 7,0 (KOH), Zentrifugation wie oben.
- Wiederholung des Arbeitsschritt mit 500 ml HEPES.
- Wiederholung des Arbeitsschritt mit 20 ml eiskaltem Glycerin_{10 %}.
- Pellet in einem Endvolumen von 2-3 ml eiskaltem Glycerin_{10 %} resuspendieren.
- Aliquots von 40 μl in 0,5 ml Eppendorfgefäß in N_2 (flüssig) einfrieren und bei -70 °C lagern; die Bakterien sind so bis zu sechs Monate lagerfähig.

Elektroporation

Die Elektroporation wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: Kapazität (50 μF), Widerstand (150 Ohm), Spannung (1500 V) und Stromstärke (25 mA). Es wurden Elektroporationsküvetten der Fa. Eurogentec mit einem Elektrodenabstand von 0,1 cm

verwendet. Die Elektroporation wurde wie folgt durchgeführt:

- Auftauen der Bakterienaliquots für ca. 5´ auf Eis.
- Zugabe von 2-3 µl des entsprechenden Plasmids einer Minipräparation (siehe 3.2.1.5) zu den Zellen im Eppendorfgefäß auf Eis, vorsichtig mischen. Eine Negativkontrolle entsprechend ohne Plasmid behandeln.
- Überführen der Lsg. in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette.
- Elektroporation im Gerät mit o.a. Parametern.
- Sofortige Zugabe von 1 ml eiskaltem SOC in die Küvette und mit Pasteurpipette mischen.
- Überführen der Probe in 1,5 ml Eppendorfgefäß und Schütteln für 3-4 h bei 28 °C und 250 Upm.
- Ausplattieren von 100-150 µl Aliquots/Agarplatte auf entsprechenden Selektivmedien, hier 25 mg Str und 4 mg Tc/l LB-Medium (pLX222).
- Inkubation der Platten für mindestens 48 h bei 28 °C bis Einzelkolonien sichtbar werden.

3.2.1.5 Plasmidpräparation aus *A. tumefaciens*

Das transformierte Plasmid mußte aus antibiotikaresistenten *A. tumefaciens* präpariert und mittels Restriktionsverdau überprüft werden. Zur Plasmidminipräparation aus *A. tumefaciens* wurde die Methode aus An *et al.* (1988) benutzt (siehe 8.8.1):

- Anziehen einer Einzelkolonie von rekombinanten *A. tumefaciens* LBA4404 in 5 ml LB-Str-Tc für 48 h bei 28 °C und 250 Upm.
- 2 ml Kultur in 2 ml Eppendorfgefäß für 30´´ bei 13000 Upm abzentrifugieren und in 100 µl Lsg. A plus Lysozym (eiskalt) resuspendieren. Zentrifugation und Resuspendieren wiederholen.
- Zentrifugation wiederholen und Pellet in 100 µl Lsg. 1 resuspendieren (eiskalt).
- Zugabe von 200 µl Lsg. B, mischen und 10´ bei Rt inkubieren.
- Zugabe von 30 µl Phenol equilibriert mit Lsg. B kurz vortexen bis die Suspension viskos wird.
- Zugabe von 150 µl NaOAc 3 M (pH 4,8), kurz schütteln und Inkubation für 15´ bei -20 °C.

- Zentrifugation für 3´ bei 13000 Upm, Überstand ohne Phenol in ein Eppendorfgefäß überführen.
- Auffüllen mit EtOH_{abs.}, mehrfach invertieren, Inkubation für 15´ bei -70 °C.
- Zentrifugation für 3´ bei 13000 Upm, Verwerfen des Überstandes.
- Zugabe von 0,3 M NaOAc (pH 7.0) und resuspendieren des Pellets.
- Auffüllen mit EtOH_{abs.}, mehrfach invertieren, Inkubation für 15´ bei -70 °C.
- Zentrifugation für 3´ bei 13000 Upm, den Überstand möglichst vollständig verwerfen.
- Zugabe von 1 ml EtOH_{70%}, Zentrifugation für 1´ bei 13000 Upm, den Überstand verwerfen.
- Trocknen des Pellets für 5´ im Vakuumkonzentrator.
- Resuspendieren des Pellets in 50 µl RNase-A. bidest..
- 5 µl für Restriktionskontrollspaltung (siehe 3.2.5.2) einsetzen.

3.2.1.6 Blattscheibentransformation

3.2.1.7 Vorbereitung der zu transformierenden Pflanzen

Für alle Arbeiten war eine sterile Werkbank Voraussetzung. Es wurde steriles Werkzeug, wie Skalpelle, Flachpinzetten, Messer und Rasierklingen eingesetzt. Für die Transformation von Blattscheiben von *N. benthamiana* wurden Blattscheiben von *in-vitro* Kulturpflanzen benutzt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen befindet sich im Anhang 8.8.2.

- Zugabe von 10 ml MS-Flüssigmedium in Glaspetrischale.
- Ausschneiden der Mittelrippe und Abschneiden des Blattrandes.
- Anfertigen von Blattstücken mit ca. 1 cm² Oberfläche.
- Auflegen der Blattscheiben auf das Flüssigmedium ohne die nach oben zeigende Blattunterseite zu benetzen.
- Zugabe von 200 µl der Agrobakteriensuspension (s.o.) in die Petrischale.
- Inkubation im Lichtthermostaten für 48 h unter einem Blatt Papier leicht abgedunkelt.
- Entnahme der Blattstückchen aus den Petrischalen.
- Waschen der Blattstückchen 3-5 x in A. bidest. (autoklaviert) + 500 mg Claforan/l.

- Auslegen der Blattstücke zum Trocknen auf steriles Filterpapier in Petrischalen.
- Auslegen der Blattstücke mit der Unterseite nach oben auf vorbereitete T1-Platten.
- Vorsichtiges Andrücken der Blattstücke; dabei müssen vor allem die Blattränder Kontakt mit dem Medium bekommen (10 Blattstücke/Platte).
- Die Blattstücke alle 2 Wochen auf frisches T1-Medium umsetzen.
- Nach 3-5 Wochen erscheinen die ersten Sprosse aus dem undifferenzierten Kallus.
- Umsetzen der Sprosse möglichst ohne Kallus zur Wurzelbildung auf T2-Medium.
- Aus jedem Kallus nur einen Sproß weiterkultivieren, um Doppeltestungen des gleichen Transformationsereignisses zu vermeiden.

3.2.1.8 Regeneration und Selektion

Die durch *A. tumefaciens* LBA4404 transformierten Zellen der Blattscheiben erhielten, durch Integration der T-DNA zwischen rechter und linker Grenze (RB/LB), neben viralem Gen und *gus*-Gen eine Kanamycinresistenz (*nptII*). Nur transformierte Zellen am Rand der Blattscheibe waren damit in der Lage auf T1-Medium Sprosse zu regenerieren. Die nicht transformierten Zellen starben ab, welches durch Chlorophyllverlust und Verbräunen der Blattscheiben sichtbar wurde. Die Kanamycin-resistenten Sprosse wurden in Reagenzgläser mit T2- oder MS-Medium umgesetzt und bis zur Ausbildung von deutlichen Wurzeln und Blättern im Lichtthermostaten inkubiert. Teile von ersten Blättern konnten steril entnommen und auf β -Glucuronidase Aktivität (siehe 3.2.1.9) getestet werden.

3.2.1.9 β -Glucuronidase-Selektion (*gus*-Test)

Die potentiellen Transgenen sollten auf β -Glucuronidase Aktivität getestet werden. Das Enzym β -Glucuronidase (*gus*) kann von dem Substrat X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Beta-D-Glucoronid) die Glucuronsäure abspalten. Nach oxidativer Dimerisierung des Restes entsteht ein unlöslicher indigoblauer Farbstoff. Der *gus*-Test wurde nach Jefferson *et al.* (1987) und De Block & Debrouwer (1992) durchgeführt

(siehe 8.8.3).

Die Blattstückchen der potentiell transgenen Sprosse aus Reagenzgläsern wurden ausgeschnitten und in ELISA-Platten überführt. Es erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Farbstofflösung in jede Vertiefung. Die Blattstückchen wurden mit der Lösung für 5-10' vakuuminfiltriert. Eine Farbreaktion setzte mehrere Stunden nach der Infiltration und Inkubation bei 37 °C ein. Eine Entfärbung des Chlorophylls mit EtOH_{90 %} für 5' ließ eine bessere visuelle Unterscheidung zwischen gefärbten und ungefärbten Blattstückchen auch ohne Binokular zu.

Der *gus*-Test wurde ebenfalls zur Testung der transienten *gus*-Expression in ganzen bombardierten Blättern (siehe 3.2.13.2) in größeren Volumina verwendet (5 ml/Blatt). Für die Präparation von Viruspartikeln, aus mit Farbstofflösung infiltrierten Blättern nach erfolgter *gus*-Färbung, wurde auf eine Entfärbung mit EtOH_{90 %} verzichtet.

3.2.1.10 Erzeugung von T₁/T₂-Generation und Resistenztestung

Die Kanamycin-resistenten und *gus*-positiven regenerierten Pflanzen wurden aus den Reagenzgläsern entnommen, die Wurzeln von Medienresten durch Abwaschen mit warmem Wasser gereinigt und in autoklaviertes TKS in 10er Töpfe gepflanzt. Um ein Austrocknen der Blätter bis zur Ausbildung funktionsfähiger Abschlussgewebe zu verhindern, wurden die Pflanzen ca. eine Woche unter Plastikfolie mit zusätzlicher Schattierung unter sonst normalen Gewächshausbedingungen gehalten. Zur Abhärtung wurde nach und nach die Folie geschlitzt und abschließend entfernt. Es folgte ein Umsetzen der Pflanzen nach Blühbeginn in 14er Töpfe. Im Gewächshaus konnten die Pflanzen frei abblühen und bis zur Samenreife kultiviert werden. Die Samen der T₁-Generation wurden wie oben angegeben ausgesät und 15 Pflanzen einer jeden transgenen Linie zur Resistenztestung gegen das PPV angezogen.

Die Resistenz gegenüber dem PPV konnte durch mechanische Inokulation von ca. vier bis fünf Wochen alten T₁-Pflanzen bestimmt werden (siehe 3.1.2). Die Anzahl infizierter Pflanzen wurde, nach dem Auftreten erster Symptome an gleichzeitig inokulierten nichttransgenen *N. benthamiana* Pflanzen gleichen Alters, visuell bonitiert. Die Bonitur der Virussympptome und der auftretenden Resistenzreaktion wurde, nach Auftreten der ersten Symptome an nichttransgenen Pflanzen, alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Bei Auftreten eines Erholungsphänomens (Recovery) wurde der symptomfreie Neuzuwachs noch mindestens zwei weitere Wochen regelmäßig

bonitiert. Die Infektions-resistenten oder Recovery-resistenten Pflanzen wurden zur Erzeugung von Samen der homozygoten T₂-Generation bis zur Samenreife kultiviert. Ein Resistenztest der Pflanzen der T₂-Generation ermöglichte Aussagen zum Aufspaltungsverhalten, bevor einzelne Linien selektiert und für weitere Experimente, wie der Bestimmung der transgenen Insertionen oder der Bestimmung der Heterologen Enkapsidierung, herangezogen wurden.

3.2.1.11 Homozygotietestung

Ungefähr 200 Samen der einzelnen T₂-Generation wurden zur Bestimmung der Homozygotie oberflächensterilisiert (siehe 3.2.1.2) und auf MS-Medium unter Zusatz von 400 mg Kn/ l MS-Medium ausgelegt (siehe 8.8.2). Sowohl transgene Kanamycin-resistente und nichttransgene Samen keimten gleichermaßen. Nach dem Entfalten der Keimblätter und dem Beginn der Photosynthese begann die herbizide Wirkung des Kanamycins und nichttransgene Keimlinge starben ab. Für weitere Untersuchungen wurden ausschließlich homozygote T₂-Linien verwendet.

3.2.2 Nachweis transgener Insertionen im Pflanzenmaterial

Die Theorie zum Nachweis der Anzahl transgener Insertionen im Pflanzengenom sei kurz erläutert. Die Voraussetzung war das Vorliegen einer sehr sauberen ungescherten genomischen pflanzlichen Gesamt-DNA. Diese Gesamt-genomische DNA mußte mit einem spezifischen Restriktionsenzym verdaut werden. Die Restriktionsschnittstellen innerhalb der pflanzlichen Expressionskassette, zwischen rechter und linker Integrationsgrenze des Ti-Plasmids, waren bekannt. Da das Restriktionsenzym auch außerhalb der Integrationsgrenzen schnitt, entstanden für jede transgene Insertion unterschiedlich große Restriktionsfragmente. Als Restriktionsenzym wurde in diesem Fall *EcoRV* verwendet. Eine Abbildung der beiden in dieser Arbeit verwendeten pflanzlichen Expressionskassetten mit den entsprechenden Schnittstellen verdeutlicht das eben Beschriebene (Abb. 2). Diese Fragmente konnten nach Verdau und "blotting" der Gesamt-DNA auf einer positiv geladenen Nylonmembran mit Hilfe einer Sonde, die spezifisch mit einem Teil der Expressionskassette hybridisiert, detektiert werden. Dabei sollten entsprechende Positiv- und Negativkontrollen eingesetzt werden. Als Sonde wurde in dieser Arbeit ein

Teil des 2x35S Promotors gewählt, welcher in der gesamten pflanzlichen Expressionskassette zweimal vorhanden ist (CP/HCpro-Promotor, *gus*-Promotor). Die Anzahl der transgenen Insertionen ließ sich anhand der variablen Fragmente, die von jeder Insertion durch *EcoRV*-Verdau erzeugt wurden, bestimmen.

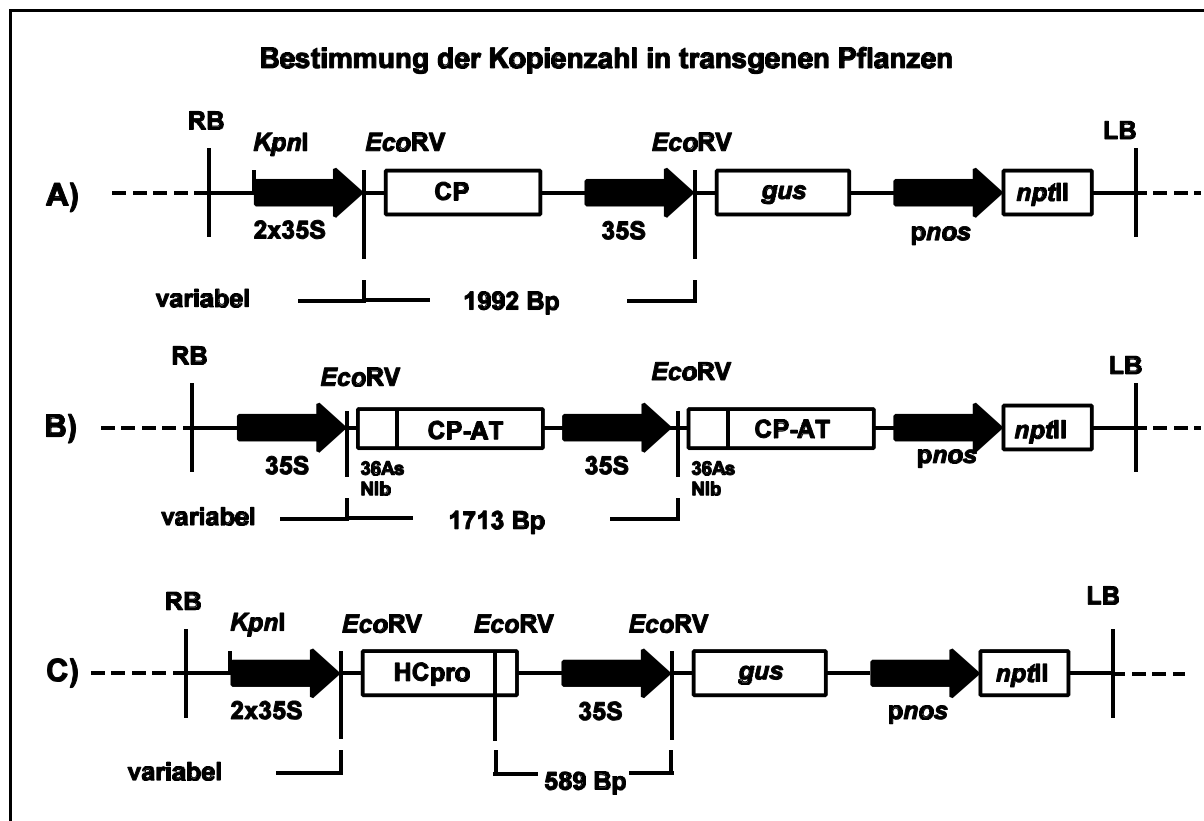


Abb. 2: Bestimmung der transgenen Kopienzahl in transgenen Pflanzen
 Aufbau der binären Ti-Plasmide: A): 4.30.45, 4.30.60. und neu erzeugte CP-Linien; B): Linie 17.27.4.; C): neu erzeugte HCpro-Linien; *EcoRV*: *EcoRV*-Schnittstelle, 35S:CaMV 35S-Promotor, *pnos*: Nopalin Synthetase Promotor, *nptII*: Neomycinphosphotransferase II, *gus*: β -Glucuronidase, CP: Hüllproteingen, HCpro: Helferkomponente Protease, CP-AT: aphidenübertragbares CP, Nlb: Nuclear Inclusion body b

3.2.2.1 Präparation von DNA aus Pflanzenmaterial

Zur Präparation von hochreiner pflanzlicher Gesamt-DNA wurde ein Extraktionskit (ISO-Quick) der Fa. Eurogentec benutzt. Der Arbeitsablauf konnte mit leichten Modifikationen aus der Anleitung des Extraktionskits übernommen werden (siehe 8.8.4).

- Mörsern von 200 mg frischem oder -70 °C Blattmaterial in N₂ flüssig.
- Nicht mehr als 100-150 mg in ein vorgekühltes 2 ml Eppendorfgefäß überführen.
- Zugabe von 50 µl Proben-Puffer, warten bis das Material auftaut.
- Zugabe von 100 µl Lysis-Lösung.
- Zugabe von 700 µl Extraktions-Matrix (vorher gut schütteln).
- Zugabe von 400 µl Extraktions-Puffer, bis zu 1' gut vortexen (nicht länger).
- Zentrifugation für 10-15' bei 13000 Upm bei 4 °C.
- Überführen von 400-500 µl Überstand ohne Interphase in neues Eppendorfgefäß.
- Zugabe von 40-50 µl Natriumacetat und 440-550 µl Isopropanol (-20 °C).
- Vorsichtig invertieren, um Nukleinsäuren zu präzipitieren.
- Zentrifugation für 15' bei 4 °C und 13000 Upm.
- Waschen des Pellets mit 1 ml EtOH_{70%}.
- Zentrifugation für 10' bei 4 °C und 13000 Upm.
- Trocknung des Nukleinsäurepellets nach EtOH-Abnahme für 15' bei Rt.
- Resuspendieren in 100 µl RNase TE 10/0,1 pH 8.0 (Plasmidmini-präparation).
- Auftragen von 5 µl auf ein Agarosegel und Standard-Gelelektrophorese.
- Abschätzen der DNA-Ausbeute für Restriktion von annähernd gleichen Mengen.

3.2.2.2 Restriktionsverdau von Pflanzen-DNA

Die gesamte Pflanzen-DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 200 µl mit 50 Einheiten von *EcoRV* unter Zusatz des entsprechenden Restriktionspuffers (20 µl Promega-Yellow) für 4-5 h bei 37 °C verdaut. Der vollständige Verdau wurde mittels Standard Gelelektrophorese eines 5 µl Aliquots überprüft. Bei einem vollständigem Verdau war auf dem Kontrollgel keine Bande genomischer hochmolekularer DNA mehr zu sehen, sondern ausschließlich Abbauprodukte unterschiedlicher Größe.

3.2.2.3 Southern-Transfer von Pflanzen-DNA zur Hybridisierung

Der Southern Transfer wurde in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt (siehe 8.8.5):

- Einengen des 195 µl Restvolumens des Verdaus im Vakuumkonzentrator auf ca. 25 µl.
- Auftragen von 12,5 µl auf ein 1 %-iges Gibco-pure Agarose-Gel ohne EtBr.
- Auftrennstrecke mindestens 10-12 cm und Nachfärbung in TAE plus 40 µl/l einer EtBr-Stammlösung von 10 mg/ml für 10'.
- Herstellen eines Dokumentationsfotos mit Größenstandard zur anschließenden Probenlokalisierung.
- Depurinierung für 10' in der Kunststoffärbeschale mit Depurinierungslösung.
- Denaturierung für 40', nach 20' Denaturierungslösung wechseln.
- Spülen des Gels mehrfach mit A. bidest..
- Neutralisierung des Gels für 30', nach 15' Neutralisierungslösung wechseln.
- Zuschneiden von ca. 20 Lagen Whatman 3M und Filterpapier auf Gelgröße.
- Spülen des Gels sowie Einlegen von Whatman 3M und Hyb.-Filter in 2x SSC.
- Zusammenbau eines blasenfreien Standardkapillarblots (siehe 8.8.5).
- Abkleben der Kanten des Gels mit Parafilm um Pufferkurzschluss zu vermeiden.
- Durchführung des Neutralkapillarblots ü.N. mit 20 x SSC.
- Abbau des Blots, Markierung der Membranrückseite mit Kugelschreiber.
- Fixierung der DNA (crosslinking bei $\lambda = 302 \text{ nm}$) mit UV-C, jede Membranseite für 45''-1' bestrahlen.
- Waschen der Membran für 3' in 2 x SSC .
- Backen der Membran für 10' bei 80 °C zwischen zwei Lagen Whatman 3M Papier.

Als Membran wurde positiv geladene Nylonmembran (Nylon-Bind-B, Serva) eingesetzt.

3.2.2.4 Sondenherstellung

Als Sonde zur Detektion von transgenen Insertionen wurde üblicherweise ein Teil der pflanzlichen Expressionskassette gewählt. Ein Nachweis der Sonde nach der Hybridisierung wurde durch den Einbau von mit Digoxigenin markierten Nukleotiden (DIG-11-dUTPs) (Boehringer/Mannheim) in die Sonde durchgeführt. Das eingebaute Digoxigenin läßt sich über einen spezifischen Antikörper detektieren. Diese Methode ermöglicht den sensitivsten Nachweis auch von Einzelkopiegenen (Boehringer/Mannheim). Sie liegt in der Nachweisempfindlichkeit bei Einzelkopiegenen aus genomischer DNA. Der Einbau von DIG-11-dUTP sollte über die PCR in die Sonde erfolgen. Die Zusammensetzungen der Lösungen für die durchgeführte PCR-Reaktion sind im Anhang 8.8.6 zu finden. Der Einbau von DIG-11-dUTP mittels PCR wurde nach einem Protokoll aus Lahaye *et al.* (1996) durchgeführt. Der Reaktionsansatz und das entsprechende PCR-Programm zur Sondenamplifizierung sind im Anhang 8.8.6 zu finden.

Ein Aliquot der Sonde konnte über Gelelektrophorese, neben dem ungelabelten PCR-Fragment aus dem Sondenplasmid, auf den Einbau von DIG-11-dUTP überprüft werden. Aufgrund des hohen Molekulargewichtes von DIG-11-dUTP im Vergleich zu dTTP lief das gleich große PCR-Fragment im Agarosegel wesentlich langsamer.

Herstellung einer Positivkontrolle

Zum Zweck der Herstellung einer Positivkontrolle wurde von der Minipräparation des Sondenplasmids eine Verdünnungsreihe hergestellt (1/20, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000 und 1/10000). Von diesen Verdünnungsstufen wurde jeweils 1 µl auf ein Stück Nylonmembran getropft. Die Depurinierung, Denaturierung, Neutralisierung und das Spülen in 20 x SSC und 2 x SSC wurde jeweils für 5´ auf mit den Lösungen angefeuchtetem Whatman 3M Papier durchgeführt. Die UV-Fixierung, das Backen und alle Hybridisierungsschritte waren gemeinsam mit der Membran durchzuführen.

Bestimmung der Sondenkonzentration

Die Sensitivität und der Hintergrund bei der Hybridisierung sind von der Sondenkonzentration stark beeinflusst. Um abschätzen zu können, in welcher Menge die Sonde für die Hybridisierung einzusetzen war, mußte ihre Konzentration bestimmt werden. Von der DIG-11-dUTP markierten pBR328 Kontroll DNA (ca. 1 ng/ µl) wurde

eine Verdünnungsreihe von 1/100-1/100000 (10 pg-0,01 pg/ µl) in TE-Puffer (10/0,1) hergestellt. Auf die Testmembran wurde von jeder Verdünnung je 1 µl getropft. Die markierte Sonde sollte 1/50 verdünnt und auch davon eine Verdünnungsreihe 1/10-1/100000 hergestellt werden. Von jeder Verdünnung war 1 µl auf die Membran aufzutropfen.

Die DNA wurde durch UV-C (jede Seite 45'') an die Membran gebunden. Es folgte eine Behandlung für 1 h mit 2 % "blocking-" Reagenz im Maleinsäure-Puffer unter sanftem Schaukeln. Es folgte eine Inkubation im gleichen Puffer unter Zugabe von Anti-DIG-AP 1/5000 verdünnt für 30'. Abschließend wurde die Membran 2 x 15' in Maleinsäure-Puffer plus Tween-20 (0,3 %) gewaschen. Es folgte der Nachweis der Alkalischen Phosphatase mit dem Farbstoffsystem NBT/BCIP. Die Membran wurde für 2' in "detection-" Puffer äquilibriert. Der Puffer wurde entfernt und es folgte die Zugabe von 10 ml "detection-" Puffer + 50 µl NBT + 37,5 µl BCIP Stammlösungen. Nach der Inkubation im Dunkeln für 20' konnte über einen Vergleich der Blaufärbung und die DNA-Konzentration der Sonde abgeschätzt werden. Für die Hybridisierung galt als Richtwert der Einsatz von 10-20 ng Sonden-DNA/ml Hybridisierungslösung.

3.2.2.5 Hybridisierung

Die einzelnen Schritte der Hybridisierung wurden, wie auch die Bestimmung der Sondenkonzentration in Anlehnung an "The DIG system user's guide for filter hybridisation" (Boehringer Mannheim), mit leichten Modifikationen durchgeführt.

- Einschweißen der Membran in einen Folienbeutel.
- Zugabe von 50 ml DIG-Easy-Hybridisierungslösung.
- Inkubation für 3 h bei 42 °C im Hybridisierungs-Glasröhrchen.
- Aufkochen der Sonde im Eppendorfgesäß für 10' bei 95 °C, anschließend Abkühlung auf Eis.
- Zugabe der entsprechenden Menge Sonde zu 10 ml DIG-Easy-Hyb (vorgewärmt).
- Austausch der Prähybridisierungslösung und Hybridisierung ü.N. bei 42 °C im Hybridisierungs-Glasröhrchen.
- Aufbewahrung der benutzten Sonde bei -20 °C in autoklaviertem sauberen Gefäß.

- Durchführung aller Waschschrirte in autoklavierten Hybridisierungs-röhrchen.
- Waschen für 2 x 10' mit je 0,5 l 2 x SSC, 0,1 % SDS bei RT.
- Waschen für 2 x 15' mit je 0,5 l 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 60 °C.

3.2.2.6 Sondennachweis ("Chemoluminescent detection")

- Durchführung des Sondennachweis in Kunststoffschalen, mit A. bidest. und EtOH_{abs.} gespült.
- Äquilibrieren der Membran für 2' in Maleinsäure-Puffer.
- Schaukeln der Membran in 100 ml 2 % Blocking-Lösung für 1 h bei Rt.
- Verdünnung von Anti-DIG-AP 1/6000 in Blocking-Lösung (3,3 µl/20 ml).
- Austausch der Blocking-Lösung, für 30' bei Rt leicht schaukeln.
- In neuer sauberer Schale die Membran für 3x 10' in je 250 ml Maleinsäurepuffer 0,3 % Tween-80 leicht schaukeln.
- Äquilibrieren der Membran in Detection-Puffer für 5'.
- Abtropfen der Membran und auf Plastikfolie feucht auflegen.
- Zugabe von 1 ml 0,25 mM CDP-Star (25 mM Lsg. 1/100)
- Entfernen der Luftblasen, Inkubation für 5' bei Rt.
- Wegstreichen von überschüssigem Reagenz, Folie verschweißen.
- Auflegen eines Röntgenfilms für 15'-1 h zur Autoradiographie.

3.2.3 Präparation viraler RNA aus Pflanzenmaterial

Die virale RNA wurde zur Amplifizierung mittels RT/PCR und anschließender Klonierung präpariert. Die Präparation der Gesamt-RNA konnte teilweise von der deutlich schnelleren Gesamtnukleinsäure-Präparation abgelöst werden.

3.2.3.1 Gesamt-RNA Präparation

Die im folgenden beschriebene Präparation von Gesamt-RNA aus Blattmaterial von *N. benthamiana* Pflanzen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Verwoerd *et al.* (1989):

- Mörsern von 250-300 mg Blattmaterial in 300-400 µl 0,03 M HEPES-Puffer.
- Überführen des Preßsaftes in ein Gemisch aus 300 µl Phenol und 300 µl RNA-Extraktionspuffer (80 °C), für 30“ mischen.
- Zentrifugation von 5 ´ bei 13000 Upm, Abnahme der oberen wäßrigen Phase.
- Zugabe von gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zur Entfernung der Phenolspuren.
- Zentrifugation für 5 ´ bei 13000 Upm, Abnahme der oberen wäßrigen Phase.
- Mischen mit dem gleichen Volumen 4 M LiCl, Fällung ü.N. bei 4 °C.
- Zentrifugation für 20 ´ bei 13000 Upm und 4 °C.
- Vollständiges Entfernen des Überstandes und Trocknung des Pellets im Vakuumkonzentrator für 5-10´.
- Resuspendieren des Pellets in 190 µl RNase freiem A. bidest..
- Zugabe von 5 µl RQ1DNase (1 U/µl) und 5 µl 0,3 M MgCl₂-Lösung.
- Inkubation für 30´ bei 37°C (DNase-Verdau).
- Durchführung eines Proteinase K Verdaus (s.u.).
- Phenol/Chloroform-Extraktion durchführen.
- Präzipitation der Gesamt-RNA mit Natriumacetat/Ethanol-Fällung.
- Resuspendieren der Gesamt-RNA in 50 µl (TE 10/0,1 pH 8.0, RNase-frei).
- Kontrolle von 5 µl im Standard-Agarosegel auf Ausbeute und eventuelle RNase Kontamination; RNA-Menge für RT/PCR abschätzen.

Die Gesamt-RNA kann direkt in die RT/PCR eingesetzt werden, um die virale RNA, die in der Gesamt-RNA enthalten ist, spezifisch zu amplifizieren.

3.2.3.2 Proteinase-K Verdau zur Isolierung von RNA aus Nukleoprotein

- Zugabe zur Nukleinsäurelösung von 1/10 Vol. Proteinase-K (20 mg/ ml) und 2 x Vol. Proteinase K-Puffer, Inkubation für 30´ bei 37 °C.
- Reinigung der Lösung von Proteinase K durch eine Phenol/Chloroform Extraktion mit anschließender Natriumacetat/Ethanol-Fällung.

3.2.3.3 Phenol/Chloroform-Extraktion

Mit der Phenolextraktion wurde DNA bzw. RNA von Proteinen gereinigt. Dazu wurde die Probe mit dem gleichen Volumen TE-Phenol (redestilliert und äquilibriert in TE 10/1, Fa. Roth) gemixt und zur Trennung in untere phenolische Phase, Interphase und obere wäßrige Phase bei 13000 Upm für 4' zentrifugiert. Anschließend wurde die wäßrige Phase zur Entfernung von Phenolspuren mit dem identischen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) gemischt und wie oben zur Phasentrennung zentrifugiert. Abschließend konnte die DNA bzw. RNA aus der oberen wäßrigen Phase mit Natriumacetat/Ethanol gefällt werden. Die Phenolzugabe im ersten Schritt konnte auch durch 1/1 Vol. Phenol/Chloroform ersetzt werden.

3.2.3.4 Gesamtnukleinsäure-Präparation "total nucleic acid" (TNA)

Diese Methode ist eine Modifikation der TNA-Extraktionsmethode nach White & Kaper (1989) und Dr. L. Palkovics (persönliche Mitteilung) mit modifiziertem Extraktionspuffer. Sie wurde zur TNA-Präparation aus Blattmaterial von *N. benthamiana* Pflanzen zur Verwendung in RT/PCR eingesetzt.

- Ausstechen von zwei Blattscheiben im 1,5 ml Eppendorfgefäß durch Deckelschließen.
- Mörsern der Blattscheiben und Zugabe von jeweils 600 µl Extraktionspuffer und TE/Phenol, Zentrifugation für 5-10' bei 13000 Upm.
- Phenol/Chloroform Extraktion gefolgt von Chloroformextraktion durchführen.
- Zugabe von 1 ml EtOH_{abs.} (-20 °C), Zentrifugation für 5-10' bei 13000 Upm.
- Waschen des TNA-Pellets mit 1 ml EtOH_{70%} (-20 °C).
- Resuspendieren des Pellets in 60 µl TE 10/0,1 pH 8,0 (RNase-frei).
- Zentrifugation für 1' bei 13000 Upm.
- Überführen des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß.
- Kontrolle von 5 µl im Standard-Agarosegel auf Ausbeute und eventuelle RNase Kontamination, abschätzen der RNA-Menge für RT/PCR.

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein sensitives Verfahren zum Nachweis oder zur Klonierung von Nukleinsäuren, da sie es ermöglicht *in-vitro* große Mengen einer spezifischen DNA-Sequenz zu erzeugen. Die PCR wurde zur *in-vitro* Mutagenese (siehe 3.2.4.4), Sondenmarkierung für Hybridisierung (siehe 3.2.2.4) und zum Nachweis von Viren und Virusrekombinanten eingesetzt. Sie kann auch zur Sequenzierung verwendet werden. Die Methode wurde erstmals von Mullis & Faloona (1986) durchgeführt. Durch sie können einzelne Nukleinsäuren aus unterschiedlichsten biologischen Materialien oder auch Gesamtnukleinsäurepräparationen nachgewiesen werden, indem sie spezifisch amplifiziert werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die PCR für eine spezifische Amplifizierung ist die Kenntnis der zu detektierenden oder zu amplifizierenden Nukleotidsequenz. Weiter müssen zwei synthetische Oligonukleotidprimer (3'- und 5'-Primer) zur Verfügung stehen, die die Randbereiche der zu amplifizierenden Sequenz flankieren. Der 5'-Primer muß eine Sequenz komplementär ("sense") zum gegensinnigen Strang besitzen, der 3'-Primer zum sinnigen Strang komplementär ("antisense") sein (daher auch "sense"- und "antisense"-Primer genannt). Die *Taq*-Polymerase ist eine DNA abhängige DNA-Polymerase, die die DNA-Synthese in 5'-3' Richtung katalysiert. Das Enzym stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Dieser Organismus ist an heiße Habitate adaptiert, so daß seine Enzyme eine große Hitzestabilität (Thermostabilität: bis zu 100 °C, Temperaturoptimum der Enzymaktivität: 72 °C) aufweisen (Saiki *et al.*, 1988). Die heute verwendeten *Taq*-Polymerasen sind überwiegend rekombinant. Mittlerweile sind hitzestabile Polymerasen aus verschiedenen Organismen isoliert, die teilweise auch RNA abhängige DNA Polymeraseaktivität (Reverse Transkriptase) oder zusätzliche Korrekturlesefähigkeit (5'-3' Exonukleaseaktivität) besitzen. Die freien 3'-Hydroxyl-Gruppen der angelagerten Oligonukleotidprimer dienen der *Taq*-Polymerase als Startpunkt für die Synthese neuer DNA-Stränge. Für die Aktivität der *Taq*-Polymerase sind neben Startstellen für die Synthese (Matrize, Oligonukleotidprimern), Reaktionsbedingungen wie MgCl₂ Konzentration und eine Temperatur von 72 °C, bestimmte Salzkonzentrationen (Reaktionspuffer) und ein Überschuß an Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTP) notwendig. Für die Primer gelten spezifische Hybridisierungstemperaturen, die von Faktoren, wie Molekulargewicht, Konzentration, G:C-Gehalt, Salzkonzentration und

palindromischen Sequenzen abhängig sind und für jedes Primerpaar neu berechnet werden müssen. Die Auswahl der Primer für die unterschiedlichsten Anwendungen, wie Mutagenese, Sequenzierung oder Klonierung fand mit dem Programm Oligo oder Vector NTI (siehe 3.6) statt.

Die Amplifizierungsreaktion, die in Thermocyclern durchgeführt wird, besteht aus drei sich zyklisch wiederholenden Phasen mit unterschiedlichen Temperaturen:

1. Denaturierung: Die DNA-Moleküle werden durch Erhöhung der Temperatur auf 94°C denaturiert.
2. Anlagerung: Die Temperatur wird auf eine für die eingesetzten Primer optimale Anlagerungstemperatur abgesenkt. Während der Temperatursenkung lagern sich die im Überschuß vorhandenen Primer an die zu ihnen komplementäre DNA-Sequenz an.
3. Synthese: Bei einer Temperatur von 72 °C synthetisiert die DNA-Polymerase (5'-3') die beiden komplementären Stränge aus den zugegebenen dNTP.

Bei jedem Zyklus wird die Anzahl der DNA-Moleküle verdoppelt, so daß nach n Zyklen 2^n Moleküle entstanden sind.

3.2.4.1 Primer

Eine Tabelle mit den in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primern befindet sich im Anhang 8.8.12. Die Primer wurden von der Fa. Gibco BRL synthetisiert, als lyophilisierte Proben geliefert und in einer Stammlösung mit einer Konzentration von 100 µM (TE 10/0,1 pH 8,0) angesetzt. Die Arbeitslösungen hatten eine Konzentration von 10 µM.

3.2.4.2 Reverse-Transkription/PCR (RT/PCR)

Um virale sinnpositive ssRNA mit der PCR amplifizieren zu können, mußte zuvor eine komplementäre DNA (cDNA) hergestellt werden. Hier bediente man sich eines Enzyms mit Reverser Transkriptaseaktivität (RNA abhängige DNA-Polymerase). Hier wurde die rekombinante AMV (*Avian myeloblastosis virus*) Reverse Transkriptase (RT) eingesetzt. Sie besitzt ihr Temperaturoptimum bei 42 °C und benötigt wie die

Taq-Polymerase freie 3'-Hydroxyl Gruppen als Startstellen zur Synthese. Der 3'-Primer ist komplementär zum 3'-Ende des Sinnstranges (positiver Strang) der RNA. Nach der Anlagerung des Primers dient dieser zunächst für die Reverse Transkriptase und in der darauffolgenden PCR für die *Taq*-Polymerase als Startstelle. In beiden Fällen wird der negative gegensinnige Strang synthetisiert. Die *Taq*-Polymerase beginnt die Synthese mit der durch die RT hergestellten cDNA. Ein Standard RT-PCR Temperaturprogramm (RNA-RT), welches in dieser Arbeit zur Amplifizierung von CP-Bereichen unterschiedlicher Potyviren benutzt wurde, befindet sich im Anhang 8.8.14. Dort ist ebenso ein Standardreaktionsmix für die RT/PCR angegeben.

3.2.4.3. Immunocapture-RT/PCR (IC-RT/PCR)

Die IC-RT/PCR wurde nach einer Methode von Lanneau & Candresse (1993) durchgeführt. Dieses Verfahren kombiniert eine serologische Methode mit der Reversen Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Diese Methode ist effektiv, um virale Nukleinsäuren nachzuweisen oder zu amplifizieren, da keine aufwendige RNA-Präparation notwendig ist. Die einzige Voraussetzung ist das Vorhandensein eines spezifischen Antiserums, welches Viruspartikel aus Preßsäften infizierter Pflanzen an die Oberfläche von Reaktionsgefäßen bindet. Aus diesem Grund eignete sich die IC-RT/PCR nicht zum Nachweis von Hüllproteinchimären des PPV-NAT (siehe 4.5.3). Die Nukleinsäure wird, über die Reaktionsbedingungen gesteuert, aus den Viruspartikeln freigesetzt und die PCR kann ohne weitere Nukleinsäurepräparationen durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurden Teile des PPV-Genoms nach der IC mit dem Antiserum gegen rekombinantes PPV-CP (AS 570) amplifiziert. Die Reaktion wurde folgendermaßen durchgeführt (siehe 8.8.14):

- Durchführung der Reaktion in 0,2 ml Eppendorfgefäßen.
- Verdünnung des Antiserums 1/1000 mit Coating-Puffer.
- Zugabe von 100 µl Antiserumverdünnung pro Eppendorfgefäß für jede Probe.
- Inkubation für 3-4 h bei 37 °C (Anlagerung der Antikörper an die Gefäßwand).
- Waschen 3 x für 5' mit PBS-T.
- Herstellung des Pflanzenpreßsaftes 1/30 w/v verdünnt in Probenpuffer.
- Zentrifugation für 1' bei 13000 Upm.

- Zugabe von 100 µl Pflanzenpreßsaft in das beschichtete Eppendorfgesäß.
- Inkubation ü.N. bei 4 °C.
- Wiederholung des Waschschrilles 3 x mit PBS-T.
- Zugabe des RT/PCR Reaktionsmixes mit dem jeweiligem Template und Gleichbehandlung von entsprechenden Kontrollen.

3.2.4.4 PCR-Mutagenese

Zum Zweck der PCR-Mutagenese, die an Plasmiden durchgeführt werden sollte, wird als Template 2 µl einer 1/200 Verdünnung einer Plasmidminipräparation mit den entsprechenden Mutageneseprimern eingesetzt. Der generell verwendete Reaktionsansatz und das PCR-Programm befinden sich im Anhang 8.8.15.

3.2.5 Klonierung

In diesem Kapitel sind sämtliche in dieser Arbeit verwendete Methoden aufgelistet, die zur Klonierung benutzt wurden. Plasmide sind extrachromosomale ringförmige DNA-Elemente, die über einen Replikationsursprung (ColEI) verfügen und damit autonom in *E. coli* repliziert werden. Alle Plasmide, die für Klonierungen verwendet werden, besitzen verschiedene Markergene (siehe 8.2), die eine Selektion in *E. coli* ermöglichen. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen und T4-DNA-Ligase können Nukleinsäuresequenzen in Plasmide eingefügt werden und nach Transformation in *E. coli* vermehrt werden.

Wenn nicht anders erläutert, beinhaltet der Begriff "Klonierung" im Ergebnisteil immer:

2. Präparativer Restriktionsverdau mit Elektrophorese von Vektor und Insert.
2. Vorbereitung des Vektors zur Klonierung.
3. Präparation von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.
4. Ligation, Transformation, und Selektion.
5. Plasmidpräparation und Restriktionsverdau, sowie Herstellung von Dauerkulturen.

3.2.5.1 Präzipitation von Nukleinsäuren (Natriumacetat/Ethanol-Fällung)

Die Proben wurden nach Zugabe von 0,1 x Vol. Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5,5) und 2,5 x Vol. EtOH_{abs.} (-20 °C) für 30´ bei -20 °C inkubiert, um die Nukleinsäuren zu präzipitieren (siehe 8.8.16). Anschließend wurde für 15´ bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet mußte durch Zusatz von EtOH_{70%} und nachfolgender Zentrifugation für 10´ bei 13000Upm gewaschen werden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet unter Vakuum getrocknet. Abschließend konnte das Pellet in der entsprechenden Menge TE 10/0,1 pH 8,0 aufgenommen werden. Die Lagerung der Nukleinsäureproben erfolgte bei -20 °C.

3.2.5.2 Restriktionsverdau analytisch und präparativ

Der Verdau von Nukleinsäuren mit Hilfe von sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen wurde in dieser Arbeit zu unterschiedlichen Zwecken durchgeführt. Die Rekombinante Plasmid-DNA aus bakteriellen Plasmidminipräparationen (siehe 3.2.8) wurde mittels Restriktionsverdau nach der Klonierung analysiert. Des weiteren wurden PCR-Fragmente, DNA-Fragmente aus rekombinanten Plasmiden und Plasmide mit Restriktionsendonukleasen zur Klonierung (Ligation) mit anschließender Transformation von *E. coli* vorbereitet.

Kontrollverdau von Plasmidminipräparationen:

- Einsatz von 3-5 µl Plasmid-DNA.
- Zugabe von 1,5 µl 10 x Restriktionspuffer (enzymspezifisch).
- Zugabe von 8 - 10 U Restriktionsenzym.
- Zugabe von A. bidest. ad. 15 µl.
- Inkubation für 60-90´ bei 30 °C oder 37 °C je nach Reaktionsbedingungen.
- Standard-Gelelektrophorese (siehe 8.8.17).

Präparativer Restriktionsverdau zum Zweck der Klonierung:

- Einsatz einer variablen Menge eines Plasmides oder PCR-Fragmentes.
- Zugabe von 4 µl 10 x Restriktionspuffer (passend zum Enzym).
- Zugabe von 8 - 10 U Restriktionsenzym.
- Zugabe von A. bidest. ad. 40 µl.

- Inkubation für 60-90' bei 30 °C oder 37 °C je nach Reaktionsbedingungen.
- präparative Gelelektrophorese (siehe 3.2.5.4) und anschließender Präparation der DNA-Fragmente aus dem Gel.

3.2.5.3 Auffüllen überstehender einzelsträngiger DNA-Bereiche nach Restriktion

Einzelsträngige 5'-überstehende DNA-Bereiche ("sticky-ends"), die als Produkt von Restriktionsenzymen erzeugt wurden, konnten mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase von *E. coli* zu stumpfen nicht überstehenden Enden ("blunt ends") "aufgefüllt" werden. Diesen Vorgang machte man sich bei der Klonierung oder Mutagenese zu nutze. Der Reaktionsansatz wurde hier folgendermaßen durchgeführt:

- Ansatz der Restriktion im Ansatzvolumen von 60 µl.
- Kontrolle von 20 µl des Restriktionsverdau mittels Standard Gelelektrophorese; Restvolumen der Auffüllreaktion 40 µl.
- Zugabe von 2 µl Restriktionspuffer React 2 (Fa. Gibco) oder 2 µl 200 mM MgCl₂ (10 mM).
- Zugabe von 4 µl 2 mM dNTP und 1U Klenow-Fragment.
- Inkubation für 20' bei 37 °C

Sollte ein weiterer Restriktionsverdau durchgeführt werden, mußte zuvor das Klenow-Fragment durch Phenol/Chloroformextraktion entfernt werden. Es folgten eine Auftrennung über LM-Gel, QIAex-Extraktion (siehe 3.2.5.5) und der Einsatz eines Aliquots zur Ligation.

3.2.5.4 Agarose Gelelektrophorese analytisch und präparativ

Die DNA-Moleküle wandern als Polyanionen im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der elektrischen Feldstärke, der Nettoladung des Moleküls und dem Reibungskoeffizienten ab. Letzterer wird durch die Gestalt und Größe des Moleküls sowie durch die Viskosität des Mediums bestimmt. Die Verwendung von Gelen als Matrix erlaubt eine einfache Handhabung und die weitgehende Eliminierung von störenden Einflüssen durch Konvektionsströme. Der sogenannte Molekularsiebeffekt verbessert die Auflösung. Kleine Moleküle wandern schneller durch das

poröse Material, während große Moleküle sich nahezu stationär verhalten. Als Matrix werden polymere Verbindungen wie Agarose und auch Polyacrylamid eingesetzt. Durch die Veränderung der Konzentration kann das System an unterschiedliche Materialgrößen angepaßt werden. Da die Laufstrecke und die Fragmentgröße nicht in einem linearen Zusammenhang stehen, können die Werte für die Molekülgrößen statistisch mit Hilfe der exponentielle Regressionsanalyse ermittelt werden. Dabei kann eine Schätzwertanalyse durchgeführt werden, die den gemessenen Laufstrecken der Fragmente die errechneten Fragmentgrößen zuordnet. Allerdings eignet sich dieses Verfahren nur für streng exponentielle Zusammenhänge. Da diese bei dem Modell der Gelelektrophorese nur in bestimmten Wertebereichen vorliegen, ist eine graphische Auswertung wesentlich genauer. Dies gilt insbesondere für kleine Fragmente. Daher wurde im folgenden auf dieses Verfahren zurückgegriffen.

Zur Herstellung eines 1 %-igen Agarosegels (Fragmentgrößen 500- 15000 Bp) wurde folgendermaßen vorgegangen (siehe 8.8.17):

- Lösen von 0,5 g/1 g Agarose in 50 ml/ 100 ml 1 x TAE-Puffer bei 100 EC.
- Zugabe von 1,5 µl/ 3 µl EtBr (7,5 mg/ ml) nach Abkühlen auf ca. 60 °C.
- Gießen in einen Gelträger und Einführen eines Probenkamms (20 µl Vol./Tasche).
- Einlegen des Gels in die horizontale Elektrophoresekammer (0,5 x TAE-Puffer gefüllt); das Gel muß vollständig mit Puffer bedeckt sein.
- Versetzen der Nukleinsäureproben von 15 µl Volumen mit je 4 µl Gelbeladungspuffer und Einfüllen der Proben in die Geltaschen.
- Auftragen von 4 µl des Längenstandards *ë-PstI*.
- Einlaufen der Proben ins Gel bei 80 V/ 260 mA, Gellauf bei 120 V/ 260 mA.

Die nach Größe aufgetrennten Nukleinsäuren wurden auf einem UV-Transilluminator ($\lambda = 312 \text{ nm}$) sichtbar gemacht und mit einer Videoeinrichtung mit Rotlichtfilter fotografiert. Die doppelsträngige DNA interkalierte reversibel mit Ethidiumbromid (EtBr) und fluoreszierte dann stark im UV-Licht. Eine Tabelle der Fragmentgrößen von *ë-PstI* befindet sich im Anhang 8.8.17.

Präparative Gelelektrophorese

Um doppelsträngige DNA aus Agarosegelen präparieren zu können, mußte eine Matrix mit einem niedrigeren Schmelzpunkt, als der der zu präparierenden DNA eingesetzt

werden, damit beim Schmelzen der Matrix die DNA nicht denaturiert. Für diesen Zweck wurde LM-Agarose ("low-melting"), mit eingeführten Hydroxyethylgruppen in die Polysacharidkette zur Erniedrigung des Schmelzpunktes, eingesetzt. Die Herstellung des horizontalen Gels erfolgte wie oben beschrieben. Weiterhin waren die Einlaufspannung auf 60 V und die Gellaufspannung auf 80 V reduziert, damit sich das Gel nicht zu stark erwärmt und eventuell schmolz.

3.2.5.5 Präparation von Nukleinsäuren aus Agarosegelen (QIAex)

Die über das Agarosegel separierten Nukleinsäurefragmente (PCR-Produkte, DNA-Fragmente, Vektorfragmente) mußten zunächst von Nukleotiden, Primern, Polymerasen und Restriktionsenzymen gereinigt werden, bevor sie für Ligationen und Klonierungen eingesetzt werden konnten. Um die DNA aus dem Agarosegel zu isolieren, wurde mit dem QIAex II Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Die entsprechenden Banden der DNA wurden auf dem UV-Tisch mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt.

Die Präparation fand nach folgendem Protokoll statt (siehe 8.8.18):

- Zugabe zum Gelstück von 400 µl QX1-Puffer und mischen, bis das Gel gelöst ist; Zugabe von 8-10 µl Glasmilch.
- Inkubation im Heizblock bei 56°C für 10' (alle 2' mischen).
- Zentrifugation für 30'' bei 13000 Upm.
- Resuspendieren des Pellets in 500 µl QX1-Puffer.
- Zentrifugation für 30'' bei 13000 Upm.
- Zweimalige Aufnahme in 500 µl PE-Puffer und Zentrifugation für 30''.
- Vollständige Abnahme des Überstandes.
- Trocknung des Pellets im Heizblock oder Vakuumkonzentrator.
- Trennung der DNA von der Glasmilch durch Resuspendieren des Pellets in 25 µl TE 10/0,1 pH 8,0.
- Inkubation für 5' bei Rt und Zentrifugation für 30'' bei 13000 Upm.
- Abnehmen des Überstandes und Überführen in ein neues Eppendorfgefäß.

Die auf diese Art und Weise gereinigte DNA konnte für Ligationen verwendet werden.

3.2.5.6 Säulenreinigung von PCR-Produkten (QIAquick)

Bevor die PCR-Produkte zur Klonierung eingesetzt werden konnten, mußte der PCR-Reaktionsansatz von Nukleotiden, amplifizierten Primern und Polymerasen gereinigt werden. Für diesen Zweck wurde ein Reaktionskit der Fa. Qiagen verwendet (QIAquickspin PCR Purification Kit) (siehe 8.8.19):

- Zugabe von 500 µl PB1-Puffer zum PCR-Reaktionsansatz, gut mischen.
- Einsetzen einer Säule in ein 2 ml Eppendorfgefäß, Befüllen mit der Probe.
- Zentrifugation für 45'' bei 13000 Upm, Verwerfen des Durchflusses.
- Zugabe von 750 µl PE-Waschpuffer auf die Säule.
- Wiederholung der Zentrifugation, Verwerfen des Durchflusses (2 x).
- Einsetzen der Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß, Zugabe von 50 µl Eluierungspuffer.
- Wiederholung der Zentrifugation.
- Durchführung einer Natriumacetat/Ethanol-Präzipitation.
- Resuspendieren des Pellets in 50 µl TE 10/0,1, pH 8,0.

3.2.5.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurde von 500 µl einer 1/50 Verdünnung in TE 10/0,1, pH 8,0 im Spektralphotometer (Perkin Elmer) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm gegen TE 10/0,1 die Absorption gemessen. Die DNA besitzt bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm ein Absorptionsmaximum. Um die Reinheit der DNA-Lösung abschätzen zu können, wurde zusätzlich die Absorption bei $\lambda = 280$ nm (Absorptionsmaximum für Proteine) gemessen. War die DNA frei von Proteinverunreinigungen, hatte der Quotient 260/280 einen Wert zwischen 1,8-2,0. Die DNA-Konzentration wurde aus dem Absorptionswert bei 260 nm nach Sambrook *et al.* (1989) bestimmt. 1 OD bei $\lambda = 260$ nm entspricht 50 µg DNA.

3.2.5.8 Vorbereitung von Vektoren zur Klonierung

Um DNA-Fragmente in einen Vektor klonieren zu können, mußten der Vektor und das Fragment mit entsprechenden Restriktionsenzymen vorbereitet werden. Der linearisierte Vektor und das DNA-Fragment müssen stumpfe Enden oder kohäsive

Enden mit komplementärer Sequenz besitzen, die hybridisieren und von der T4 DNA-Ligase kovalent über Ausbildung von 5'-3'-Phosphodiesterbindungen zusammengefügt werden können.

Aliquots der Plasmidvektoren wurden für gerichtete Klonierungen im präparativen Ansatz mit unterschiedlichen Enzymen verdaut. War es möglich, einen Restriktionspuffer auszuwählen, in dem beide Enzyme hohe Aktivität besaßen, konnte ein Doppelverdau durchgeführt werden. War das nicht der Fall, wurde die DNA zwischen den einzelnen Verdaus mit einer Natriumacetat/Ethanol-Fällung präzipitiert.

CIP-Behandlung von Vektoren (Dephosphorylierung)

Um bei einer ungerichteten Klonierung (Einfachverdau) das Religieren des linearisierten Vektors ohne Insert zu verhindern, wurden überstehende 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase = CIP) entfernt (dephosphoryliert). Die Phosphatase-Behandlung erfolgte in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989). Zu diesem Zweck wurde mit einem präparativen Einfachverdau eines Klonierungsvektors folgendermaßen verfahren (siehe 8.8.20):

- Auffüllen von 40 µl Reaktionsansatz mit A. bidest. auf 45 µl.
- Zugabe von 5 µl 10 x CIP-Puffer.
- Zugabe von 1,5 µl AP, Inkubation für 15' bei 37°C.
- Zugabe von 1,0 µl AP, Inkubation für 30' bei 56°C

Es folgte ein Proteinase-K Verdau bei 56 °C oder alternativ bei 37 °C mit anschließender Phenol/Chloroform Extraktion, gefolgt von einer Natriumacetat/Ethanol-Fällung oder einer präparativen Gelelektrophorese. Die DNA wurde in einem Endvolumen von 25 µl TE 10/0,1 resuspendiert. Die Aliquots konnten direkt für Ligationen eingesetzt werden.

Herstellung eines T-Vektors

Viele thermostabile DNA abhängige DNA-Polymerasen, wie auch die *Taq*-Polymerase, besitzen die Eigenschaft, am Ende der Synthese ein überstehendes 3'-Adenosin anzuhängen. Um diese PCR-Fragmente ungerichtet klonieren zu können, mußte der Vektor demnach ein überstehendes 3'-Thymidin besitzen, damit die T4 DNA-Ligase die kohäsiven Enden miteinander verknüpfen kann. Die Herstellung des T-Vektors erfolgte nach einer leicht modifizierten Methode von Marchuk *et al.* (1990).

Zur Herstellung eines T-Vektors wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Verdau von 6 µg des Vektors pBluescriptII SK⁻ mit 30 U *EcoRV* für 2 h bei 37 °C; durch *EcoRV*-Verdau entstehen sogenannte stumpfe Enden
- Zugabe von 3 U *Taq*-Polymerase (3 µl), 2 µl dTTP (100 mM), 9 µl 10 x PCR-Puffer und 9 µl MgCl₂-Lösung (25 mM).
- Inkubation im PCR-Thermocycler für 2 h bei 70 °C.

Das Thymidin wird von der *Taq*-Polymerase kovalent an die stumpf verdauten 3'-Enden angefügt. Es folgte eine LM-Gelelektrophorese mit anschließender Präparation und QIAex-Reinigung. Der Vektor wurde in einem Endvolumen von 60 µl TE 10/0,1 resuspendiert und in Aliquots von 2 µl bei -20 °C bis zur Verwendung zur Ligation dauerhaft gelagert.

3.2.5.9 Ligation von Klonierungsvektor und DNA-Fragment

Nach erfolgtem Verdau mit gleichen Restriktionsendonukleasen bzw. der Erzeugung von komplementären Enden an Plasmid-DNA und DNA-Fragment, wurden Plasmid-DNA und Vektor-DNA ligiert. Lagen kohäsive Enden vor, konnten die komplementären Sequenzen miteinander hybridisieren. Die durch Basenpaarung gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen sind jedoch nicht stark genug, um eine Transformation in *E. coli* durchzuführen. Durch die T4 DNA-Ligase, die die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Resten an den Enden von DNA-Strängen katalysiert, wurden die jeweiligen DNA-Moleküle kovalent miteinander verknüpft. Zur Herstellung eines Ligationsansatzes mußte in einem Gesamtvolumen von 20 µl 1/10 des Volumens 10x Ligationspuffer vorliegen (siehe 8.8.21). 1 U T4-DNA-Ligase katalysierte über Nacht bei Rt die Ligation der entsprechend zugegebenen Mengen von gereinigtem Fragment und Vektor.

Dieser Ligationsansatz konnte anschließend bei -20°C gelagert oder direkt zur Transformation von Zellen von *E. coli* (siehe 3.2.6) eingesetzt werden.

3.2.6 Transformation von *Escherichia coli* (NM522)

3.2.6.1 Chemische Transformation

Der DNA-Transfer in *E. coli* wurde in Anlehnung an das Verfahren von Hanahan (1983) leicht modifiziert durchgeführt. In dieser Arbeit sind Faktoren beschrieben, die die Aufnahme von Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen erhöhen. Die Effizienz der Transformation (Transformationsrate Cfu/ μ g DNA) kann durch erhöhte Konzentrationen von Mg^{2+} , mit anschließender Behandlung von Zellen und DNA mit Mn^{2+} , Ca^{2+} , Rb^{+} oder K^{+} , Dimethylsulfoxid, Dithiothreitol und Hexamincobaltchlorid, um den Faktor 10^2 - 10^3 , im Vergleich zur Kompetenzinduktion mit $CaCl_2$ (Sambrook *et al.*, 1989), erhöht werden.

3.2.6.2 Herstellung kompetenter Zellen

Die Bakterien lagen als Glycerindauerkultur vor, wurden auf LB-Platten ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Einige Einzelkolonien wurden in 1,0 ml SOB suspendiert und in einen 2000 ml Erlenmeyerkolben mit 30 ml SOB und 300 μ l 2 M Mg^{2+} -Lösung überführt. Es folgte eine Kultur bei 37 °C und 180 Upm bis zu einer $OD_{550nm} = 0,45 - 0,55$ (siehe 8.8.22).

- Überführen der Suspension in ein steriles 25 ml Zentrifugenröhrchen.
- Inkubation für 10' auf Eis, um das Wachstum zu stoppen.
- Zentrifugation (Sigma 4K10, Ausschwing-Rotor) für 12' bei 1130 Upm und 4 °C.
- Resuspendieren des Bakterienpellets in 10 ml TFB (für 10' auf Eis).
- Zentrifugation (gleicher Rotor) für 12' bei 1130 Upm und 4 °C.
- Resuspendieren des Bakterienpellets in 4 ml TFB (für 10' auf Eis).
- Zugabe von 2x 140 μ l DND und jeweils für 15' auf Eis inkubieren.

Damit war die Kompetenzinduktion abgeschlossen. Die Zellen konnten direkt zur Transformation mit der Plasmid-DNA (Ligationsansätzen) eingesetzt werden. Die Prozedur lieferte kompetente Zellen für ca. 20-30 Transformationsansätze.

3.2.6.3 Transformation

Die Ligationsansätze wurden auf Eis gestellt und jeweils 200 µl der kompetenten Zellen zugegeben. Das Transformationsprotokoll lautete folgendermaßen (siehe 8.8.23):

- Mischen der Ansätze und Inkubation für 30´ auf Eis.
- Hitzeinduktion für exakt 90´´ bei 42 °C.
- Sofortige Abkühlung der Eppendorfgefäße für 2´ auf Eis.
- Zugabe zu jeder Probe von 800 µl SOC.
- Inkubation der Eppendorfgefäße für 45´-1 h bei 37 °C und 180 Upm (nicht länger).
- Ausplattieren von 100-150 µl Aliquots auf den entsprechenden Selektivmedien.
- Trocknen der Platten und Inkubation ü.N. bei 37 °C.

Zur Bestimmung der Transformationsrate/effizienz wurde eine Paralleltransformation mit 10 ng eines covalent zirkulär geschlossenen "supercoiled" Plasmids mit einer Ap-Resistenz durchgeführt. Es lieferte eine bekannte Transformationsrate. Bei der Ausplattierung auf LB-Ap-Medium wurden Verdünnungsstufen von 10^{-1} - 10^{-4} angelegt und die Transformationsrate errechnet. Die Transformationsrate, beziehungsweise die Transformationseffizienz, wurde als Cfu/ pg oder µg Plasmid-DNA angegeben.

3.2.6.4 Quick-Transformation

Zur schnellen Transformation von kovalent zirkulär geschlossenen ("supercoiled") Plasmiden konnte die Transformationsmethode bzw. das Protokoll der Kompetenzinduktion, aufgrund der weitaus höheren Transformationsrate, stark verkürzt werden. Es wurden die gleichen Lösungen wie für die o.a. Methode verwendet. Etwa 10-12 h vor der Transformation mußte ebenfalls ein *E. coli* Stamm auf einer LB-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert werden. Das Protokoll lautete wie folgt:

- Resuspendieren von 2-4 Einzelkolonien/Ligationsansatz in 200 µl TFB.
- Inkubation für 15´ auf Eis und anschließende Zugabe von 7 µl DND; Vorgang wiederholen.
- Zugabe von 1 µl einer Plasmidminipräparation in 20 µl A. bidest..

Ab dieser Stelle wird das Standard-Transformationsprotokoll durchgeführt. Es wurden jedoch mindestens 200 µl Bakteriensuspension auf dem entsprechenden Selektivmedium ausplattiert.

3.2.7 Selektion transformierter Zellen

Die Selektion transformierter *E. coli* Zellen wird aufgrund verschiedener, auf dem Plasmid vorhandenen Selektionsmarkern, ermöglicht, wie auf den Plasmidkarten (siehe 8.2) jeweils vermerkt ist. Jedes Plasmid ist mit einem Replikationsursprung für *E. coli* ausgestattet (z.B. ColE1) und trägt ein Antibiotikaresistenzgen (Ap-, Cam-, Tc- oder Kn-Resistenz). Die Selektion transformierter Zellen wird durch die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zum Medium (siehe 3.2.7 und 8.3.) ermöglicht. Um ausschließlich Zellen zu selektieren, die Plasmide mit einem Insert in der MCS enthalten, bedient man sich in einigen Klonierungsvektoren des *lacZ*-Gens. Das *lacZ*-Gen in pBluescriptII SKM kodiert für die regulatorischen Sequenzen und die N-terminalen 146 Aminosäuren des Enzyms der β -Galaktosidase. Das *lacZ*-Gen ist durch die MCS unterbrochen. Dies verhindert jedoch nicht, daß der von der Wirtszelle exprimierte C-terminale Teil der β -Galaktosidase, zusammen mit dem vom Plasmid kodierten Teil, das aktive Enzym bildet (β -Komplementation) (Ullmann, 1967). Dieses Enzym kann das zum Medium zugesetzte Substrat X-gal bei Vorliegen des Induktors (IPTG) in einen blauen Farbstoff umwandeln. Die mit diesem Plasmid transformierten Zellen sind blau gefärbt. Trägt die MCS im Plasmid jedoch ein Insert, wird damit die β -Komplementation und die Substratumsetzung verhindert. Die transformierten Zellen bleiben ungefärbt.

3.2.8 Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA (Klare Lysate)

Um rekombinante Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien zu extrahieren, wurde die Methode von Birnboim & Doly (1979) leicht modifiziert angewendet.

Das Prinzip der alkalischen Minipräparation von Plasmid-DNA beruht auf der Tatsache, daß in einem relativ engen pH-Bereich (pH 12,0 - 12,5) chromosomale Bakterien-DNA denaturiert, kovalent zirkuläre "supercoiled" Plasmid-DNA jedoch nicht. Diese Eigenschaft kann für die Extraktion von Plasmid-DNA genutzt werden. Zellen, die Plasmide beinhalten, werden mit NaOH und SDS lysiert. Bei einem pH-Wert von

etwa 12,0 wird die chromosomale DNA selektiv denaturiert und nach Absenken des pH-Wertes durch Zugabe von Natriumacetat renaturiert und aggregiert. Sie kann über Zentrifugation entfernt werden. Die zurückbleibende Plasmid-DNA wird dann über Ethanolpräzipitation gefällt. Die verwendeten Lösungen für die Klaren Lysate finden sich in ihrer genauen chemischen Zusammensetzung im Anhang 8.8.24 .

Eine Einzelkolonie der ausplattierten transformierten Zellen, welche ein bestimmtes rekombinantes Plasmid trug, wurde in 4 ml des entsprechenden LB-Selektivmediums resuspendiert und für 6-8 h oder ü.N. bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Folgendes Protokoll wurde durchgeführt (siehe 8.8.24):

- Abfüllen von 2 ml der Zellsuspension in ein 2 ml Eppendorfgefäß.
- Zentrifugation für 3' bei 13000 Upm und Pelletierung der Zellen.
- Zugabe von 200 µl Lösung A, vorsichtiges Resuspendieren des Bakterienpellets.
- Inkubation für 15' bei Rt, Zugabe von 400 µl Lösung B und vorsichtig mischen.
- Zugabe von 300 µl Lösung C und mehrfach invertieren.
- Inkubation für 15-30' auf Eis.
- Zentrifugation für 10' bei 13000 Upm, Überstand in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen, Wiederholen des Vorgangs.
- Zugabe von 600 µl Isopropanol (-20 EC), kurz vortexen oder invertieren.
- Zentrifugation für 10' bei 13000 Upm, Überstand abgießen und abtropfen lassen.
- Zugabe von 200 µl Lösung D zum Pellet, Inkubation für 5' bei Rt.
- Vorsichtiges Resuspendieren und Zugabe von 400 µl EtOH_{abs.} (-20 °C) und mischen.
- Zentrifugation für 10', möglichst vollständiges Entfernen des Überstands.
- Trocknung des DNA-Pellets für 5' im Vakuumkonzentrator (Speedvac).
- Zugabe von 80-100 µl RNase/TE zum getrockneten Pellet und resuspendieren.
- Lagerung bei -20 °C.

3.2.9 Plasmidpräparation und Reinigung

Für die unterschiedlichen Anwendungen in dieser Arbeit war es notwendig, größere Mengen Plasmid-DNA hoher Reinheit herzustellen. Solche Anwendungen waren die Infektion von Pflanzen mit infektiösen viralen "full-length" Klonen, saubere Plasmidpräparationen für Klonierungen von großen Fragmenten und die Auftragssequenzierung. In dieser Arbeit wurde ein Plasmidpräparationskit der Fa. Qiagen (Midi-Plasmid-Extraktions-Kit) verwendet. Bei dieser Methode wird, wie von Birnboim & Doly beschrieben, eine modifizierte alkalische SDS-Lyse durchgeführt. Die Plasmid-DNA wird über eine Säule mit unbekannter Matrix gereinigt. Der zu vermehrende rekombinante *E. coli* wurde ü.N. auf dem entsprechenden Selektivmedium angezogen. Anschließend wurden 15 ml LB-Medium bei Standardplasmiden bzw. 150 ml bei infektiösen "full-length" Klonen mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion mit einer Einzelkolonie angeimpft. Es folgte eine ü.N.-Inkubation bei 37 °C bzw. 30 °C und 180 Upm.

Das Protokoll wurde wie folgt durchgeführt (siehe 8.8.25):

- Zentrifugation zur Zellernte in SLA1500 (RC5B) für 15' bei 6000 Upm und 4 °C ohne Bremse.
- Resuspendieren des Bakterienpellets in 4 ml P1-Puffer.
- Zugabe von 4 ml P2-Puffer und Inkubation für 5' bei Rt.
- Zugabe von 4 ml P3-Puffer, kurz mischen und Inkubation für 15' auf Eis.
- Zentrifugation in SLA1500 (RC5B) bei 13000 Upm für 30' bei 4 °C ohne Bremse.
- Äquilibrieren der Midi-Säule mit 5 ml QBT-Puffer (Säule entleert sich selbstständig).
- Einfüllen des Überstandes der Zentrifugation über feuchten Faltenfilter in die Säule.
- Waschen der Säule 2 x mit 10 ml QC-Puffer.
- Eluieren der DNA mit 5 ml QF-Puffer in Corex-Röhrchen.
- Präzipitation der DNA mit 0,7 x Volumen Isopropanol (Rt).
- Zentrifugation in SS34 für 30' bei 13000 Upm und 4 °C.
- Waschen des Pellets mit 2 ml EtOH_{70%}.
- Zentrifugation in SS34 für 10' bei 13000 Upm und 4 °C.
- Trocknen des DNA-Pellets unter Vakuum oder bei 37 °C.

- Resuspendieren des DNA-Pellets in passendem Volumen TE 10/0,1/pH 8,0 zu Bestimmung der DNA-Reinheit und Konzentration.
- Einstellen einer entsprechenden Konzentration mittels Verdünnung.
- Durchführen eines Kontrollverbaus mit entsprechenden Restriktionsenzymen.

Wurde Plasmid-DNA zur Auftragssequenzierung benötigt, betrug das Kulturvolumen 30 ml LB. Das Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer resuspendiert, 40 µl (ca. 10 µg) wurden mit Natriumacetat/Ethanol präzipitiert und als getrocknetes Pellet versandt.

3.2.10 Herstellung von Bakteriendauerkulturen

Bakterienkulturen, die rekombinante Plasmide tragen, sollen beliebig vermehrbar und daher unbegrenzt lagerbar sein. Durch Zugabe von Glycerin zu einer Bakteriensuspension wird beim Tieffrieren zur Langzeitlagerung die zellschädigende Eiskristallbildung verhindert. Die Zellen können nach dem Wiederauftauen erneut kultiviert werden und sind so beliebig vermehrbar. 500 µl einer möglichst hoch konzentrierten Bakteriensuspension wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 675 µl Glycerin_{87%} (autoklaviert). Nach sorgfältigem Mischen wurden die Bakterienkulturen sofort bei -20 °C besser -70 °C eingefroren. Ein häufiges Wiederauftauen beschleunigte jedoch den Zerfallsprozess stark.

3.2.11 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der als „Didesoxynucleotidmethode“ oder Kettenabbruchverfahren bezeichneten Methode von Sanger *et al.* (1977) durchgeführt.

3.2.11.1 Herstellung von einzelsträngiger DNA (ssDNA)

Die zu analysierende DNA, mit der zu bestimmenden Sequenz, mußte zur ssDNA Sequenzierung als DNA-Einzelstrang präpariert werden. Die einzelsträngige DNA wurde nach Vieira & Messing (1982) präpariert. Dazu wurde das DNA-Fragment, welches sequenziert werden sollte, in ein Phagemid mit speziellen Eigenschaften kloniert. Der Phagemid mußte den Startpunkt für die Replikation (“f1-origin”) aus dem f1-Phagen besitzen. Infiziert man rekombinante *E. coli* Zellen mit einem speziellen

Helferphagen M13K07, so wird bei dessen Replikation der "f1-origin" auf dem Phagemid erkannt und die ssDNA des Phagemids, welches das zu sequenzierende DNA-Fragment beinhaltet, in Phagenhüllen eingebaut. Das Phagemid wird in Phagenhüllen verpackt und ausgeschleust, ohne daß die Bakterienzellen lysiert werden. Der Helferphage wurde zur Selektion in *E. coli* mit dem Gen für Kanamycinresistenz gentechnisch modifiziert. Nachfolgend sind Protokoll für Anzucht, Infektion und Vermehrung von M13K07 sowie die Präparation von ssDNA aus Phagenpartikeln, dargestellt (siehe 8.8.26):

- Animpfen von Selektiv-LB mit 15-20 µl Dauerkultur des Klonen und 20 µl M13K07; Inkubation für 2 h bei 35 EC und 180 Upm.
- Zugabe von 50 µl Kanamycin (7 mg/ml Endkonzentration 140 µg/ml).
- Inkubation ü.N. bei 35 °C und 180 Upm.
- Sedimentation der Bakterien für 10' bei 13000 Upm, Abnehmen des Überstandes, Vorgang wiederholen.
- Zugabe von 1,2 ml PEG/NaCl, mischen, Inkubation für 15' bei Rt.
- Zentrifugation für 10' bei 13000 Upm, Überstand quantitativ entfernen.
- Resuspendieren des Pellets in 100 µl TES.
- Phenol/Chloroform Extraktion mit Natriumacetat/Ethanol-Präzipitation.
- Trocknung der ssDNA im Vakuumkonzentrator.
- Resuspendieren des Pellets in 15 µl TE 10/1/pH 8,0.
- Standard Gelelektrophorese zur Abschätzung der Menge zur Sequenzierung.

3.2.11.2 Sequenzierung von ssDNA nach dem Kettenabbruchverfahren

Bei der Sequenzierung von ssDNA mit der T7-Polymerase (T7-Bakteriophage), die von Sanger (1977) entwickelt wurde, werden im Abstand von ca. 30-40 Bp zum sequenzierenden Bereich auf dem ssDNA-Strang wie bei der PCR Primer angelagert, die aufgrund der freien 3'-Hydroxyl Gruppen die Synthese des komplementären Stranges (5'-3') durch die T7-Polymerase ermöglichen. Bei dieser Synthese werden durch kontrollierten Einbau von Didesoxyribonukleotiden (ddNTP), die einen Kettenabbruch der Synthese bewirken, Fragmente aller möglichen Größen erzeugt. Eine Sequenzierung wird durch den Einbau radioaktiver Nukleotide (α-32P-dATP) mit anschließender Kettenabbruchreaktion möglich. Die Reaktion findet verteilt in vier

Gefäßen statt, in denen jeweils nur ein Nukleotid durch einen Anteil ddNTP ausgetauscht ist. Die synthetisierten DNA-Moleküle trennt man durch eine denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Um ein hohes Auflösungsvermögen zu erreichen, wird mit diskontinuierlichen Gradientengelen gearbeitet. Aufgrund der radioaktiven Markierung lassen sich die Banden autoradiographisch sichtbar machen. Jede der vier Spuren entspricht einem Didesoxyribonukleotid. Die zu bestimmende Sequenz kann so durch die Reihenfolge der Banden auf einem Röntgenfilm von unten nach oben abgelesen werden.

Die Sequenzierung fand in vier aufeinanderfolgenden Schritten statt, die hier kurz dargestellt sind (siehe 8.8.27). Als Sequenzierungsprimer wurden universelle Primer verwendet, die 5´-"sense" oder 3´-"antisense" zur MCS komplementär sind. Bei der Sequenzierung von größeren Inserts mußten sequenzspezifische Oligonukleotide von 20 Bp Länge synthetisiert werden.

1. Anlagerung "annealing" des Primers an die "template" ssDNA:

- Zugabe von 3 µl Sequenzprimer (1 µM), 2 µl Annealing-Puffer und 2 µl Template in 14 µl Volumen in ein Eppendorfgefäß.
- Inkubation für 10´ bei 60 °C und Abkühlung für ca. 30 bei Rt´.

2. Kettenverlängerung mit (α-32P-dATP) ("labelling"):

- Zugabe von 3 µl A. bidest., 3 µl Labelling Mix dNTP (6,6 mM), 0,5 µl dCTP³² und 0,5 µl T7 DNA-Polymerase (2 U / Template) in 7 µl Volumen.
- Inkubation für 5´ bei Rt.
-

3. Kettenabbruchreaktion ("chain-termination"):

- Zugabe von 4,5 µl der gelabelten Proben (Vol. 20 µl) zu jedem Terminationsansatz (2,5 µl der vier "chain-termination bases", 37 °C).
- Inkubation der Proben für 5´ bei 37 °C.
- Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 5 µl Stopplösung ("gel loading buffer").

4. Gelelektrophorese und Autoradiographie:

Die Herstellung der PAA-Sequenzierungsgele (5 %) erfolgte nach folgendem Protokoll (siehe 8.8.27):

Zugabe in 100 ml Glaszylinder von 33,6 g Harnstoff, 9,7 ml 40 %-ige Acrylamid-Lsg., 8 ml 10x TBE-Puffer, A. bidest. ad. 80 ml. Die Polymerisation erfolgte nach Zugabe von 640 µl 10 % APS und 64 µl TEMED.

Der Ablauf der Sequenz-Gelelektrophorese war wie folgt:

Die Sequenz-Gelelektrophorese fand in Gradientengelen mit einer Geldicke von 0,2 mm bis 0,7 mm (von oben nach unten) in 0,6 x TBE unter denaturierenden Bedingungen (55 °C) in einer Apparatur der Fa. Pharmacia (MacroPhor System 2010) statt. Die Proben wurden für 5´ bei 95 °C vor dem Auftrag von ca. 1,5 µl auf das Gel aufgekocht und sofort auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese startete zum Einlaufen der Proben mit 800 V für 10´ und lief bei 1600-2000 V, bis die Bromphenolblaufront ("gel-loading buffer") aus dem Gel unten austrat. Sie war ein Marker für die Oligonukleotide mit ca. 20-30 Bp Größe. Die Xylen-Cyanolfront lief ungefähr so schnell wie Nukleotide mit 120 Bp.

Die Gelfixierung wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Einlegen der Gelglasplatte für 1 h in Essigsäure_{10 %}, leicht schwenken.
- Spülen des Gels mit Wasser und Trocknung für 2 h bei 80 °C.
- Belichtung eines Röntgenfilms für 4-12 h.
- Einlesen von 300-450 Bp der Sequenz zur Verarbeitung im PC.

3.2.11.3 Kommerzielle Auftragssequenzierung

Die Fa. MWG Biotech lieferte von jedem Template eine Sequenz von 800 Bp bis zu 950 Bp. Universelle Primer mußten benannt werden und individuelle Primer mitgeschickt werden.

3.2.12 Infektion von Pflanzen mit viralen Klonen

Virale infektiöse "full-length" Klone wurden zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen auf die systemische Infektiosität in Pflanzen und der Funktionen einzelner Virusproteine hergestellt. Sowohl infektiöse Plasmide von denen *in-vivo* Transkripte hergestellt werden, wie auch *in-vitro* Transkripte selbst, können wie Viren in Pflanzenpreßsäften mechanisch inokuliert werden und somit in Pflanzenzellen eingebracht werden (siehe 3.1.2). Diese Inokulationsmethode ist jedoch nicht sehr effektiv. Um eine Pflanze verlässlich infizieren zu können, mußten im Falle des

Plasmids bis zu 10 µg Plasmid-DNA auf die Wirtspflanze abgerieben werden (Prof. Dr. E. Maiß, persönliche Mitteilung). Dies bedeutete, daß große Plasmidmengen einzelner Mutanten produziert werden mußten. Zudem war die mechanische Inokulation nicht immer zuverlässig. Hagen *et al.* (1994) vereinfachten das Infektionsverfahren für virale “full-length” Klone durch Einsatz einer Partikelkanone. Mit dieser Methode wird cDNA oder RNA über Fällung an Wolframpartikel gebunden und direkt in einzelne Pflanzenzellen der zu infizierenden Pflanze geschossen, um dort transient exprimiert zu werden (Sanford, 1988 und Godon *et al.*, 1993). Gal-On *et al.* (1995) konnten die zur Infektion notwendige Nukleinsäuremenge von einem infektiösen “full-length” Klon des ZYMV in Zucchini Pflanzen (*Cucurbita pepo*) um den Faktor 10^6 bei 100 %-iger Infektionsrate reduzieren.

3.2.12.1 Konstruktion einer Partikelkanone

Die kommerziell zu erwerbenden Partikelkanonen eignen sich ausschließlich für den Beschuß von Blattscheiben oder Gewebeteilen, die von der lebenden Pflanze abgetrennt sind. Ganze Pflanzen lassen sich aufgrund des zu kleinen Probenraumes nicht bearbeiten (s.u.). Zu dem oben angegebenen Zweck der Untersuchung von Mutationen auf die systemische Infektiosität von “full-length” Klonen wurde nach der Methode von Gray *et al.* (1994) eine Partikelkanone zum Beschuß von ganzen Pflanzen konstruiert (“particle inflow gun”, PIG). Zur Herstellung wurden ausschließlich einfache Bauteile wie Magnetventil, Vakuumkammer und einfache Schraubverbindungen sowie Spritzenfilter benötigt. Eine Konstruktionszeichnung ist in Abb. 3 angegeben. Eine Auflistung der verwendeten Bauteile befindet sich im Anhang 8.8.28.

Die praktische Durchführung des Partikelbombardment funktionierte wie folgt. Die gefällte Nukleinsäure lag an Wolfram gebunden als Suspension vor und wurde auf den Spritzenfilter aufgebracht (s.u.). Die zu infizierende Pflanze befand sich in der Vakuumkammer etwa 5-10 cm vom Entladepunkt entfernt, in der ein Vakuum von ca. 800 mbar mittels Vakuumpumpe angelegt wurde. Wurden einzelne Blätter, die nicht von der Pflanze abgetrennt waren, beschossen, wurde das jeweilige Blatt mit einem Schaumstoffblock unterstützt und vertikal in 5-10 cm Entfernung direkt unter dem Austrittspunkt positioniert. Der Spritzenfilter war durch ein Magnetventil vom Helium oder Luft mit einem Druck von 3-4 bar getrennt. Zum “Abfeuern” der Partikel wurde

das Magnetventil elektrisch für 0,1'' geöffnet. Die Partikel schossen kegelförmig aus dem Spritzenfilter auf die Pflanze. Das angelegte Vakuum verhinderte ein zu schnelles Abbremsen der Partikel. Der Gasdruck mußte, in Abhängigkeit vom Pflanzenmaterial, geringfügig variiert werden, da sehr junge *N. benthamiana* Pflanzen bei einem Gasdruck von 4 bar schon stark zerstört wurden.

In der Arbeit von Gray *et al.* (1994) war die Partikelkanone jedoch zum Bombardment von Gurkenkeimlingsblättern verwendet worden. Erste Testversuche, ganze *N. benthamiana* Pflanzen unter 1000 mbar Vakuum nur mit Luft von 8 bar zu beschießen, führten jedoch zu einer vollständigen Zerstörung der gesamten Pflanze. Bedingt durch den hohen Luftdruck wurde das gesamte Substrat mit der Pflanze aus dem Topf geblasen. Abhilfe konnte durch das Auflegen von Papiermanschetten um den Stengel der Pflanze geschaffen werden. Die Pflanzen wurden jedoch durch den hohen Luftdruck weiterhin stark beschädigt.

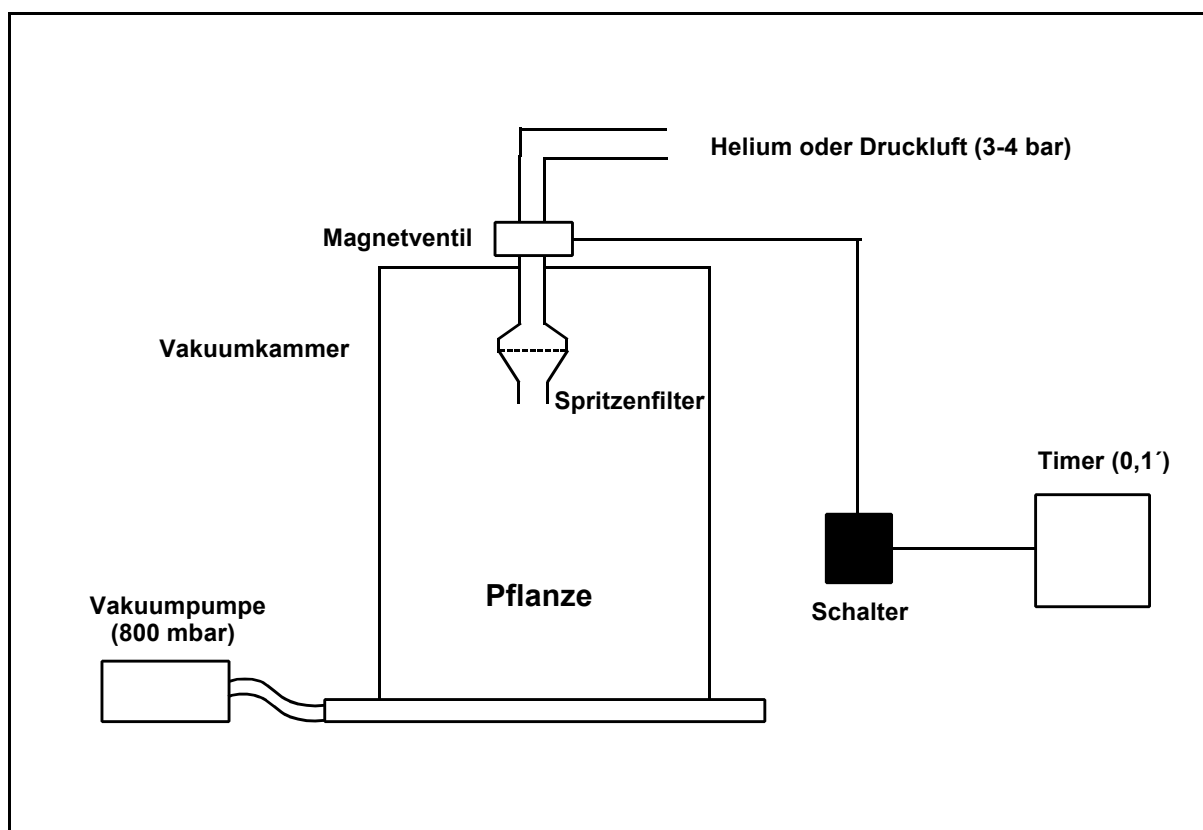


Abb. 3: Konstruktionszeichnung Partikelkanone (PIG)

Optimierung des Partikelbombardments

Zur Untersuchung der Effizienz des Partikelbombardments wurde ein Pflanzenexpressionsplasmid des *gus*-Gens unter Kontrolle des 35S-Promotors mit PPV 5'-Ende und 3'-NTR eingesetzt. Dieses Plasmid war ursprünglich als Replikationskassette konstruiert, wurde hier jedoch als Testplasmid zur transienten *gus*-Expression nach Partikelbombardment verwendet.

Fünf Tage alte Gurkenkeimlinge wurden unter normalen Gewächshausbedingungen angezogen und für ein Partikelbombardment zur Kontrolle der transienten *gus*-Expression, wie von Gray *et al.* (1994) beschrieben, unter modifizierten Luftdruckbedingungen verwendet. Auch Blätter von *N. benthamiana* Pflanzen wurden zum Bombardment mit pSLGUSNT verwendet (siehe 8.2). 48 h nach dem Partikelbombardment wurde wie unter 3.2.1.9 beschrieben ein *gus*-Test mit den Gurkenkeimblättern durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Ergebnisse der Versuche des Partikelbombardments zur Bestimmung der transienten *gus*-Expression

Testpflanze für pSLGUSNT	Gasdruck	Anzahl <i>gus</i> -Spots
1 x <i>C. sativus</i> (Negativkontrolle)	4 bar	0
1 x <i>C. sativus</i>	6 bar	60
3 x <i>C. sativus</i>	5 bar	58, 47, 3
5 x <i>C. sativus</i>	4 bar	12, 23, 27, 31, 51
1 x <i>C. sativus</i>	3 bar	17
2 x <i>N. benthamiana</i>	6 bar	0, 0 (vollständig zerstört)
2 x <i>N. benthamiana</i>	4 bar	16, 20 (Zerstörung sichtbar)
3 x <i>N. benthamiana</i>	3 bar	3, 12, 13
5 x <i>N. benthamiana</i>	2 bar	0, 0, 0, 3, 5,

Tab. 3: Ergebnisse der Versuche des Partikelbombardments zur Bestimmung der Infektiosität von p35PPV-NAT

Testpflanze für p35PPV-NAT	Luftdruck	Anzahl Pflanzen mit PPV infiziert
4 x <i>N. benthamiana</i>	6 bar	4 (Zerstörung stark)
10 x <i>N. benthamiana</i>	3 bar	10 (Zerstörung gering)

Zusätzlich wurde erstmals p35PPV-NAT, wie unter 3.2.12.2. beschrieben, zum Bombardment von vier *N. benthamiana* Pflanzen mit 6 bar Luftdruck eingesetzt, um die Infektiosität zu überprüfen. Die Tabakpflanzen wurden jedoch auch bei 6 bar Gasdruck stark beschädigt. Ein Auftreten von PPV-Symptomen wurde visuell bonitiert. Nach etwa fünf bis sechs Tagen konnten bei allen infizierten Pflanzen PPV-Symptome beobachtet werden. Der Versuch wurde mit 10 Pflanzen und 3 bar Luftdruck wiederholt, um die Blätterstörungen zu minimieren. Auch in diesem Versuch konnten alle beschossenen Pflanzen infiziert werden (Tab. 3). Bei den Versuchen des Partikelbombardments wurde grundsätzlich der Klon des p35PPV-NAT als Positivkontrolle auf 5-10 *N. benthamiana* Pflanzen bombardiert. Die Infektionsrate der inokulierten Pflanzen lag immer zwischen 80-100%.

3.2.12.2 Präparation von Nukleinsäuren zum Partikelbombardment

Die Fällung der DNA an Wolframpartikel wurde nach einem modifizierten Protokoll von *Finer et al.* (1992) oder *Perl* (1992) vorgenommen. Die Wolframpartikel (M17, Fa. Biorad) wurden wie folgt für das Bombardment vorbereitet (siehe 8.8.29):

- Zugabe von 1 ml EtOH_{abs.} zu 100 mg Wolfram im 1,5 ml Eppendorfgefäß.
- Inkubation für 20' bei Rt, gut vortexen.
- Zentrifugation für 10' bei 13000 Upm, Überstand vollständig abnehmen.
- 5 x waschen mit 1 ml A. bidest., Zentrifugation jeweils wiederholen.
- Aufnahme in 1 ml A. bidest. und Lagerung bei 4 °C.
- Suspension vor der Entnahme gut vortexen.

Der Ansatz der DNA war jeweils für die Infektion von 10 Pflanzen ausgelegt.

Vorbereitung von Plasmid-DNA

- Zugabe von 5-10 µg Plasmid-DNA im entsprechenden Volumen A. bidest. oder TE 10/0,1 zu 50 µl.
- Zugabe von 50 µl CaCl₂ (2,5 M), vortexen.
- Sofortige Zugabe von 20 µl Spermidine (freie Base), (0,1 M), vortexen.
- Inkubation für 5' auf Eis und Verwerfen des Überstandes bis auf 30 µl Rest.

Partikelbombardment

- Pipettieren von 3 µl (0,5-1 µg DNA oder Transkript) Probe auf Spritzenfilter (vorausklaviert).
- Beschießen der Pflanze mit 800 mbar Unterdruck für 0,1'' mit 3-4 bar (je nach Größe).
- Kultivieren der Pflanze unter Gewächshausbedingungen.

3.2.13 Infektion von Blättern mittels Partikelbombardment

Um einzelne abgetrennte Blätter von *N. benthamiana* Pflanzen für Expressions- und Rekombinationsuntersuchungen mit viralen "full-length" Klonen zu infizieren, wurde die Partikelkanone PDS1000 der Fa. Biorad verwendet. Aufgrund standardisierter Bedingungen des Bombardments ermöglicht diese Partikelkanone das Bombardment einzelner abgetrennter Blätter mit Nukleinsäuren mit hoher Effizienz.

3.2.13.1 Funktionsweise der PDS1000

Die PDS1000 ermöglicht es, an Wolfram- oder Goldpartikel gebundene Nukleinsäuren mittels eines hohen Gasdruckes (Helium) so zu beschleunigen, daß sie in Pflanzenzellen geschossen werden können. Auch diese Methode eignet sich zur stabilen Transformation und zu Expressionsstudien mittels transienter Expression von auf Plasmiden kodierten Genen. Der Hauptbestandteil der PDS1000 ist eine quaderförmige Vakuumkammer. Standardisierte Reaktionsbedingungen für das Partikelbombardment werden über verschiedene Einstellungen erreicht. Der Druck des eintretenden Gases wird über spezielle Berstscheiben reguliert, die bei spezifischem Gasdruck bersten. Das in die Kammer eindringende Gas beschleunigt einen sogenannten "Macrocarrier", auf dem sich die mit Nukleinsäuren beladenen Partikel befinden. Dieser "Macrocarrier" schlägt auf ein Metallnetz und beschleunigt somit die beladenen Partikel, die nach einer festgelegten Flugstrecke auf das Blattmaterial treffen.

3.2.13.2 Durchführung des Partikelbombardments

Vorbereitung der Partikel

Die Wolframpartikel wurden auf folgende Art und Weise zum Partikelbombardment vorbereitet.

- Zugabe von 1 ml EtOH_{70%} zu 30 mg Wolfram (M17, Biorad), vortexen und Inkubation für 15´ bei Rt.
- Zentrifugation für 30´´ bei 2000 Upm, Überstand verwerfen.
- Zugabe von 500 µl A. bidest., vortexen und Inkubation für 15´ bei Rt.
- Zentrifugationsschritt wiederholen, verwerfen des Überstandes.
- Aufnahme der Partikel in 500 µl Glycerin_{50%} und Lagerung bei -20 °C.

Vorbereitung der DNA

Die Vorschrift bezieht sich auf die Vorbereitung von DNA für 10 “Schüsse”. Alle verwendeten Lösungen besaßen eine Temperatur von 4 °C.

- Zugabe von 90 µl der Partikelsuspension in ein Eppendorfgefäß.
- Zugabe von 10 µl Plasmid-DNA in TE 10/0,1 (1 µg/µl) unter vortexen.
- Inkubation für 15´ auf Eis.
- Zugabe von 90 µl 2,5 M CaCl₂ unter vortexen.
- Sofortige Zugabe von 36 µl Spermidin (0,1 M) unter vortexen.
- Sofortige Zugabe von 182 µl EtOH_{abs.} unter vortexen.
- Inkubation für 10´ auf Eis.
- Zentrifugation für 30´´ bei 2000 Upm, Überstand verwerfen.
- Aufnahme der beladenen Partikel in 64 µl EtOH_{abs.}
- Resuspendieren der beladenen Partikel im Ultraschallbad.
- Sofortiges Auftragen von 5-6 µl der Partikelsuspension auf jeden “Macrocarrier” (Fa. Biorad).
- Durchführen des Partikelbombardments wenn der EtOH verdunstet ist.

Durchführung Partikelbombardment

Für das Partikelbombardment wurden Blätter von im Gewächshaus angezogenen *N. benthamiana* Pflanzen mit einem Durchmesser von 3 bis 4 cm verwendet. Die abgetrennten Blätter wurden in Petrischalen als Unterlage beschossen. Das Bombardment erfolgte nach Anleitung für die Partikelkanone (PDS1000).

Die Parameter waren:

- Vakuum: 25 Inch Hg (Manometer der PDS1000)
- Berstscheiben (Fa. Biorad) für einen Heliumdruck von 1100 oder 1350 Psi
- Position "Macrocarrier": 1. Einschub von oben der Vakuumkammer
- Position Petrischale: 3. Einschub von oben

Nach erfolgtem Bombardment wurden die Blätter für 72 h in einer mit Parafilm abgedichteten Petrischale auf feuchtem Filterpapier im Dunkeln inkubiert, bevor ein *gus*-Test (siehe 3.2.1.9) durchgeführt wurde.

Zählung und Vermessung von *gus*-gefärbten Blattbereichen

Die *gus*-gefärbten Blattbereiche wurden im Binokular bei 40-facher Vergrößerung gezählt; der Durchmesser (μm) konnte mittels kalibriertem Messokular bestimmt werden.

3.3 Biochemische und Immunologische Methoden

3.3.1 Immunglobulinreinigung aus Antiserum

Zum Zweck des Einsatzes des Rohserums AS 570 für den Nachweis des PPV im ELISA (siehe 3.3.2) und zum Nachweis von Heterologer Enkapsidierung in Dekorationspräparaten im Elektronenmikroskop (siehe 3.4.4), sollten die IgG mittels einer Protein-A Säule gereinigt werden. Zu diesem Zweck wurden Protein-A Säulen der Fa. Pierce verwendet. Es wurden vom Antiserum AS 570 der dritten und vierten Blutabnahme die IgG gereinigt.

Die Reinigung erfolgte nach dem Protokoll der Fa. Pierce (siehe 8.8.30):

- Zugabe von 5 x 1 ml Equilibration-Puffer zur Äquilibration der Säule.
- Zugabe von 1 ml Binding-Puffer zu 1 ml des Rohserums und Zugabe auf die Säule.
- Zugabe von 6 x 2 ml Binding-Puffer zum Waschen der Säule.
- Eluieren der IgG mit 5 x 1 ml Tris-Puffer (pH 7,5).
- Auffangen von 1 ml Fraktionen und Proteinbestimmung bei $\lambda=280$ nm gegen Tris-Puffer.
- Dialyse der Fraktionen mit der höchsten OD gegen 1x PBS (Na-Azid) ü.N. bei 4 °C.

Die Proteinkonzentration einer 1/10 Verdünnung des Eluates wurde gegen PBS bei

$\epsilon=280$ nm gemessen und auf eine OD von 1,4 eingestellt, welches einer IgG-Konzentration von 1 mg/ ml entsprach. Die gereinigten IgG konnten bei 4 °C gelagert werden.

3.3.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zum immunologischen Nachweis des PPV oder der PPV-Rekombinanten aus Pflanzenmaterial (hier *N. benthamiana*) wurde ein indirekter PTA-ELISA ("plate trapped antigen") verwendet. Es wurden zwei Antiseren eingesetzt: Die IgG aus AS 570 (CP) oder im Fall einer Mutation im CP das Antiserum AS 568, welches gegen die HCpro von PPV gerichtet ist (siehe auch 2.1). Im PTA-ELISA wurde das Antigen im Pflanzenpreßsaft direkt an die ELISA-Platte gebunden. Im indirekten Nachweis wurde der erste Antikörper mit einem zweiten Alkalische Phosphatase (AP) konjugierten GaR-Antikörper detektiert. Als Substrat für die AP wurde p-Nitrophenylphosphat verwendet. Der PTA-ELISA wurde in Anlehnung an Hobbs *et al.* (1987) durchgeführt. Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt, wobei die Antiseren und Substratlösungen erst direkt vor Gebrauch angesetzt wurden (siehe 8.8.31):

- 0,1 g Blattmaterial in 1 ml PBS-NaDieca mörsern, 1/5 verdünnen (entspricht 1/50 Verd.).
- Zentrifugation bei 13000 Upm für 1'.
- Beschickung der ELISA-Platte; je 100 μ l in vier Vertiefungen/Probe.
- Durchführung von Positiv- und Negativkontrolle.
- Inkubation für 30' - 60' bei 37 °C.
- 3x waschen mit 200 μ l PBS-T pro Vertiefung.
- Zugabe von 100 μ l Antiserum (IgG 570 1/1000, 568 1/500) in PBS-TP pro Vertiefung und Inkubation für 60' bei 37°C.
- 3x waschen mit 200 μ l PBS-T pro Vertiefung.
- Pro Vertiefung Zugabe von 100 μ l Antiserum GaR-AP 1/16000 in PBS-TP verdünnt und Inkubation für 60' bei 37°C.
- 3 x waschen mit 200 μ l PBS-T pro Vertiefung.
- Zugabe von 100 μ l Substratlösung pro Vertiefung und nach Einsetzen der Färbung bei Rt oder 37 °C Messung der Extinktion bei $\epsilon=405$ nm im ELISA-Photometer.

3.3.3 Gesamtproteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Zum Nachweis der Expression transgener Virusproteine in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen im Western-Blot (siehe 3.3.6) wurde eine modifizierte Methode zur Gesamtproteinextraktion von Berger *et al.* (1989) verwendet. Die Extraktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt (siehe 8.8.32)

- Mörsern von 0,3 g Blattmaterial (-70 °C) in 750 µl heißem (95 °C) Probenpuffer.
- Füllen der Probe in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß und Inkubation für 10' bei 95 °C.
- Zentrifugation für 15' bei 13000 Upm und 4 °C.
- Überführen des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß.
- Auftragen von 20 µl der Probe auf ein SDS/PAGE Gel (10 %).
- Elektrophorese und Elektroblot mit Immunoassay (siehe 3.3.6).

3.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese zur Trennung von Proteinen

Zur Analyse von Gesamtproteinextrakten aus transgenen Pflanzen wurden diese mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) aufgetrennt.

Das Acrylamid ist ein Monomer, welches durch Zusatz von Radikalen (Ammoniumpersulfat) und Stabilisierung durch TEMED polymerisiert. TEMED ist ein bifunktionelles Reagenz, welches neben seiner Stabilisierungsfunktion die polymerisierten Acrylamidmoleküle quervernetzt und damit zur Ausbildung eines Gels führt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt unabhängig von ihrer Ladung auf Basis ihrer Molekülgröße. Durch die Beladung mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die unterschiedlichen Eigenladungen von Proteinen so überdeckt, daß Anionen mit konstanter Nettoladung pro Masseinheit entstehen. Indem alle Moleküle gleichmäßig gestreckt werden, werden unterschiedliche Sekundär- und Tertiärstrukturen ausgeglichen. Das SDS spaltet jedoch keine Disulfidbrückenbindungen, sondern ausschließlich Wasserstoffbrückenbindungen. Der reduzierende Mercaptoethanol, Bestandteil des Laemmlipuffers, vermag die Tertiärstruktur vollständig aufzulösen. Die Matrix dieser Elektrophorese (PAA) verhält sich wie ein Molekülsieb und trennt die SDS-Proteinkomplexe, in Annäherung proportional zum Logarithmus der

Molekülmassen, auf. Mit parallel aufgetragenen Markerproteinen lassen sich die Molekulargewichte der Proteine in der Probe mit einer Genauigkeit von bis zu $\pm 10\%$ bestimmen (Weber & Osborne, 1969).

Die Herstellung von diskontinuierlichen PAA-Gelen in der Gießapparatur für die Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur, bestehend aus einem Trenngel und einem darüberliegenden Sammelgel mit einer Größe von 100 mm x 80 mm x 1,5 mm, wurde wie folgt durchgeführt. Für jedes Trenngel werden Glasplatte, Keramikplatte und Abstandshalter ("spacer") benötigt (siehe 8.8.33):

Trenngele (4 Stk.)	12,5 %
Acrylamidlösung	18,0 ml
TGP	11,25 ml
H ₂ O, dann entgasen	15,3 ml
APS	0,45 ml
TEMED	45,0 μ l

Die angegebenen Volumina wurden zusammenpipettiert und nach dem Gießen des Gels mit 1 ml A. bidest. überschichtet. Die Polymerisation mußte vor Gebrauch mindestens 2-3 h erfolgen. Die Herstellung der 4 %-igen Sammelgele mit Einsetzen des Probenkammes (20 μ l Vol.) erfolgte direkt in der Vertikalelektrophoreseapparatur (Typ Hoefer Mighty Small II).

Sammelgele (4 Stk.)	4 %
AA	1,3 ml
SGP	2,5 ml
H ₂ O	6,1 ml
APS	0,1 ml
TEMED	10,0 μ l

Die Sammelgele polymerisierten für 30', bevor Elektrophoresepuffer eingefüllt, Proben aufgetragen werden und die Elektrophorese unter Wasserkühlung gestartet wurde (Sammelgel 80 V/60 mA, Trenngel 120 V/65 mA).

3.3.5 Proteinfärbung in PAA-Gelen mit Coomassie

Die Färbung von Proteinen in PAA-Gelen wurde nach der Methode von Weber & Osborne (1969) durchgeführt (siehe 8.8.34).

- Inkubation des Gels in der Färbelösung für 60' unter Schütteln bei Rt.
- Inkubation des Gels in der Entfärbelösung für mehrere Stunden oder ü.N. unter mehrmaliger Erneuerung der Lsg..

Die Entfärbelösung kann nach der Benutzung über Aktivkohle gereinigt werden. Die ungefähre Bestimmung des Molekulargewichtes wurde mit einem parallel aufgetragenen Proteinemarker (Mid-Range) der Fa. Promega durchgeführt. Das Molekulargewicht der Standardproteine ist im Anhang 8.8.35 angegeben.

3.3.6 Proteinelektroblot ("Westernblot")

Die Methode des Proteinelektroblots wurde nach Towbin *et al.* (1979) durchgeführt, sie ist als Western-Blot bekannt. Sie wird mit dem nachfolgenden Immunoassay auch als EBIA (Elektroblot-Immunoassay) bezeichnet. Mit dieser Methode werden, nach der Größe aufgetrennte Proteine aus einem SDS-PAA-Gel, ohne Verlust der Auflösung elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran überführt und dort durch Adsorption immobilisiert. Die Überführung erfolgt vollständig und nur mit geringen quantitativen Verlusten. Auf der NC-Membran sind die Proteine für immunologische und analytische Untersuchungen gut zugänglich. Für das Protein-"blotting" wurde eine Vertikal-Elektroblot Kammer (Hoefer Scientific Instruments) eingesetzt. Die Zusammensetzung des "blotting"-Puffers ist im Anhang 8.8.36 zu finden.

Das Gerät wurde auf folgende Art und Weise zusammengebaut:

- Anode
- Plastikmaske
- Puffer getränkter Schwamm
- Puffer getränktes Blotpapier (Whatman 3MM-Papier)
- PAA-Gel
- NC-Membran (0,45 µm, Fa. Schleicher & Schuell)
- Puffer getränktes Blotpapier
- Puffer getränkter Schwamm
- Plastikmaske

- Kathode

Diese Schichtung wurde in die Kammer eingeführt, "blotting"-Puffer bis zur Markierung eingefüllt und die Spannungsversorgung angeschlossen. Das "blotting" fand ü.N. bei 40 V und 160 mA statt.

3.3.7 Immunfärbung von Proteinen ("Immunoassay")

Zur Detektion von immobilisierten Proteinen auf der NC-Membran waren folgende Arbeitsschritte durchzuführen (siehe 8.8.37):

- Waschen der Membran für 2' in TBS 2 % Tween unter leichtem Schütteln.
- Waschen der Membran für 15' mit TTBS.
- Zugabe einer Serumverdünnung in TTBS (Serum 568 oder 570 IgG) (Verdünnung 1/2000).
- Inkubation für 60' unter Schütteln bei Rt.
- Waschen für 3 x 5' mit TTBS.
- Zugabe des zweiten Antikörpers (GaR-IgG-AP) (Verdünnung 1/10000).
- Wiederholung des Inkubations- und Waschschrtes.

3.3.7.1 Naphthol AS-MX Phosphat/Fast-Red Nachweis

Zur Durchführung eines AS-MX Phosphat/Fast-Red Nachweises wurden 15 ml Naphthol AS-MX Phosphat-Lösung zu 15 ml Fast-Red-Lösung gegeben (frisch angesetzt). Die Lösung wurde mit der Membran bei Rt unter Schütteln inkubiert, bis eine ausreichende Färbung sichtbar wurde (siehe 8.8.37).

3.3.7.2 NBT/BCIP Nachweis

Die einzelnen Lösungen für den NBT/BCIP-Nachweis sind im Anhang unter 8.8.37 zu finden.

- Zugabe von "detection"-Puffer zur Äquilibration der Membran.
- Zugabe von 15 ml "detection"-Puffer mit 45 µl BCIP-Lsg. und 90 µl NBT-Lsg..
- Inkubation unter Schütteln bei Rt bis eine ausreichende Färbung sichtbar wird.

- Aufbewahrung der Membran nach Detektion zwischen Whatman-3MM im Dunkeln.

3.4 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Methoden wurden in dieser Arbeit zum Nachweis von Pflanzenviren, als Zusatzinformation zum immunologischen ELISA und zum Nachweis der Heterologen Enkapsidierung angewendet. Es wurde ein Transmissions-elektronenmikroskop der Fa. Zeiss (EM 109) mit Transfaseroptik und Großbildkamera außerhalb des Vakuums zur Dokumentation benutzt.

3.4.1 Herstellung von Objektträgern

Die Herstellung von Objektträgern für elektronenmikroskopische Präparate für sämtliche durchgeführten Nachweisverfahren wurde nach einem Verfahren von Dr. D.-E. Lesemann (persönliche Mitteilung) durchgeführt. Kupfernetze wurden mit Pioloform befilmt und mittels Kohlenstoffbedampfung im Sputter stabilisiert (siehe 8.8.39). Die so vorbereiteten Objektträger besaßen 400 quadratische Blickfelder mit einer Fläche von jeweils $35 \mu\text{m}^2$.

- Tauchen eines geputzten Objektträgers in 1,5 % Pioloform (Chloroform).
- Anritzen des Films mit Skalpell und auf der Wasseroberfläche (staubfrei) flottieren lassen.
- Auflegen von saubereren Grids mit glänzender Seite nach oben.
- Entnahme der Grids auf dem Film mit Filterpapier von der Oberfläche, trocknen lassen.
- Durchführung der Kohlebedampfung.

Die Bedampfung wurde freundlicherweise von Dr. D.-E. Lesemann im Elektronenmikroskopischen Labor der BBA-Braunschweig durchgeführt.

Die Herstellung von Viruspräparaten für die Elektronenmikroskopie wurde nach Milne & Lesemann (1984) mit leichten Veränderungen durchgeführt.

3.4.2 Herstellung von Tropfpräparaten

Die Herstellung von Tropfpräparaten wurde zur schnellen Diagnose verwendet, weil mit ihr innerhalb von 10-15´ bei bekanntem Virus eine systemische Infektion nachweisbar ist. Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt (siehe 8.8.40):

- Ein Blattstück der infizierten Pflanze mit Pasteurpipette und Objektträger ausstanzen.
- Mit Glasstäbchen und 2-3 Tropfen Phosphat-Puffer auf dem Objektträger Preßsaft herstellen.
- Preßsaft mit Pasteurpipette aufsaugen und einen Tropfen auf Parafilm auftropfen.
- Grid mit bedampfter Seite nach unten für 5´-10´ auf dem Tropfen inkubieren.
- Gridunterseite mit 40 Tropfen A bidest. waschen.
- Gridunterseite mit 5 Tropfen Uranylacetat 1 % kontrastieren.
- Überschüssiges Uranylacetat sofort vollständig mit Filterpapier absaugen.
- Mit der Unterseite nach oben auf Filterpapier trocknen.

3.4.3 Immunadsorptionselektronenmikroskopie (ISEM)

ISEM wurde durchgeführt, um bei geringen Viruskonzentrationen im Pflanzenpreßsaft mittels Immunadsorption eine höhere Anzahl Viruspartikel auf der Gridoberfläche zu binden und zu visualisieren.

- Ein Grid mit der Unterseite 15´-1 h auf einem Tropfen Rohserum oder IgG inkubieren.
- Konzentrationen: IgG 1/200 und AS 1/1000 verdünnt in Phosphat-Puffer
- Gridunterseite mit 20 Tropfen Phosphat-Puffer waschen, überschüssigen Phosphat-Puffer mit Filterpapier absaugen.
- Tropfpräparat oder Dekoration durchführen.

3.4.4 Dekoration von Präparaten mit Antiseren

- Tropfpräparation bis zur Inkubation auf Preßsaft durchführen.
- Gridunterseite mit 20 Tropfen Phosphat-Puffer waschen und überschüssigen Phosphat-Puffer mit Filterpapier absaugen.
- Gridunterseite auf einem Tropfen AS oder IgG für 15' bis ü.N. inkubieren.
- Konzentrationen: IgG 1/10, Rohserum 1/50 in Phosphat-Puffer.
- Grid wie oben waschen, kontrastieren und trocknen.

3.4.5 Immungoldmarkierung von Dekorationspräparaten

- Herstellung eines Tropfpräparates mit anschließender Dekoration.
- Gridunterseite mit 20 Tropfen Phosphat-Puffer waschen, überschüssigen Phosphat-Puffer mit Filterpapier absaugen.
- Gridunterseite für 10' auf einem Tropfen 1 % BSA inkubieren überschüssigen Puffer mit Filterpapier absaugen (nicht waschen).
- Gridunterseite auf einem Tropfen GaR 10 nm Gold (1/50 PBS-T) für 1 h inkubieren.
- Grid wie oben waschen, kontrastieren und trocknen.

3.5 Softwareprogramme

- Genmon (GBF Braunschweig)
- DNASIS Ver. 2.0 (Fa. Hitachi)
- ClustalX (Higgins & Sharp, 1988)
- Tree View; Roderic D.M. Page ,1997
([http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod.html](http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html))
- Oligo Ver. 4.0; Wojciech Rychlik, 1991
- SAS software system 1996
- Vector NTI; Infor Max Inc.
(<http://www.informaxinc.com/vectornti.html>)
- Proteindatenbank zur Sekundärstrukturvorhersage
(<http://bonsai.lif.icnet.uk/foldfitnew/index.html>)

4 ERGEBNISSE

4.1 Untersuchungen mit transgenen virusresistenten *N. benthamiana*

4.1.1 PCR-Mutagenese von CP und HCpro

Ein Hauptziel dieser Arbeit war die Herstellung von transgenen virusresistenten *N. benthamiana* Pflanzen, die mit modifizierten Genen des PPV (CP und HCpro) transformiert sind und eine Resistenz gegenüber dem PPV aufweisen. Mit den modifizierten CP-Genen sollte das Auftreten von Heterologer Enkapsidierung, Komplementation und Rekombination in transgenen virusresistenten Pflanzen begrenzt werden. Mit Hilfe der modifizierten HCpro-Gene sollte erstmals die Möglichkeit untersucht werden, in transgenen *N. benthamiana* Pathogen-vermittelte Resistenz zu erzeugen und gleichzeitig eine Komplementation von Blattlausübertragungsfunktionen fremder Viren zu verhindern.

Das CP- und HCpro-Gen wurden so modifiziert, daß die Motive wichtiger viraler Funktionen, die über diese Vorgänge fremden Viren zur Verfügung gestellt werden könnten, mutagenisiert wurden. Diese viralen Funktionen betreffen Kurz- und Langstreckentransport, Enkapsidierung und Blattlausübertragbarkeit des CP, sowie die Beteiligung an der Blattlausübertragbarkeit der HCpro des PPV (siehe Einleitung).

Um in der Pflanze exprimiert werden zu können, mußten die Gene zuerst unter Kontrolle eines eukaryontischen Promotors und Polyadenylierungssignals gebracht werden. Das unveränderte CP-NAT des PPV lag bereits im pflanzlichen Expressionsplasmid (pe35SL-NAT-CP, siehe Anhang 8.2) unter Kontrolle des 2x35S-Promotors und des Polyadenylierungssignals aus dem CaMV vor (Prof. Dr. E. Maiß, persönliche Mitteilung). Das unmodifizierte PPV-CP aus pe35SL-NAT-CP wurde bereits von Korte *et al.* (1997) erfolgreich zur Transformation von *N. benthamiana* und zur Resistenz erzeugung gegenüber dem PPV eingesetzt. Die HCpro des PPV-NAT lag kloniert in einem bakteriellen Expressionsplasmid mit eingefügtem Startcodon vor und konnte, mit einem doppelten Restriktionsverdau (*NcoI/XbaI*) in pe35SL3 (Prof. Dr. E. Maiß, persönliche Mitteilung), zwischen 2x35S-Promotor und Polyadenylierungssignal, kloniert werden. Damit wurde das Plasmid pe35SL3-HCpro erzeugt (siehe Anhang 8.2).

Im Hüllproteingen der Potyviren befinden sich hochkonservierte Aminosäuremotive, für die eine Beteiligung an der Partikelassemblierung gezeigt werden konnte. Diese Aminosäuremotive im CP des PPV wurden mutiert, um sie funktionslos zu machen. Damit sollten zwei Fragestellungen überprüft werden. Erstens war nachzuweisen, ob ein auf diese Art und Weise mutiertes CP-Gen noch Resistenz in transgenen Pflanzen vermitteln kann. Zweitens sollte untersucht werden, ob ein assemblierungsdefektes CP in transgenen Pflanzen noch die Heterologe Enkapsidierung von fremden eindringenden Viren unterstützt.

Im Hüllproteingen wurden die Aminosäuren der Assemblierungsmotive ($R^{3015}Q^{3016}$ und D^{3059}) durch Aminosäuren mit entgegengesetzten chemischen Eigenschaften ausgetauscht. Die Zahlen geben die Aminosäureposition in PPV-NAT an (Maiss *et al.*, 1989). Im $R^{3015}Q^{3016}$ -Motiv wurde basisches Arginin (R) durch saures Asparagin (D) und polares Glutamin (Q) durch unpolares Leucin (L) ersetzt (RQ zu DL). Gleichzeitig konnte zur einfachen Verifizierung der Mutation eine Restriktionsschnittstelle eingebaut werden (hier *AatII*). Im zweiten D^{3059} -Motiv wurde saures Asparagin (D) durch basisches Lysin (K) ersetzt. Um eine Restriktionsschnittstelle (*BglII*) mit einfügen zu können, mußte zusätzlich unpolares Phenylalanin (F) durch ebenfalls unpolares Isoleucin (I) ersetzt werden. Um den Einfluß beider veränderter Motive auf die Resistenzvermittlung und die Heterologe Enkapsidierung untersuchen zu können, wurden die Mutationen einzeln und gemeinsam ins CP-Gen eingefügt. Mit diesem Ansatz wurden drei verschieden mutierte CP-Gene erzeugt. In einem weiteren Konstruktionsansatz wurden 83 Aminosäuren des N-Terminus des CP entfernt, ohne dabei den CP-Leserahmen zu zerstören. Damit sollten CP-Funktionen wie Blattlausübertragbarkeit und Transportbeteiligung, die durch den N-Terminus vermittelt werden, entfernt werden. Auf dem N-Terminus des CP des PPV befindet sich das innerhalb der Potyviren konservierte Aminosäuretriplet DAG, welches für die Blattlausübertragbarkeit verantwortlich ist (siehe Einleitung). Dieses Motiv ist im hier verwendeten CP des nichtaphidenübertragbaren Isolates PPV-NAT zu $DAL^{2857-2859}$ mutiert. Da nicht sichergestellt ist, ob nicht noch weitere Motive auf dem N-Terminus an der Blattlausübertragbarkeit anderer Potyviren beteiligt sind, sollte der gesamte N-Terminus entfernt werden. Mit diesem $\Delta 83$ -Konstrukt sollte überprüft werden, ob ein verkürztes CP noch in der Lage ist, in transgenen Pflanzen Resistenz zu vermitteln und Heterologe Enkapsidierung zu unterstützen. Anstelle des A^{2894} wurde ein Startcodon (AUG) und zur Klonierung des verkürzten CP-Gens eine

*Nco*I-Restriktionsschnittstelle eingebaut. Die einzelnen Mutationen und eingefügten Schnittstellen sind in Abb. 4 dargestellt.

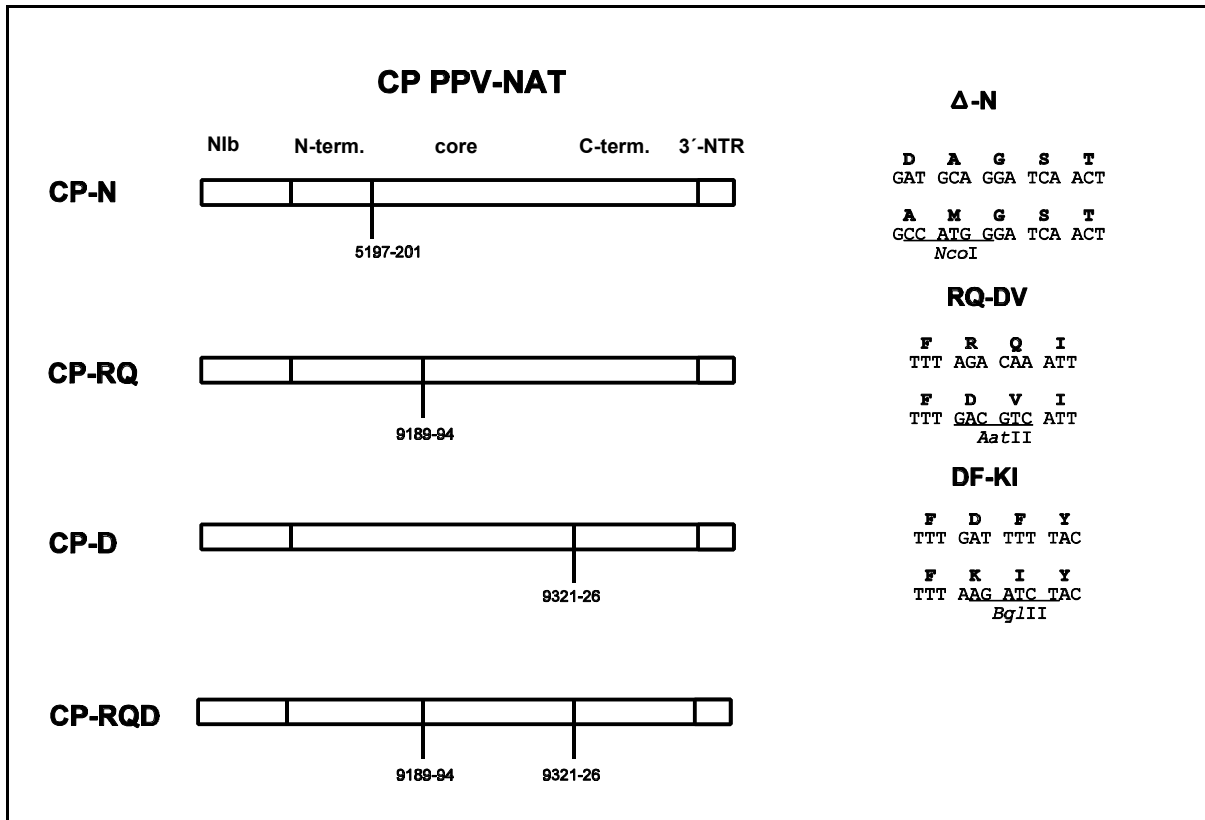


Abb. 4: Assemblierungsmutationen und N-terminale Deletion im CP des PPV-NAT. Die Zahlen geben die Nukleotidpositionen im PPV-NAT (Maiss *et al.*, 1989) an. (Nib: Nuclear inclusion body b, 3'-NTR: 3'-nichttranslatierter Bereich)

Eine spezifische Interaktion zwischen dem CP und der HCpro von Potyviren bewirkt die Bindung von Viruspartikeln an die Mundwerkzeuge von Aphiden und ermöglicht damit die nichtpersistente Übertragung (siehe Einleitung). In der Helferkomponente -Protease (HCpro) des PPV befinden sich zwei innerhalb der Potyviren hochkonservierte Aminosäuremotive (KITC³⁹⁶⁻⁹⁸, PTK⁶⁵⁴⁻⁵⁶), für die am Beispiel des TVMV und ZYMV, eine Beteiligung an der Blattlausübertragbarkeit gezeigt werden konnte. Dabei hatten im KITC-Motiv Lysin (K) und im PTK-Motiv Threonin (T) und Lysin (K) den stärksten Einfluß auf die Blattlausübertragbarkeit. In den PPV-HCpro Konstrukten, die für Pflanzentransformationsexperimente eingesetzt wurden, sollten diese Aminosäuremotive mittels Mutagenese funktionslos gemacht. Somit sollte eine

(siehe 8.2), eingefügt.

4.1.1.1 PCR-Mutagenese zur Einfügung von CP-RQ, -D, CP-RQ-D und CP-N in das CP-NAT

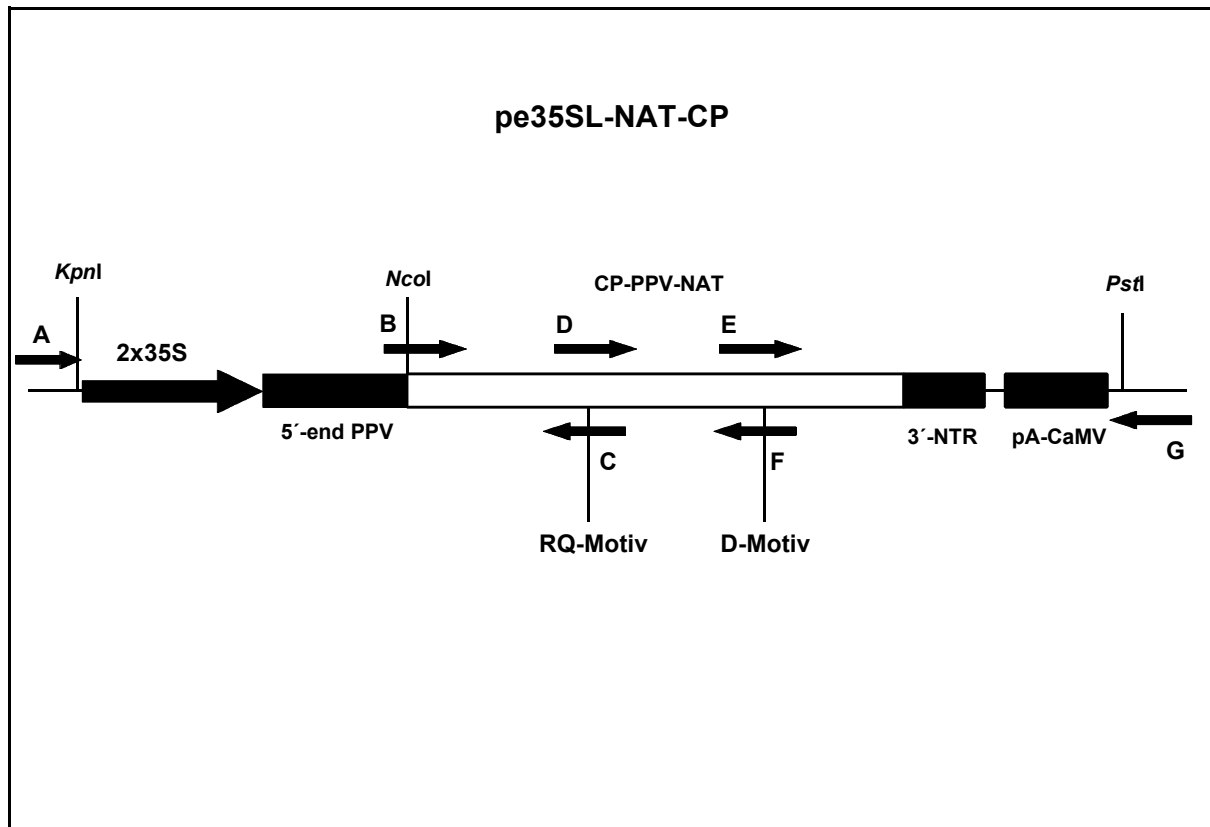


Abb. 6: PCR-Mutagenese des PPV CP-Gens

A: T3, B: CP-MUT-N, C: CP-PCR1, D: CP-MUT2, E: CP-PCR2, F: CP-MUT3, G: T7.

Die Pfeile geben die jeweiligen Primer in 5'-3'-Richtung an.

Die PCR-Mutagenese wurde, wie in Abb. 6 schematisch angegeben, mit den jeweils angegebenen Primern an den entsprechenden Minipräparationen der Ausgangsplasmide durchgeführt (siehe 3.2.4.4). Die PCR-Produkte wurden über eine Standard-Gelelektrophorese auf die erwartete Fragmentgröße überprüft, mit QIAquick gereinigt und wie beschrieben kloniert. Die Selektion erfolgte über die auf den Plasmiden vorliegenden Antibiotikaresistenzgene (siehe Anhang 8.2). Die erzeugten Plasmide wurden mit den geeigneten Restriktionsenzymen, anhand der vorher hergestellten Plasmidkarten, identifiziert (Vector NTI).

Die einzelnen durchgeführten Arbeiten sind aufgrund der Vielzahl von PCR-Reaktionen, Reinigungsschritten und Klonierungen nur stichwortartig angegeben.

Herstellung von pe35SL-NAT-CP-N

- PCR-Mutagenese mit CP-MUT-N und T7 aus pe35SL-NAT-CP, Restriktion des PCR-Fragmentes *NcoI/PstI* und Klonierung in pe35SL-NAT-CP *NcoI/PstI*.
Produkt: pe35SL-NAT-CP-N

Herstellung von pe35SL-NAT-CP-RQ

- Vorbereitung des Vektors pGEM-5Zf(+) zur Entfernung einer *AatII* Schnittstelle. Restriktion *AatII*, Auffüllungsreaktion mit Klenow-Fragment, Ligation und Transformation.
Produkt: pGEM-5Zf(+)-*AatII*-aufgefüllt
- PCR-Mutagenese mit T3 und CP-PCR1, Restriktion des PCR-Fragmentes *NcoI/PstI* und Klonierung in pGEM-5Zf(+)-*AatII*-aufgefüllt *NcoI/PstI*.
Produkt: pGEM-5Zf(+)-CPRQ1
- PCR-Mutagenese mit CP-MUT2 und T7, Restriktion des PCR-Fragmentes *AatII/PstI* und Klonierung in pGEM-5Zf(+)-CPRQ1 *AatII/PstI*.
Produkt: pGEM-5Zf(+)-CPRQ2
- Klonierung des PCR-Fragmentes aus pGEM-5Zf(+)-CPRQ2 *NcoI/PstI* in pe35SL-NAT-CP *NcoI/PstI*.
Produkt: pe35SL-NAT-CP-RQ

Herstellung von pe35SL-NAT-CP-D

- PCR-Mutagenese mit T3 und CP-PCR2, Restriktion des PCR-Fragmentes *NcoI/PstI* und Klonierung in pGEM-5Zf(+) *NcoI/PstI*.
Produkt: pGEM-5Zf(+)-CP-D1
- PCR-Mutagenese mit CP-MUT2 und T7, Klonierung des PCR-Fragmentes *BglII/PstI* und Klonierung in pGEM-5Zf(+)-CP-D1 *BglII/PstI*.

- Produkt: pGEM-5Zf(+)-CP-D2
- Klonierung aus pGEM-5Zf(+)-CPD2 *NcoI/PstI* in
- pe35SL-NAT-CP *NcoI/PstI*.
Produkt: pe35SL-NAT-CP-D

Herstellung von pe35SL-NAT-CP-RQD

- PCR-Mutagenese mit CP-MUT2 und CP-PCR2, Restriktion des PCR-Fragmentes *AatII/PstI* in pGEM-5Zf(+)-CP-RQ1 *AatII/PstI*. Produkt pGEM-5Zf(+)-CPRQD1.
- Klonierung des *BglII/PstI* PCR-Fragmentes *BglII/PstI* in pGEM-5Zf(+)-CPRQD1. Produkt pGEM-5Zf(+)-CPRQD2
- Klonierung des CP-Fragmentes aus pGEM-5Zf(+)-CPRQD2 *NcoI/PstI* in pe35SL-NAT-CP *NcoI/PstI*.
Produkt: pe35SL-NAT-CP-RQD

4.1.1.2 PCR-Mutagenese zur Einfügung von HC-KITC, -PTK und -KITC-PTK in die HCpro

Umklonierung der HCpro zur Mutagenese

Die PCR-Mutagenese der HCpro des PPV-NAT konnte, aus Mangel an passenden Restriktionsschnittstellen, nicht direkt an pe35SL3HC durchgeführt werden. Es war notwendig die HCpro in ein Plasmid ohne eine *SacII* Restriktionsschnittstelle umzuklonieren.

Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt:

- Restriktion des HCpro-Gens aus pe35SL3-HCpro *NcoI/PstI*, Klonierung in pGEM-5Zf(+) *NcoI/PstI*.
Produkt: pGEM-5Zf(+)-HCpro
- Entfernung der *EcoRI*-Schnittstelle durch Restriktion *EcoRI*, Auffüllungsreaktion mit Klenow-Fragment, Ligation und Transformation.
Produkt: pGEM-5Zf(+)-HCpro-*EcoRI*-aufgefüllt

Anschließend konnte die PCR-Mutagenese wie in Abb. 7 dargestellt mit den unterschiedlichen angegebenen Primern durchgeführt werden. Auch hier konnten die erzeugten Plasmide mit geeigneten Restriktionsenzymen, anhand der vorher hergestellten Plasmidkarten (Vektor NTI), identifiziert werden.

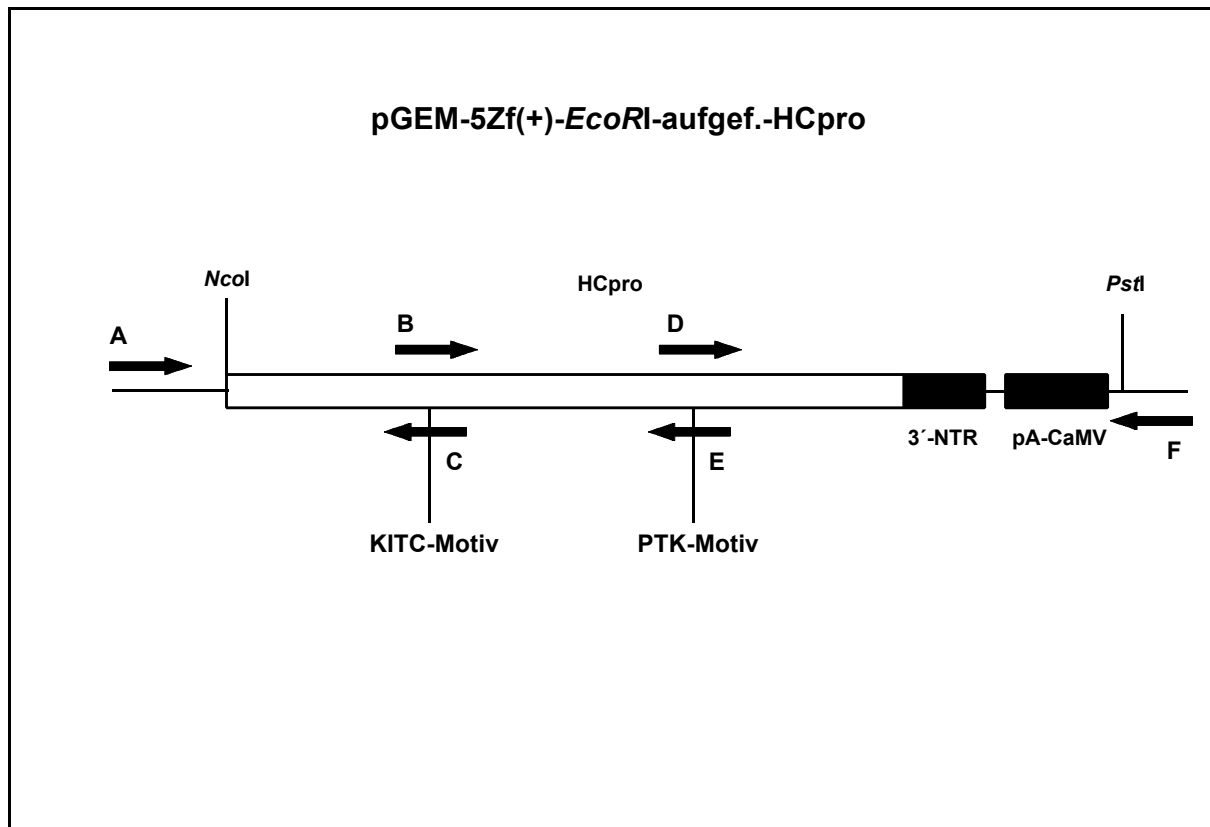


Abb. 7: PCR-Mutagenese des HCpro-Gens

A: T7, B: HC-MUT1, C: HC-PCR1, D: HC-MUT2, E: HC-PCR2, F: SP6.

Herstellung von pe35SL3-HC-KITC

- PCR-Mutagenese mit T7 und HC-PCR1. Restriktion und Klonierung des PCR-Fragmentes *NcoI/PstI* in pGEM-5Zf(+) *NcoI/PstI*.
Produkt: pGEM-5Zf(+)-HCK1
- PCR-Mutagenese mit HC-MUT1 und SP6. Restriktion und Klonierung des PCR-Fragmentes *EcoRI/PstI* in pGEM-5Zf(+)-HCK1 *EcoRI/PstI*.
Produkt: pGEM-5Zf(+)-HCK2
- Klonierung des HCpro-Fragmentes aus pGEM-5Zf(+)-HCK2 *NcoI/PstI* in pe35SL3-HCpro *NcoI/PstI*.
Produkt: pe35SL3-HC-KITC

Herstellung von pe35SL3-HC-PTK

- PCR-Mutagenese mit T7 und HC-PCR2. Restriktion und Klonierung des PCR-Fragmentes *NcoI/PstI* in pGEM-5Zf(+) *NcoI/PstI*.
Produkt: pGEM-5Zf(+)-HCP1
- PCR-Mutagenese mit HC-MUT2 und SP6. Restriktion und Klonierung des PCR-Fragmentes *SacII/PstI* in pGEM-5Zf(+)-HCP1 *SacII/PstI*.
Produkt: pGEM-5Zf(+)-HCP2
- Klonierung des HCpro-Fragmentes aus pGEM-5Zf(+)-HCK2 *NcoI/PstI* in pe35SL3-HCpro *NcoI/PstI*.
Produkt: pe35SL3-HC-PTK

Herstellung von pe35SL3-HC-KITC-PTK

- PCR-Mutagenese mit HC-MUT1 und HC-PCR2. Restriktion des PCR-Fragmentes *EcoRI/PstI* in pGEM-5Zf(+)-HCK1 *EcoRI/PstI*.
Produkt: pGEM-5Zf(+)-HCKP1
- Klonierung des PCR-Fragmentes *SacII/PstI* (s.o.) in pGEM-5Zf(+)-HCKP1.
Produkt: pGEM-5Zf(+)-HCKP2
- Klonierung des HCpro-Fragmentes aus pGEM-5Zf(+)-HCKP2 *NcoI/PstI* in pe35SL3-HCpro *NcoI/PstI*.
Produkt: pe35SL3-HC-KITC-PTK

Nachdem sämtliche erforderlichen CP- und HCpro-Mutanten erzeugt waren, wurde von allen Plasmiden pe35SL-NAT-CP-RQ, -D, RQ-D, -N und pe35SL3HC-KITC, -PTK, -KITC-PTK ssDNA erzeugt und mit spezifischen Primern die Sequenz der Mutationsstellen bestimmt. Im CP-Gen wurde jede Assemblierungsmutante von der *SacI*-Schnittstelle (Pos. 8976 PPV-NAT) bis zur *PstI*-Schnittstelle, welche sich 3' zum Polyadenylierungssignal befindet, sequenziert. Bei allen Mutanten wurden die gewünschten Aminosäureaustausche nachgewiesen und kein zusätzlicher Nukleotidaustausch im sequenzierten Bereich festgestellt. Die Ä83-CP-Mutante wurde ab der *EcoRV* Restriktionsschnittstelle im 35S-Promotor sequenziert. Die ersten 170 Bp des CP-Gens zeigten keine Nukleotidaustausche und die N-terminale Verkürzung konnte erfolgreich integriert werden. Im Gen der HCpro wurden bei der HC-KITC-Mutante die ersten 230 Bp der HCpro sequenziert und eine erfolgreiche Mutagenese festgestellt. Jedoch wurden zusätzliche Nukleotidaustausche an zwei

Stellen des sequenzierten Bereiches bestimmt, die zu Aminosäureaustauschen führten (S^{352} -W, D^{353} -G). Die gleichen Austausche im gleichen sequenzierten Bereich wurden bei der HC-KITC-PTK-Mutante festgestellt. 400 Bp des Bereiches der PTK-Mutation ab Pos. 1918 des PPV-NAT wurden ebenfalls sequenziert. Die HC-PTK Mutante wurde im gleichen Bereich mit exakt dem gleichen Ergebnis sequenziert. Somit standen insgesamt sieben unterschiedliche Konstrukte für nachfolgende Pflanzentransformationsexperimente zur Verfügung.

4.1.2 Herstellung von pflanzlichen Expressionskassetten in binären Plasmiden

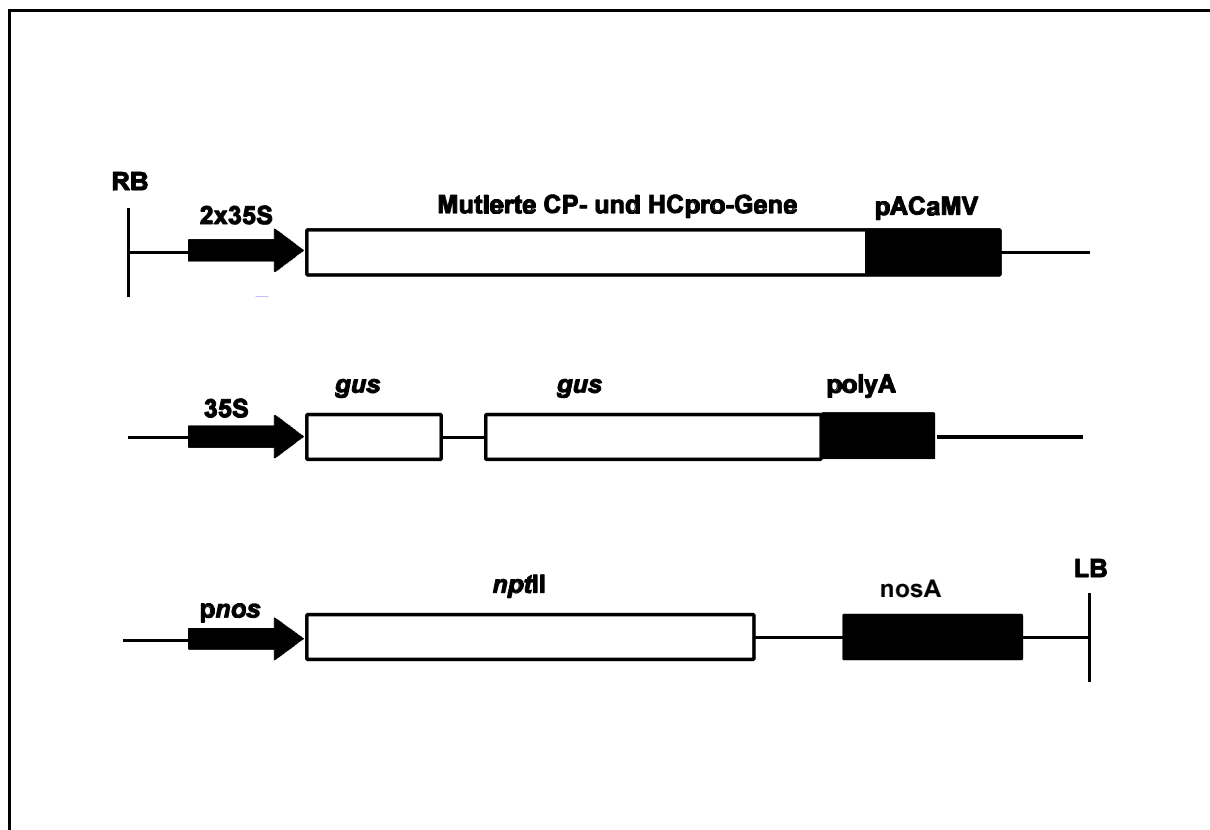


Abb. 8: Pflanzliche Expressionskonstrukte in pLX222 zwischen rechter (RB) und linker (LB) Integrationsgrenze.

gus: *gus*-Gen, *nptII*: Neomycinphosphotransferase, *pnos*: Promotor *nos*, *nosA*: Polyadenylierungssignal *nos*, pA CaMV: Polyadenylierungssignal CaMV, 35S: 35S-Promotor.

Die verschiedenen mutierten CP- und HCpro-Gene, unter Kontrolle des 2x35S

Promotors, sollten in binäre Plasmide zur Agrobakterium vermittelten Pflanzentransformation kloniert werden. Als binäres Plasmid wurde pLX222 (siehe Anhang 8.2) gewählt. Dieses Plasmid besitzt, neben einer MCS zwischen rechter und linker Integrationsgrenze (RB-LB), das *nptII*-Gen unter Kontrolle des Nopalinsynthetase-Promotors (*pnos*) und Polyadenylierungssignals (*nosA*), welches eine Kanamycinselektion der transformierten Pflanzen erlaubt. Zusätzlich wurde das *gus*-Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors aus dem Plasmid pTQGUS-N bzw. -H (siehe Anhang 8.2) mit eingefügt. Dieses Markergen ermöglichte die Selektion von regenerierten Blattstückchen mittels eines Farbstofftests (siehe 3.2.1.9). Der Aufbau der pflanzlichen Expressionskassetten in pLX222 zwischen der RB und LB ist in Abb. 8 gezeigt. Der Aufbau dieser Kassetten wurde bewußt so gewählt, da die Integration der T-DNA bei der Transformation in das Pflanzengenom von der RB zur LB erfolgt. Sollten Regenerate eine Kanamycinresistenz aufweisen und im *gus*-Test positiv erscheinen, so konnte auf jeden Fall davon ausgegangen werden, das auch das jeweilige virale Gen integriert worden war.

Aufgrund unterschiedlich vorhandener interner Restriktionsschnittstellen im Gen des CP und der HCpro war es notwendig, für beide Gene eine unterschiedliche Klonierungsstrategie zu entwickeln und durchzuführen.

Die Klonierung der Hüllproteingene erfolgte nach folgender Strategie:

- Restriktion der vier verschiedenen pe35SL-NAT-CP Plasmide *KpnI/SphI*, Klonierung in pTQGUSH *KpnI/SphI*.
Produkt: pTQGUSH-CP-N, -RQ, -D, -RQ-D
- Die vier erhaltenen Plasmide wurden ihrerseits mit *KpnI/HindIII* verdaut und die gesamte Expressionskassette in pLX222 *KpnI/HindIII* kloniert. Das Plasmid pLX222 lag als Plasmidpräparation, über QIAgen-Säulen gereinigt, vor.
Produkt: pLX222-CP-N, -RQ, -D, -RQD

Für die mutierten HCpro-Gene wurde eine abweichende Klonierungsstrategie entwickelt:

- Restriktion der drei verschiedenen pe35SL3-HCpro Plasmide mit den Enzymen *KpnI/SphI*, Klonierung in pTQGUSN *KpnI/SphI*.
Produkt: pTQGUSN-HC-K, -P, -K-P

- Die drei erhaltenen Plasmide wurden ihrerseits mit *KpnI/NheI* verdaut und die gesamte Expressionskassette in pLX222 *KpnI/XbaI* kloniert.
Produkt: pLX222-HC-KITC, -PTK, -KITC-PTK

4.1.3 Transformation des *Agrobacterium tumefaciens* Stammes LBA4404

Die sieben binären pLX222-Plasmide lagen als Plasmidminipräparation aus *E. coli* NM522 vor. Als Negativkontrolle für die Transformationsexperimente wurde ein unmodifiziertes pLX222 gewählt.

Das Ziel war, *A. tumefaciens* mit diesen Plasmiden mittels Elektroporation zu transformieren und rekombinante *A. tumefaciens* zu isolieren (siehe 3.2.1.4). Die Plasmide wurden aus *A. tumefaciens* mit Minipräparationen isoliert und mittels Restriktionsverdau identifiziert. Da aufgrund der geringen Plasmidkopienzahl in *A. tumefaciens* und der Proteinverunreinigung der DNA-Präparation ein Restriktionsmuster nur schwer zu identifizieren war, wurden die Plasmidminipräparationen in *E. coli* NM522 zurück transformiert. Hier konnten Plasmidminipräparationen zur Klonüberprüfung mittels Restriktionsverdau hergestellt werden. Die Bezeichnungen der verschiedenen Agrobakterienklone wurde für die Transformationsexperimente (siehe Tab. 4) als Bezeichnung für die verschiedenen Konstrukte gewählt.

Tab. 4: Konstrukte in binären Plasmiden zur Pflanzentransformation

LBA4404 Klon-Nr.	Beschreibung
210	pLX222-CP-N
207	pLX222-CP-RQ
221	pLX222-CP-D
219	pLX222-CP-RQD
224	pLX222-HC-K
230	pLX222-HC-P
227	pLX222-HC-KP
216	pLX222

4.1.4 Pflanzentransformation und Regeneration

Tab. 5: Ergebnisse der Transformations- und Regenerationsexperimente

Konstrukt Nr.	Anzahl transformierter Blattscheiben	Anzahl umgesetzter Sprosse	Anzahl <i>gus</i> -positiver Pflanzen	Anzahl Pflanzen (Samenträger)
210	60	60	27	23
207	60	46	19	11
221	60	21	14	10
219	60	47	18	12
224	60	15	20	16
230	60	35	22	14
227	60	34	23	14
216	60	61	0	7

Zur Pflanzentransformation wurde Blattmaterial von *N. benthamiana* aus der *in-vitro* Kultur eingesetzt (siehe 3.2.1.2). Zur Gewinnung von ausreichend Blattmaterial wurden 25 Pflanzen benötigt. Aus der Klonierung gingen sieben Agrobakterienklone hervor, eine Negativkontrolle wurde mittransformiert. Mit jedem Konstrukt wurden 2x 30 Blattscheiben in zwei parallelen Transformationsversuchen transformiert (siehe 3.2.1). Nach der Co-Inkubation wurden die Anzuchten der verschiedenen Agrobakterien-Klone auf Selektivmedium ausplattiert, um das Vorhandensein der binären Plasmide zu überprüfen. Die Blattscheiben wurden, wie unter 3.2.1.8 angegeben, mehrfach auf T1-Medium umgesetzt. Dabei wurden verbräunte Blattstücke entfernt und ergrünte Kalli von nichttransformiertem Gewebe getrennt. Nach jeweils 8-12 Wochen konnten die ersten Sprosse vom Kallusgewebe sauber getrennt und auf T2-Medium zur Wurzelinduktion umgesetzt werden. Nachdem die Pflänzchen für die Petrischale zu groß gewachsen waren, wurden sie auf MS-Medium in 30 ml Reagenzgläsern mit Kunststoffkappe umgesetzt. Nach der Ausbildung von Wurzeln und ausreichend Blattmaterial, wurde mit einzelnen Blattstückchen ein *gus*-Test (siehe 3.2.1.9) durchgeführt, *gus*-positive Pflänzchen ausgepflanzt und an Gewächshausbedingungen adaptiert. Vom Transformationsansatz der Negativkontrolle

(pLX222) konnten wie erwartet keine *gus*-positiven Pflanzen erzeugt werden. Es wurden jedoch trotzdem sieben kanamycinresistente Pflanzen als Negativkontrolle für den sich anschließenden PPV-Resistenztest an Gewächshausbedingungen adaptiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefaßt. In den Transformations-experimenten wurden von jedem Konstrukt mindestens zehn kanamycinresistente und im *gus*-Test positiv reagierende Pflanzen regeneriert.

4.1.5 Erzeugung der T₁- Generation, Resistenztestung und Erzeugung der T₂-Generation

Alle in Tab. 5 angegebenen Pflanzen wurden bis zur Samenreife kultiviert (siehe 3.2.1.10). Von allen regenerierten Pflanzen konnten Samen geerntet werden, die keimfähig waren. Von jeder Linie wurden Pflanzen angezogen. Die beschriebene Resistenztestung mit mechanischer Inokulation vom PPV-NAT wurde durchgeführt (siehe 3.1.2). Es wurden 15 Pflanzen jeder T₁-Linie bezüglich ihrer Resistenz gegenüber dem PPV-NAT geprüft. Zeigte die Mehrzahl der untersuchten Pflanzen der jeweiligen Linie kein eindeutiges Resistenzverhalten, wurden weitere 15 Pflanzen zur Resistenztestung herangezogen.

Die Ergebnisse sind in den Tab. 6 bis Tab. 12 nach Konstrukten gegliedert dargestellt. Bei der Resistenztestung wurden drei Reaktionen unterschieden. Anfällige Pflanzen wurden, wie untransformierte *N. benthamiana* mit dem PPV unter Ausbildung von normalen Symptomen, infiziert. Infektionsresistente Pflanzen konnten nicht mit dem PPV über mechanische Inokulation infiziert werden. Recovery-resistente Pflanzen wurden wie untransformierte *N. benthamiana* mit dem PPV infiziert, ein bis zwei Wochen nach dem Auftreten der ersten Symptome erschienen die Virussymptome jedoch schwächer und der Neuaustrieb war symptomfrei. Bei allen Resistenztests konnten parallel inokulierte nichttransgene Kontrollpflanzen zu 100% infiziert werden. Zur Benennung der einzelnen transgenen regenerierten Pflanzen und der transgenen Linien der T₁- und T₂-Generation wurde folgende Nomenklatur gewählt: Die erste Zahl gibt die Bezeichnung des Agrobakterienklones wieder. Die zweite Zahl stellt die Nummer der regenerierten Pflanze dar, also die Pflanze, aus der die Samen der T₁-Generation gewonnen wurden. Die dritte Zahl ist die Nummer der Pflanze aus der PPV-Resistenztestung, die zur Erzeugung der Samen der T₂-Generation verwendet wurde.

Tab. 6: Ergebnisse der Resistenztestung der T₁-Generation des Konstruktes pLX-CP-N

Nr. regenerierte Pflanze	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
210.5.	15	7	0	8
210.10.	30	5	0	25
210.12.	15	0	2	13
210.14.	30	10	0	20
210.15.	15	11	0	4
210.16.	15	1	0	14
210.17.	15	4	0	11
210.28.	30	4	0	24

Tab. 7: Ergebnisse der Resistenztestung der T₁-Generation des Konstruktes pLX-CP-RQ

Nr. regenerierte Pflanze	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
207.5.	15	1	0	14
207.8.	30	6	3	21
207.14.	15	0	3	12
207.16.	30	6	0	24

Tab. 8: Ergebnisse der Resistenztestung der T₁-Generation des Konstruktes pLX-CP-RQ-D

Nr. regenerierte Pflanze	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
219.7.	15	8	0	7
219.8.	15	4	0	11
219.12.	15	0	3	12
219.15.	15	0	3	12

Tab. 9: Ergebnisse der Resistenztestung der T₁-Generation des Konstruktes pLX-CP-RQ-D

Nr. regenerierte Pflanze	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
221.5.	15	6	1	8
221.11.	15	0	2	13
221.12.	15	9	0	6
221.16.	30	3	1	26
221.19.	15	0	3	12
221.22.	30	4	0	26

Tab. 10: Ergebnisse der Resistenztestung der T₁-Generation des Konstruktes pLX-HC-K

Nr. regenerierte Pflanze	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
224.5.	15	0	3	12
224.7.	15	1	3	11
224.11.	15	1	0	14
224.16.	15	0	2	13
224.21.	15	1	0	14
224.24.	15	2	0	13
224.25.	15	1	0	14
224.28.	15	3	0	12

Tab. 11: Ergebnisse der Resistenztestung der T₁-Generation des Konstruktes pLX-HC-KP

Nr. regenerierte Pflanze	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
227.7.	15	0	3	12
227.10.	15	0	3	12
227.14.	15	6	2	7
227.17.	15	0	1	14
227.20.	15	3	0	12

Tab. 11: Ergebnisse der Resistenztestung der T₁-Generation des Konstruktes pLX-HC-KP (Fortsetzung)

Nr. regenerierte Pflanze	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
227.21.	15	2	1	12
227.33.	15	3	0	12
227.35.	15	0	6	9
227.37.	15	3	0	12

Tab. 12: Ergebnisse der Resistenztestung der T₁-Generation des Konstruktes pLX-HC-P

Nr. regenerierte Pflanze	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
230.6.	15	1	0	14
230.7.	15	4	0	11
230.12.	15	1	0	14
230.20.	15	3	1	11
230.22.	15	7	0	8
230.25.	15	2	0	13
230.26.	15	1	0	14
230.28.	15	0	3	12
230.30.	15	1	2	12
230.34.	15	1	0	14

Alle Infektions- beziehungsweise Recovery-resistenten Pflanzen wurden bis zur Samenreife im Gewächshaus kultiviert und hieraus Samen der T₂-Generation gewonnen. 15 oder 16 Pflanzen der T₂-Generation wurden zu einem Resistenztest gegenüber dem PPV herangezogen. Einzelne Linien, bei denen die Mehrzahl der untersuchten Pflanzen ein eindeutiges Resistenzverhalten aufwies, konnten selektiert und ein Test auf Homozygotie durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Resistenztestung sind in den Tab. 13-19 dargestellt. Die im anschließenden Homozygotie-Test positiven Linien sind fett gedruckt (siehe 4.1.6). Zum Vergleich wurden bei jedem Resistenztest 15 nichttransgene *N. benthamiana* Pflanzen und 15

transgene Pflanzen der Linie 17.27.4 gleichzeitig zur Kontrolle inokuliert. Dabei konnten beide Kontrollen immer zu 100 % infiziert werden. Alle Pflanzen der Linie 17.27.4 zeigten das unter 2.4 beschriebene Phänomen der Recovery-Resistenz.

Tab. 13: Ergebnisse der Resistenztestung der T₂-Generation des Konstruktes pLX-CP-RQ.

Nr. T ₂ -Linie	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
207.5.14.	16	2	14	0
207.8.1.	16	2	14	0
207.8.4.	15	3	12	0
207.8.5.	16	11	0	5
207.14.1.	16	2	14	0
207.14.2.	15	0	15	0
207.16.1.	16	16	0	0
207.16.2.	16	16	0	0

Fett gedruckte Linien: Homozygotie-Test positiv.

Tab. 14: Ergebnisse der Resistenztestung der T₂-Generation des Konstruktes pLX-CP-N.

Nr. T ₂ -Linie	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
210.5.2.	16	14	0	2
210.10.2.	16	15	1	0
210.12.1.	16	5	11	0
210.14.2.	16	0	0	16
210.15.2.	16	15	1	0
210.15.1.	16	11	0	5
210.17.1.	16	1	0	15
210.28.2.	16	1	15	0

Fett gedruckte Linien: Homozygotie-Test positiv.

Tab. 15: Ergebnisse der Resistenztestung der T₂-Generation des Konstruktes pLX-CP-RQ-D.

Nr. T ₂ -Linie	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
219.7.2.	16	7	0	9
219.7.5.	16	10	6	0
219.7.7.	16	0	3	13
219.7.9.	16	0	3	13
219.7.11.	16	2	0	14
219.8.6.	15	10	5	0
219.8.1.	16	9	0	7
219.8.2.	15	9	0	6
219.12.1.	16	4	12	0
219.12.3.	16	0	16	0
219.12.4.	16	0	14	2
219.15.1.	16	1	15	0
219.15.3.	16	2	14	0
219.15.4.	16	0	13	3

Fett gedruckte Linien: Homozygotie-Test positiv.

Tab. 16: Ergebnisse der Resistenztestung der T₂-Generation des Konstruktes pLX-CP-RQ-D.

Nr. T ₂ -Linie	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
221.5.2.	16	12	0	4
221.5.7.	16	14	0	2
221.11.2.	16	3	13	0
221.11.4.	16	0	0	16
221.12.1.	15	15	0	0
221.16.2.	16	12	4	0
221.19.1.	16	0	11	5
221.22.25	16	14	2	0

Fett gedruckte Linien: Homozygotie-Test positiv.

Tab. 17: Ergebnisse der Resistenztestung der T₂-Generation des Konstruktes pLX-HC-K.

Nr. T ₂ -Linie	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
224.5.6.	16	3	7	5
224.7.4.	16	2	14	0
224.11.9.	16	0	0	16
224.16.4.	15	0	11	4
224.21.9.	16	0	16	0
224.24.3.	16	6	10	0
224.25.9.	16	2	0	14
224.28.9.	14	5	0	9
224.5.10.	16	0	16	0
224.5.14.	16	1	15	0
224.7.6.	16	0	16	0
224.28.12.	16	0	16	0
224.28.15.	16	0	0	16

Tab. 18: Ergebnisse der Resistenztestung der T₂-Generation des Konstruktes pLX-HC-K-P.

Nr. T ₂ -Linie	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
227.7.6.	16	2	0	14
227.7.8.	16	0	0	16
227.7.11.	16	0	6	10
227.10.2.	16	3	0	13
227.14.1.	16	8	2	6
227.14.9.	16	11	0	5
227.14.11.	16	8	0	8

Fett gedruckte Linien: Homozygotie-Test positiv.

Tab. 18: Ergebnisse der Resistenztestung der T₂-Generation des Konstruktes pLX-HC-K-P (Fortsetzung).

Nr. T ₂ -Linie	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
227.17.2.	16	16	0	0
227.20.7.	15	4	0	11
227.21.13.	16	4	0	12
227.33.8.	16	0	16	0
227.35.6.	15	0	15	0

Fett gedruckte Linien: Homozygotie-Test positiv

Tab. 19: Ergebnisse der Resistenztestung der T₂-Generation des Konstruktes pLX-HC-P.

Nr. T ₂ -Linie	Anzahl Pflanzen getestet	Anzahl Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl Pflanzen nicht resistent
230.6.3.	16	4	12	0
230.7.5.	16	9	7	0
230.12.3.	16	15	0	1
230.20.6.	16	1	15	0
230.22.2.	16	11	5	0
230.22.5.	15	12	3	0
230.22.6.	15	11	4	0
230.25.6.	16	2	14	0
230.26.12.	16	0	8	8
230.28.4.	16	6	10	0
230.28.11.	16	0	16	0
230.28.8.	16	4	11	0

Fett gedruckte Linien: Homozygotie-Test positiv.

4.1.6 Homozygotie-Testung und Zusammenhang der Resistenzreaktion der T₁- und T₂-Generation

Mit den Pflanzen der Linien der T₂-Generation, die ein einheitliches Resistenzverhalten zeigten, wurde eine Keimungstest auf Homozygotie durchgeführt (siehe 3.2.1.11). Die Ergebnisse sind in den Tab. 13 bis 19 als fett gedruckte Linien dargestellt. Die Linien 207.8.4., 210.12.1., 219.7.5., 219.8.6., 221.11.2., 221.16.2., 224.16.4., 224.24.3., 230.6.3., 230.22.5. und 230.22.6. zeigten im Resistenztest keine eindeutig homogene Reaktion, waren aber doch im Homozygotie-Test positiv. Dies wird ebenfalls in Tab. 20 deutlich. Um weiterhin zu überprüfen, ob von der Resistenzreaktion der jeweils verwendeten Samenträgerpflanze der T₁-Generation auf die Resistenzreaktion der daraus erzeugten homozygoten Linie der T₂-Generation geschlossen werden kann, wurden die entsprechenden Daten in Tab. 20 gegenübergestellt.

Tab. 20: Gegenüberstellung der Resistenzreaktion der T₁-Samenträger und daraus erzeugten T₂-Pflanzen

Bezeichnung T ₁ -Samenträger	Resistenzreaktion des T ₁ -Samenträgers	Anzahl T ₂ -Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl T ₂ -Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl T ₂ -Pflanzen nicht resistent
207.8.4.	Recovery	3	12	0
207.14.2.	Recovery	0	15	0
207.16.1.	Immun	16	0	0
219.7.5.	Immun	10	6	0
219.8.6.	Immun	10	5	0
221.11.2.	Recovery	3	13	0
221.12.1.	Immun	15	0	0
221.16.2.	Immun	12	4	0
210.10.2.	Immun	15	1	0
210.12.1.	Recovery	5	11	0
224.16.4.	Recovery	0	11	4
224.21.9.	Immun	0	16	0
224.24.3.	Immun	6	10	0

Tab. 20: Gegenüberstellung der Resistenzreaktion der T₁-Samenträger und daraus erzeugten T₂-Pflanzen (Fortsetzung)

Bezeichnung T ₁ -Samenträger	Resistenzreaktion des T ₁ -Samenträgers	Anzahl T ₂ -Pflanzen Infektions-resistent	Anzahl T ₂ -Pflanzen Recovery-resistent	Anzahl T ₂ -Pflanzen nicht resistent
224.28.12.	Immun	0	16	0
227.17.2.	Recovery	16	0	0
227.35.6.	Recovery	0	15	0
230.6.3.	Immun	4	12	0
230.20.6.	Immun	1	15	0
230.22.5.	Immun	12	3	0
230.22.6.	Immun	11	4	0
230.25.6.	Immun	2	14	0
230.28.11.	Recovery	0	16	0

Die Gegenüberstellung der Resistenzreaktionen zeigen eindeutig, daß bei jeder CP-transgenen Linie (Konstrukt 210-221) die Mehrzahl der untersuchten Pflanzen die gleiche Resistenzreaktion zeigt, wie die Pflanze der T₁-Generation, aus der die Samen dieser Pflanzen erzeugt wurden. Der umgekehrte Fall trat nicht auf. Bei den Pflanzen der T₂-Generation, die mit den verschiedenen HCpro-Genen transformiert wurden und homozygot sind, ist dieser Zusammenhang so nicht zu beobachten (Konstrukt 224-230). Neben der gleichen Resistenzreaktion von T₁-Samenträger und homozygoten T₂-Nachkommen konnte auch der umgekehrte Fall nachgewiesen werden. Auch wenn die Samenträgerpflanze der T₁-Generation eine Recovery-Resistenzreaktion aufwies, konnten die Nachkommen ein Infektionsresistenz zeigen (227.17.2.) und umgekehrt (230.20.6.). Im Fall der HCpro Linien konnte also kein eindeutiger Zusammenhang der Resistenzreaktion zwischen T₁- und T₂-Generation hergestellt werden.

4.2 Charakterisierung der transgenen Linien der T₂-Generation

Die neu erzeugten transgenen homozygoten PPV-resistenten *N. benthamiana* Linien mit modifizierten CP- und HCpro-Genen wurden charakterisiert und mit den Eigenschaften der bereits vorhandenen, mit unmodifiziertem PPV-CP transformierten,

N. benthamiana verglichen (17.27.4. (Timpe *et al.*, 1992), 4.30.45. und 4.30.60. (Korte *et al.*, 1995) (siehe 2.4).

Ein Teil der Charakterisierung umfaßte die Bestimmung der Anzahl transgener Insertionen im Pflanzengenom. Mit dem Ergebnis sollte ein unter Umständen bestehender Zusammenhang zwischen Kopienzahl und Resistenzreaktion feststellbar sein. Weiterhin wurde das Vorhandensein des transgenen Proteins in den einzelnen homozygoten Linien überprüft, um zwei Fragestellungen untersuchen zu können. Im Falle der CP-Transgenen mußten Linien für die Untersuchungen zur Heterologen Enkapsidierung selektiert werden die das transgene CP exprimieren. Weiterhin sollte ein Zusammenhang zwischen der Expression der transgenen Proteine und der aufgetretenen Resistenzreaktion untersucht werden. Um einen Vergleich mit den bereits vorhandenen transgenen Linien vornehmen zu können, sollten diese ebenfalls bezüglich der verschiedenen Eigenschaften charakterisiert werden.

4.2.1 Bestimmung der Anzahl transgener Insertionen

Die Kopienzahl des Transgens erfolgte, wie unter 3.2.2. beschrieben, mittels Hybridisierung nach Southern-Transfer von genomischer Pflanzen-DNA. Die Bestimmung der Kopienzahl sollte mit einer einzigen Sonde für alle vorhandenen und neu erzeugten Linien durchgeführt werden. Daher konnte nur der Teil der pflanzlichen Expressionskassette benutzt werden, der in allen verschiedenen Konstrukten vorhanden war. Als Sonde zur Detektion der Anzahl transgener Insertionen wurde daher das *KpnI/EcoRV* 658 Bp Fragment des 2x35S Promotors gewählt. Zu diesem Zweck wurde das Fragment mit den Enzymen *KpnI/EcoRV* in das Plasmid pBluescriptII SKM *KpnI/EcoRV* umkloniert, um mittels T3- und T7-Primersequenzen, die die MCS des Vektors direkt flankieren, in der PCR amplifiziert werden zu können (siehe 8.2). Die erfolgreiche Umklonierung wurde durch den Restriktionsverdau der Minipräparationen der rekombinanten Plasmide bestätigt. Das hergestellte Sondenplasmid wurde, wie unter 3.2.2.4 angegeben, für den Einbau von DIG-11-UTP als Template in der PCR eingesetzt. Der Einbau wurde über die Standard Gelelektrophorese neben einem Kontroll-PCR-Fragment, welches ohne DIG-11-UTP erzeugt wurde, überprüft.

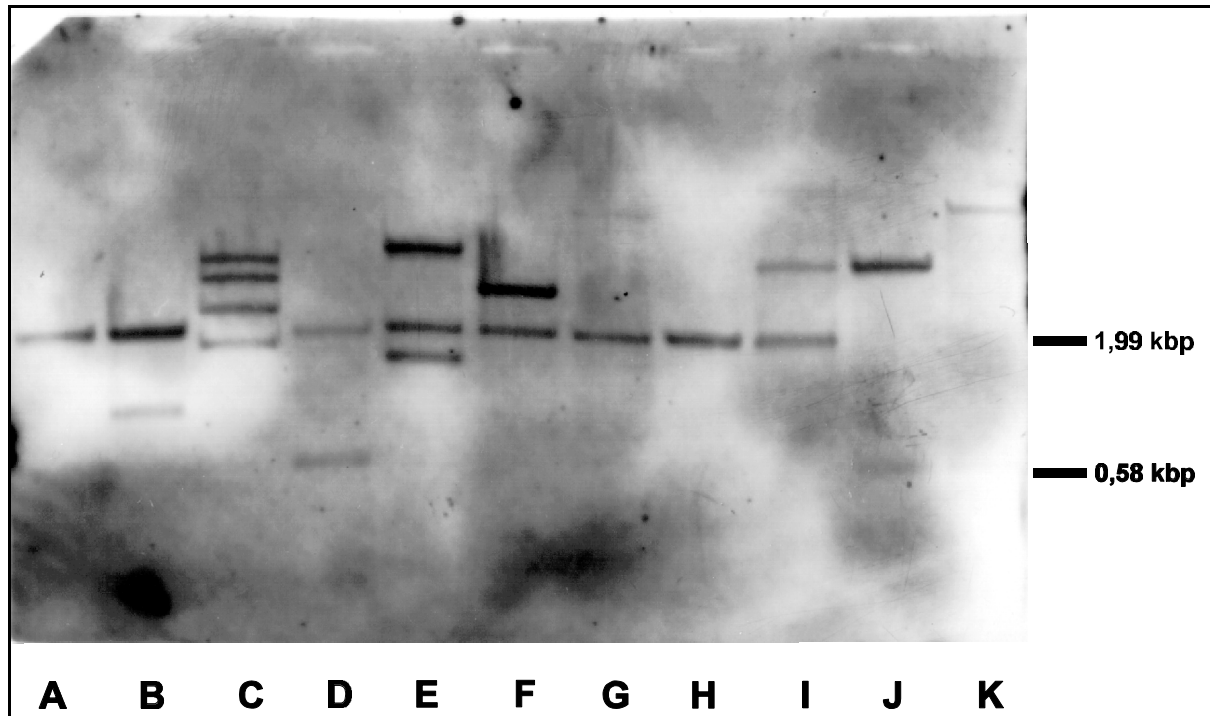


Abb. 9: Autoradiogramm einer Southern-Hybridisierung zum Nachweis transgener Insertionen.

A: 221.12.1., B: 219.7.5., C: 210.10.2., D: 230.22.6., E: 221.16.2., F: 221.11.2., G: 207.8.4., H: 207.16.4., I: 207.14.2., J: 224.21.9., K: 227.17.2.

Aus Blattmaterial aller homozygoten Linien der T_2 -Generation, der Linien 17.27.4., 4.30.45., 4.30.60. sowie nichtransgenen *N. benthamiana* Pflanzen, wurde wie unter 3.2.2.2 angegeben genomische DNA hergestellt. Diese wurde nach Restriktionsverdau, Gelelektrophorese und Southern-Transfer zur Hybridisierung eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 21 dargestellt. Die Größe der Banden der genomischen DNA der unterschiedlichen CP- und HCpro-transgenen Linien, die nach der Hybridisierung nachgewiesen werden konnten entsprachen den erwarteten Fragmenten wie in Kapitel 3.2.2 in Abb. 2 dargestellt. Anhand der zusätzlichen nachweisbaren Banden variabler Größe konnte die Anzahl transgener Insertionen nachgewiesen werden. Es wurden in den verschiedenen transgenen homozygoten Linien zwischen einer und vier Insertionen nachgewiesen. Die Kopienzahl der T_2 -Linie 210.10.2., des CP-N Konstruktes, konnte auch nach mehrmaligen Hybridisierungsversuchen nicht bestimmt werden, da mehrfach das gleiche Bandenmuster auf dem Autoradiogramm bestimmt wurde. Dieses ermöglichte keine Zuordnung zu Restriktionsfragmenten der genomischen DNA (siehe Abb. 9). Das

Beispiel eines Autoradiogramms einer Southern-Hybridisierung ist in Abb. 9 dargestellt.

4.2.2 Bestimmung der transgenen Proteinexpression

Die Bestimmung der transgenen Proteinexpression erfolgte aus Gesamtproteinextrakten aus transgenem Blattmaterial der einzelnen neuerzeugten homozygoten T₂-Linien und den Linien 17.27.4., 4.30.45. und 4.30.60., wie unter 3.3.3 bis 3.3.7 beschrieben. Als Positivkontrollen wurden Gesamtproteinextrakte aus mit PPV infizierten *N. benthamiana* Pflanzen verwendet. Die Ergebnisse der einzelnen Immunnachweise sind in Tab. 21 zusammengefaßt.

Tab. 21: Ergebnisse der Kopienzahlbestimmung, Proteinexpressionsbestimmung von transgenem CP und HCpro und Resistenzreaktion in homozygoten Linien der T₂-Generation

Konstrukt	T ₂ -Linie	Anzahl transgener Insertionen	Protein-expression	Resistenzreaktion		
CP-AT	17.27.4.	1	+	-	15x R	-
CP-NAT	4.30.45.	1	+	5x I	25x R	5x +
CP-NAT	4.30.60.	1	-	32x I	3x R	-
CP-N	210.12.1.	2	+	5x I	11x R	-
	210.10.2.	?	-	15x I	-	-
CP-RQ	207.8.4.	1	-	3x I	12x R	-
	207.14.2.	2	+	-	15x R	-
	207.16.1.	1	-	15x I	1x R	-
CP-D	221.11.2.	1	+	3x I	13x R	-
	221.12.1.	1	-	15x I	-	-
	221.16.2.	2	+	12x I	4x R	-
CP-RQ-D	219.7.5	1	-	10x I	6x R	-
	219.8.6.	1	+	14x I	1x R	-

I: Infektions-resistent, R: Recovery-resistent, +: Expression nachgewiesen, -: keine Expression nachweisbar

Tab. 21a: Ergebnisse der Kopienzahlbestimmung, Proteinexpressionsbestimmung von transgenem CP und HCpro und Resistenzreaktion in homozygoten Linien der T₂-Generation

Konstrukt	T ₂ -Linie	Anzahl transgener Insertionen	Protein-expression	Resistenzreaktion		
HC-K	224.16.4.	2	+	-	11x R	4x +
	224.21.9.	1	+	-	15x R	-
	224.24.3.	4	-	5x I	10x R	-
	224.28.12.	3	-	-	15x R	-
HC-P	227.17.2.	1	-	14x I	2x R	-
	227.35.6.	1	+	-	15x R	-
HC-KP	230.20.6.	1	+	1x I	14x R	-
	230.28.11.	3	+	-	15x R	-
	230.25.6.	1	+	2x I	13x R	-
	230.22.5.	1	-	12x I	3x R	-
	230.22.6.	1	-	15x I	-	-

I: Infektions-resistent, R: Recovery-resistent, +: Expression nachgewiesen, -: keine Expression nachweisbar

4.2.3 Untersuchung des Resistenzmechanismus

In der Einleitung wurden die Mechanismen, die der Pathogen-vermittelten Resistenz zugrundeliegen können, vorgestellt. English *et al.* (1996) verwendeten transgene *N. benthamiana* Pflanzen, die mit dem *gus*-Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors transformiert waren. Diese Pflanzen zeigten ein posttranskriptionales "gene-silencing" des *gus*-Gens. Wurden die transgenen Pflanzen mit einem chimären PVX-Klon infiziert, in den das *gus*-Gen unter Kontrolle des subgenomischen CP-Promotors zwischen dem "triple gene block" (TGB) und dem CP-Gen eingefügt worden war (pPVX201-*gus*), so waren diese Pflanzen gegenüber diesem Virus resistent. Die virale RNA unterlag, wie die transgene RNA des *gus*-Gens, einem Degradationsmechanismus. Es fand ein sequenzspezifischer Abbau des transgenen Transkripts und der Virus-RNA statt. Gegenüber dem unmodifiziertem PVX, ohne die Sequenz des *gus*-Gens, bestand die Resistenz jedoch nicht.

Um die neu hergestellten transgenen Linien bezüglich des Resistenzmechanismus zu untersuchen, sollte ein äquivalentes PVX-Konstrukt hergestellt werden. In das Genom des PVX sollte anstelle des *gus*-Gens das vollständige CP- bzw. HCpro-Gen des PPV eingefügt werden. Diese beiden chimären PVX-Konstrukte sollten zur Infektion der

verschiedenen neu erzeugten transgenen CP- und HC-Linien verwendet werden. Basierte der Resistenzmechanismus auf dem Vorhandensein des viralen Proteins, so sollte eine Infektion mit dem chimären pPVX möglich sein, da der Resistenzmechanismus nicht gegen dieses Virus gerichtet ist. Beruht die Resistenz jedoch, wie vorgeschlagen (s.o.), auf einem RNA-Degradationsmechanismus so sollte die jeweilige transgene Linie auch gegen das entsprechende chimäre pPVX resistent sein.

Zur Herstellung von pPVX201-CP-NAT und -HCpro wurde folgende Klonierungsstrategie durchgeführt:

Um den vollständigen CP- und HCpro-Leserahmen aus pe35SL-NAT-CP und pe35SL3-HCpro umklonieren zu können, wurden die Ausgangsplasmide mit den Enzymen *NcoI/PstI* verdaut. Für die Klonierung in pPVX201 (siehe 8.2) standen nur die Restriktionsschnittstellen *ClaI/SalI* zur Verfügung. Zum Zweck der Erzeugung von flankierenden *ClaI/SalI*- Restriktions-Schnittstellen, 5' und 3' vom jeweiligen Gen, wurde die MCS aus pLITMUS28 mit den Enzymen *SacI/NsiI* in pT7T319U *SacI/PstI* umkloniert (Produkt: p19U-LIT). In p19U-LIT konnten das CP- und HCpro-Gen aus den Pflanzenexpressionsvektoren mit den Enzymen *NcoI/PstI* kloniert werden. Aus diesem Zwischenkonstrukt p19U-LIT-CP bzw. -HC konnte ein *ClaI/XhoI*-Fragment in pPVX-201 *ClaI/SalI* umkloniert werden. Aufgrund einer internen *XhoI*-Schnittstelle im Gen der HCpro, mußte beim letzten Klonierungsschritt ein unvollständiger Verdau durchgeführt werden. Von den Konstrukten pPVX-CP-PPV-NAT und pPVX-HCpro wurde Plasmidmaterial in größeren Mengen hergestellt und für Infektiositätstestungen eingesetzt.

Zuerst wurde mittels Partikelbombardment auf jeweils fünf nichttransgene *N. benthamiana* die Infektiosität der beiden neuerzeugten chimären pPVX überprüft. Bei diesen Versuchen konnten mit beiden Konstrukten, wie mit parallel inokulierten unmodifiziertem pPVX durchgeführt, alle fünf Pflanzen systemisch infiziert werden. Werden virale Sequenzen unter der Kontrolle des subgenomischen CP-Promotors in pPVX eingefügt, sind diese chimären Viren nach der Infektion von Pflanzen relativ instabil. Vor allem zusätzlich eingefügte große Sequenzen werden über Rekombination relativ schnell nach Inokulation wieder aus dem PVX-Genom entfernt (Prof. Dr. E. Maiß, persönliche Mitteilung). Um dieses Phänomen mit den neu erzeugten chimären PVX-Klonen zu untersuchen und eventuell auftretende Rekombinationen nachzuweisen, wurde aus den, mit dem pPVX-CP bzw. -HC infizierten,

N. benthamiana Pflanzen Gesamt-RNA präpariert und mit zwei spezifischen Primern (PVX-UP, PVX-LOW, siehe Anhang 8.2.12) der Bereich der Insertion in einer RT/PCR amplifiziert. Die Primer sind homolog zu den Sequenzen im TGB und CP-Gen des PVX und ermöglichen den direkten Nachweis der Größe des in den PVX-Klon inserierten Fragmentes. Die Kontrollgele der PCR zeigten durchgehend ein Auftreten von zusätzlichen Banden von geringerer Größe als erwartet. Dies ließ auf aufgetretene Deletionen im inserierten Bereich schließen. Mit der Information, daß auftretende Rekombinante unter Umständen das Versuchsergebnis verfälschen könnten, wurden unterschiedliche CP und HCpro-Linien der T₂-Generation ausgewählt, um einen Zusammenhang zwischen der Expression und dem Resistenz-mechanismus herstellen zu können. Die in Tab. 22 dargestellten Linien wurden ausgewählt und jeweils fünf Pflanzen mit dem entsprechenden PVX-Konstrukt, neben nichttransgenen Pflanzen, bombardiert. Auch die transgenen Linien 4.30.45, 4.30.60 und 17.27.4. wurden zur Untersuchung eingesetzt. Die beschossenen Pflanzen wurden über einen Zeitraum von drei Wochen bezüglich des Auftretens von PVX-Symptomen visuell bonitiert. Nachdem schon im ersten Versuch deutlich wurde, daß in infektionsresistenten Linien eine gewisse Schutzwirkung gegenüber dem chimären PVX zu beobachten war, die Anzahl der nichtinfizierten Pflanzen jedoch deutlich geringer war, als bei Infektion mit PPV, wurde angenommen, daß ein Teil der Viren die PPV-Sequenz über Rekombination entfernt hatte (Tab. 22, vergleiche auch Tab. 21). Dies wurde vor allem in den als Recovery-resistent eingestuften Linien vermutet, da das chimäre PVX sich in diesen Pflanzen vor Einsetzen des Resistenzmechanismus replizieren konnte. Um einen möglichen Effekt besser beurteilen zu können, wurde bei der Wiederholung des Versuches die Anzahl der zu untersuchenden Linien auf jeweils eine eindeutig Recovery- bzw. eine Infektions-resistente Linie der neu erzeugten CP-Linien beschränkt. Die Pflanzenzahl wurde erhöht und 15 statt 5 Pflanzen von jeder Linie inokuliert. Auch diese Ergebnisse sind in Tab. 23 dargestellt. Auch die Ergebnisse des zweiten Infektionsversuches korrelieren nicht eindeutig mit dem Resistenzverhalten gegenüber dem PPV, zeigen aber den gleichen Trend. Transgene Pflanzen der Linien, die gegenüber PPV-NAT eine Immunität besitzen, konnten mit dem entsprechenden chimären PVX-Konstrukt zumindest teilweise infiziert werden. Die Infektionsrate war jedoch deutlich geringer, als bei den Linien, die gegenüber dem PPV als eindeutig Recovery-resistent eingestuft worden waren. Eine Recovery-Resistenz gegenüber dem

chimären pPVX konnte nicht beobachtet werden.

Tab. 23: Ergebnisse des Partikelbombardments zur Bestimmung der Resistenzreaktion neben Eigenschaften der unterschiedlichen Linien.

Linie T ₂ -Generation	Resistenz z PPV	Kopien- zahl	Expression	Resistenz pPVX-CP, -HC* 1. Versuch	Resistenz pPVX-CP, -HC* 2. Versuch
<i>N. benthamiana</i>	-	-	-	5/5 (-CP)	14/15
<i>N. benthamiana</i>	-	-	-	5/5 (-HC)	n.u.
CP-AT 17.27.4.	R	1	+	3/5	12/15
CP-NAT 4.30.45.	R	1	+	4/5	7/15
CP-NAT 4.30.60.	I	1	-	1/5	2/15
CP-D 221.12.1.	I	1	-	1/5	3/15
CP-RQ 207.14.2.	R	2	+	5/5	14/15
CP-D 221.16.2.	I	2	+	2/5	n.u.
CP-D 221.11.2.	R	1	+	5/5	n.u.
HC-K 224.21.9.	R	1	+	3/5	n.u.
HC-P 230.22.6.	I	1	-	1/5	n.u.

R: Recovery-Resistenz, I: Infektions-Resistenz, *: Anzahl infiziert/Anzahl inokuliert, n.u.: nicht untersucht

4.3 Versuche zur Heterologen Enkapsidierung

Die neu erzeugten CP-transgenen homozygoten T₂-Linien wurden bezüglich Heterologer Enkapsidierung überprüft. Die Linien, die für eine Untersuchung geeignet waren, mußten das transgene mutierte PPV-CP exprimieren. Wie in Arbeiten von Maiss (1995) gezeigt, konnte in transgenen *N. benthamiana*, die mit dem CP-Gen des PPV transformiert wurden, keine Resistenz gegenüber fremden Viren beobachtet werden. Als Positivkontrolle für die Heterologe Enkapsidierung standen die T₂-Linien 17.27.4. (CP-AT) und 4.30.45. (CP-NAT), die beide ein funktionelles CP des PPV exprimieren, zur Verfügung. Für die Linie 17.27.4. konnte eine Heterologe Enkapsidierung mit nahe verwandten Potyviren bereits in Arbeiten von Maiss (1995) gezeigt werden. Als Negativkontrolle dienten nichttransgene *N. benthamiana* Pflanzen.

Zwei nahe verwandte Vertreter des Genus Potyvirus (PVY und ChVMV), sowie das TMV (Genus Tobamovirus) und das PVX (Genus Potexvirus) wurden für die Inokulation ausgewählt. Für die letztgenannten Viren konnte bereits gezeigt werden, daß ein transgenes intaktes PPV-CP diese beiden Viren nicht heterolog enkapsidiert (siehe Einleitung). Aus diesem Grund wurde jeweils eine Pflanze der jeweiligen Linie mit dem PVX beziehungsweise dem TMV infiziert, um dieses Ergebnis auch mit den neu erzeugten transgenen Linien mit modifizierten CP-Genen zu überprüfen. In jeweils fünf Pflanzen der entsprechenden T₂-Linien wurde die Heterologe Enkapsidierung des PVY und des ChVMV überprüft.

Tab. 24: Anzahl der heterolog enkapsidierten TMV, PVX, ChVMV und PVY durch transgenes CP der verschiedenen transgenen *N. benthamiana* T₂-Linien.

Linien/Viren	TMV *	PVX*	ChVMV*					PVY-N*				
<i>N. benthamiana</i>	0	†81	34	33	61	75	64	3	3	0	27	18
CP-AT (17.27.4.)	2	20	152	184	186	191	192	200	194	185	198	195
CP-NAT (4.30.45.)	2	3	198	200	199	104	114	194	200	199	200	194
CP-Q (207.14.2.)	0	29	44	54	104	123	84	7	3	13	16	10
CP-N (210.12.1.)	1	†89	54	56	36	59	46	4	9	19	9	31
CP-QD (219.8.6.)	0	†82	15	41	39	61	47	7	3	12	11	44
CP-D (221.16.2.)	0	22	34	48	39	45	44	7	13	2	9	8
CP-D (221.11.2.)	n.u.	n.u.	50	47	61	60	41	19	14	13	11	2

Dekoration: IgG-anti-PPV-CP, (Antiserum 570), GaR-Gold 10 nm; *: Anzahl golddekorierter Partikel/200 gezählter Partikel; †: Präparate zeigten Partikel in Aggregationen, die starke Kreuzreaktionen des Serums aufwiesen.

Die Heterologe Enkapsidierung wurde in elektronenmikroskopischen Tropfpräparaten durch die Dekoration mit dem Antiserum gegen das PPV-CP (AS 570) mit anschließender Golddekoration (GaR-Gold 10 nm) überprüft (siehe 3.4.5). Der Stichprobenumfang aus jeder der fünf Pflanzen betrug jeweils 200 Partikel in einem Tropfpräparat. Zusätzlich wurde die Anzahl der auf der Virusoberfläche angelagerten Goldmarkierungen abgeschätzt. Für die Inokulation wurden jeweils sieben etwa acht Wochen alte Pflanzen der jeweiligen transgenen Linie verwendet. Ungefähr eine Woche nach dem Auftreten der ersten Virussymptome fanden die Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate und die Auszählung statt (Tab. 24).

Tab. 25: Statistische Auswertung der Zählergebnisse für die Heterologe Enkapsidierung von PVY und ChVMV in verschiedenen transgenen *N. benthamiana* T₂-Linien.

transgene <i>N. benthamiana</i> T ₂ -Linien	ChVMV Mittelwerte*(SD)	PVY-N Mittelwerte*(SD)
<i>N. benthamiana</i>	53,4 ^a (±18,9)	10,2 ^a (±11,73)
CP-AT (17.27.4.)	181,0 ^b (±16,55)	194,4 ^b (±5,77)
CP-NAT (4.30.45.)	163,0 ^b (±49,42)	197,4 ^b (±3,13)
CP-RQ (207.14.2.)	81,8 ^a (±33,15)	9,8 ^a (±5,07)
CP-N (210.12.1.)	50,2 ^a (±9,28)	14,4 ^a (±10,76)
CP-RQ-D (219.8.6.)	40,6 ^a (±16,7)	15,4 ^a (±16,38)
CP-D (221.11.2.)	51,8 ^a (±5,52)	11,8 ^a (±3,96)
CP-D (221.16.2.)	42,0 ^a (±8,58)	7,8 ^a (±6,22)

*: Anzahl golddekorierte Partikel/200 gezählter Partikel von fünf verschiedenen Pflanzen; b: signifikant verschieden von a (p = 0.0001)

Die Zählergebnisse der Behandlungen mit dem PVY und dem ChVMV wurden unter Nutzung von General Linear Models (GLM) statistisch ausgewertet (siehe 3.6). Der multiple Vergleich der Mittelwerte wurde mit dem Dunnett Test (SAS; 1996) errechnet (Tab. 25). Wie in Tab. 24 dargestellt, wurden das TMV und das PVX weder von funktionellem noch von mutiertem PPV-CP heterolog enkapsidiert. Bei einzelnen Präparaten des PVX zeigten Partikel in Aggregaten eine starke Kreuzreaktion des Serums. In den transgenen Linien 17.27.4. (CP-AT) und 4.30.45. (CP-NAT) wurden ChVMV und PVY-N zu fast 100 % heterolog enkapsidiert. Jedes der untersuchten Viruspartikel war mit ca. 10-15 Goldpartikeln dekoriert. In sämtlichen transgenen Linien, die das modifizierte PPV-CP exprimierten, wurden beide Potyviren im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant heterolog enkapsidiert (Tab. 25). Die nachgewiesene Dekoration bei den neu erzeugten transgenen *N. benthamiana* Pflanzen lag bei allen Linien im Bereich der Hintergrundreaktion bei nichttransgenen *N. benthamiana* (Negativkontrolle). Wenn eine Golddekoration nachzuweisen war, befanden sich auf der Virusoberfläche nur ca. ein bis drei Goldpartikel. Die gleiche Anzahl Goldpartikel wurde auch bei nichttransgenen *N. benthamiana* nachgewiesen. Um diese unterschiedlich starke Dekoration zu verdeutlichen, sind in Abb. 10 zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen von golddekorierten PVY Partikeln nach Dekoration mit AS 570 aus einer transgenen *N. benthamiana* Pflanze der Linie

17.27.4. (CP-AT) und aus einer Pflanze der Linie 219.8.6. (CP-RQ-D), dargestellt.

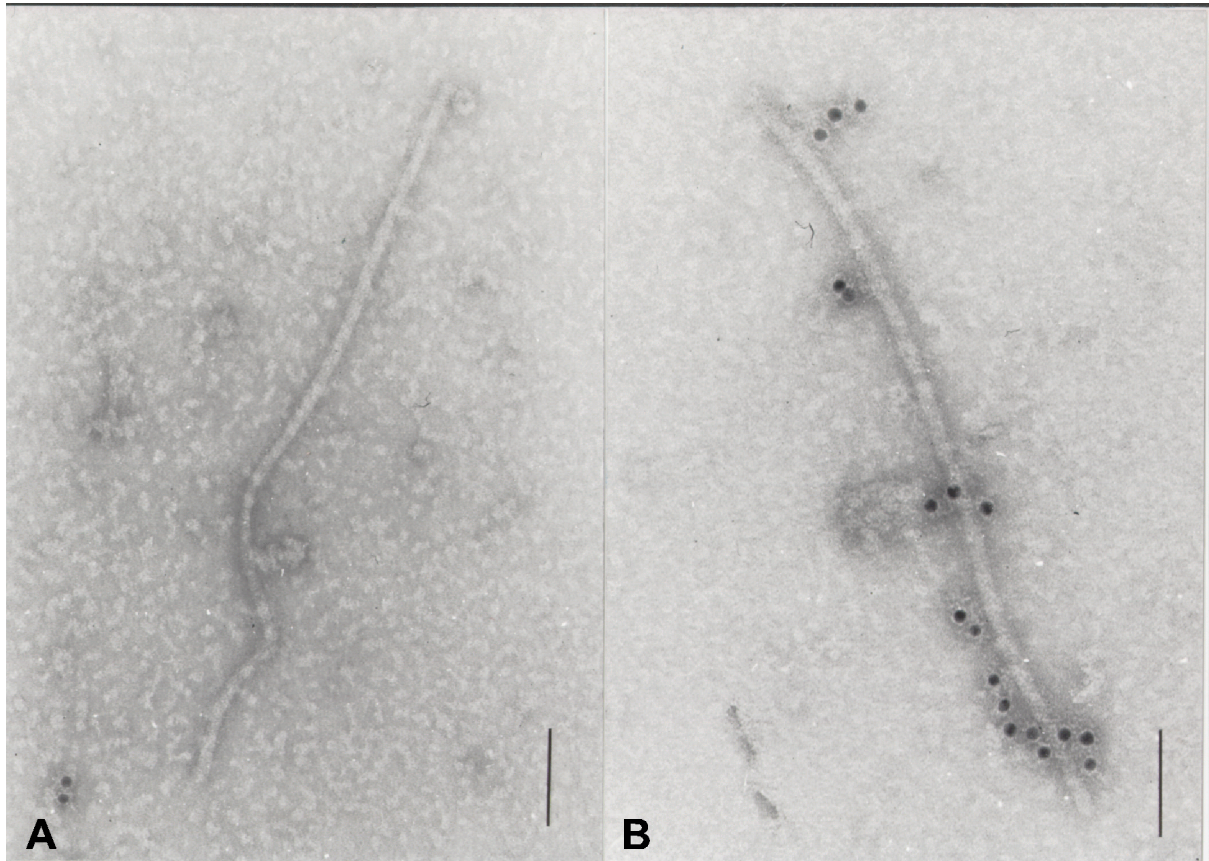


Abb. 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von heterolog enkapsidierten PVY-Partikeln in verschiedenen transgenen *N. benthamiana* Pflanzen A) 219.8.6 (CP-RQ-D); B) 17.27.4. (CP-AT). Der Balken entspricht 100 nm.

4.4 Herstellung von verschiedenen Mutanten des HCpro-Gens in p35PPV-NAT

Ziel der folgenden Untersuchungen war, zu überprüfen, ob die in den Blattlausübertragungsfunktionen mutierten HCpro-Gene, die für Pflanzentransformationsexperimente verwendet worden waren, noch eine Blattlausübertragung des PPV unterstützen. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen mutierten HCpro bezüglich ihres Einflusses auf die systemische Infektiosität von p35PPV-NAT überprüft. Um dies untersuchen zu können, wurde das unveränderte Gen der HCpro im "full-length" Klon gegen die verschiedenen mutierten HCpro-Gene (HC-KITC, -PTK, -KITC-PTK) ausgetauscht.

Aufgrund von fehlenden, einfach auftretenden Restriktionserkennungssequenzen, konnte nicht nur der kodierende Bereich der HCpro in p35PPV-NAT ausgetauscht werden (Pos. 4141-5515), der zur Pflanzentransformation verwendet wurde. Es mußte ein erheblich größeres Fragment des "full-length" Klonen ersetzt werden. Weiterhin konnte zum Austausch der unterschiedlich mutierten HCpro-Gene keine einheitliche Klonierungsstrategie durchgeführt werden.

Zuerst wurde eine Subklonierung eines *KpnI/NheI* (Pos. 3635/7060) Fragmentes, welches den Bereich des P1-Gens, des gesamten Gens der HCpro und einen Teil des P3-Gens beinhaltet, für weitere Austauschklonierungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pT7T3-19U vorbereitet, indem die Restriktionsschnittstelle *HindIII* mittels Klenow-Fragment aufgefüllt wurde und damit eine *NheI*-Schnittstelle generiert werden konnte. In diesen Vektor pT7T3-19U-*NheI* konnte das *KpnI/NheI* (Pos. 3635/7060) Fragment mit den Enzymen *KpnI/NheI* subkloniert werden. Dieses Plasmid pT7-KN-PPV diente zum Austausch der einzelnen Mutationen, bevor es in p35PPV-NAT zurückkloniert werden konnte. Die Einzelaustausche wurden nach unterschiedlichen Strategien durchgeführt.

Austausch von HC-K und HC-KP in p35PPV-NAT

In den Plasmiden pe35SL3-HC-K und -KP lagen keine Restriktionsschnittstellen zum direkten Austausch in pT7-KN-PPV vor. Aus diesem Grund wurde aus der Plasmid-DNA mit den Primern T3/HC-PCR1 (siehe 8.8.12) in pT7-KN-PPV ein PCR-Fragment erzeugt (siehe 8.8.15). Die *EcoRI*-Schnittstelle im Plasmid pe35SL3 wurde durch das Auffüllen mit dem Klenow-Fragment entfernt und anschließend das Gen der HC-K und HC-KP mit den Enzymen *NcoI/PstI* in pe35SL3-*EcoRI*-aufgef. kloniert. Das erzeugte PCR-Fragment konnte anschließend mit den Enzymen *KpnI/EcoRI* in diese beiden Plasmide kloniert werden. Damit war der mutierte Bereich in pe35SL3-HC-K und -KP bis zur *KpnI*-Schnittstelle 5'-verlängert (Produkte: pe35SL3-HC-K+ und HC-KP+). So konnte ein *KpnI/EspI*-Fragment aus diesen beiden Konstrukten in pT7-KN-PPV mit den Enzymen *KpnI/EspI* kloniert werden und der gesamte Bereich mit den Enzymen *KpnI/NheI* in p35PPV-NAT gegen den unveränderten Teil ausgetauscht werden.

Austausch von HC-P in p35PPV-NAT

Der Austausch von HC-P in p35PPV-NAT konnte, basierend auf pe35SL3-HC-P und pT7-KN-PPV, in zwei Klonierungsschritten erfolgen. Ein *AatII*/*EspI*-Fragment aus pe35SL3-HC-PTK konnte in pT7-KN-PPV kloniert und der gesamte Bereich mit den Enzymen *KpnI*/*NheI* in p35PPV-NAT gegen den unveränderten Teil ausgetauscht werden (Produkte: p35PPV-HC-K, HC-KP und HC-P).

Von diesen Klonen wurde Plasmidmaterial in größeren Mengen präpariert, um die Fähigkeit, systemische Infektionen in *N. benthamiana* zu erzeugen, mittels Partikelbombardment zu überprüfen.

4.4.1 Untersuchungen zur Infektiosität

Die p35PPV-NAT Klone mit den verschiedenen mutierten HCpro-Genen (p35PPV-HC-K, HC-KP und HC-P) waren nach Partikelbombardment in der Lage, *N. benthamiana* Pflanzen systemisch zu infizieren. Die Infektionsrate lag jedoch deutlich unter der des Wild-Typs p35PPV-NAT (siehe Tab. 26). Auch in mehrmaligen Versuchen zeigten nur zwischen 10 und 40 % der bombardierten Pflanzen eine systemische Infektion. Die Mutationen der HCpro hatten im Fall der Einzelmutation HC-K keinen Einfluß auf die Symptomausprägung. Die Symptome waren vom PPV-NAT Wild-Typ nicht zu unterscheiden. Die eingefügte Doppelmutation HC-KP erzeugte jedoch in *N. benthamiana* Pflanzen ein völlig verändertes Symptombild. Die Symptome begannen mit dem Auftreten von Lokalläsionen, gefolgt von Adernekrosen, die sich über das gesamte Blatt, bis in den Stengel ausbreiteten und schließlich zum teilweisen bis vollständigem Absterben der Pflanzen führten. Die Einzelmutation HC-P führte zu einem ähnlichen Symptombild wie die Doppelmutation HC-KP, jedoch mit allgemein schwächeren Symptomen, die den Wild-Typ Symptomen ähnlicher waren. Die Symptome der verschiedenen Mutanten auf *N. benthamiana* Pflanzen sind in Abb. 11 dargestellt.

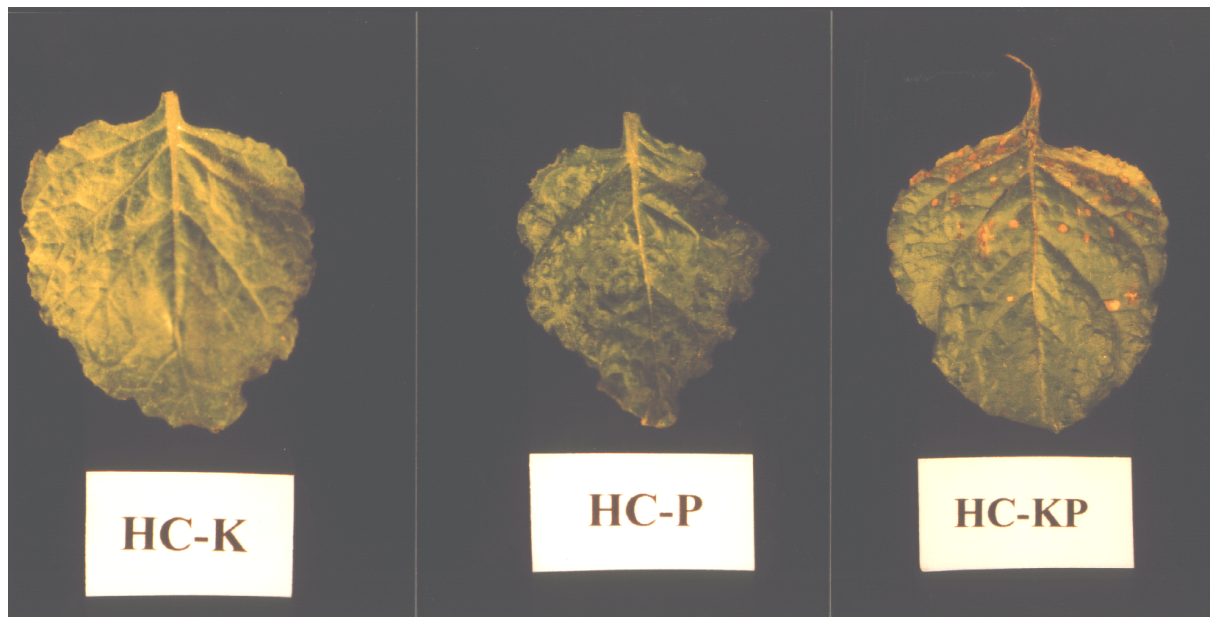


Abb. 11: Symptomausprägung der unterschiedlichen HCpro-Mutanten des p35PPV-NAT (HC-K, HC-P und HC-KP) in *N. benthamiana* Pflanzen

Um zu überprüfen, ob ausschließlich der ausgetauschte Bereich, der in diesem Fall jedoch weit über den kodierenden Bereich des HCpro-Gens hinausreichte (3425 Bp), für den beobachteten Effekt verantwortlich war, wurde das unveränderte *KpnI/NheI* Originalfragment des p35PPV-NAT mit den Enzymen *KpnI/NheI* in die einzelnen mutierten Klone ausgetauscht. Die drei Rücktauschklone wurden mittels Partikelbombardment auf ihre Infektiosität in *N. benthamiana* überprüft und zeigten alle die gleiche Infektionsrate wie Wildtyp p35PPV-NAT, wie auch wieder die normale Symptomausprägung [HC-K-Rücktausch 2/5, HC-P-Rücktausch 16/19, HC-KP-Rücktausch 14/20 (Anzahl Pflanzen infiziert/inokuliert)].

Die einzelnen Austauschklonierungen waren über mehrere Schritte, auch unter Verwendung der PCR, durchgeführt worden. Um sicher zu gehen, daß die einzelnen Mutationen in der jeweiligen mutierten HCpro noch so vorhanden waren, wie sie eingefügt worden waren, wurden Subklone der einzelnen p35PPV-HCpro-Mutanten sequenziert. Dabei sollte auch überprüft werden, ob nicht durch Polymerasefehler der Taq-Polymerase oder durch die Replikation in *E. coli* zusätzliche Nukleotidaustausche eingefügt worden waren, die zu Aminosäureaustauschen geführt haben. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt.

Tab. 26: Infektiosität von p35PPV-NAT HCpro-Mutanten in *N. benthamiana* Pflanzen

p35PPV-NAT HCpro-Mutanten	Partikelbombardment <i>N. benthamiana</i> *			
p35PPV-NAT Wildtyp	36/42			
p35PPV-HC-K	a: 1/10	b: 2/10	c: 0/10	d: 4/10
p35PPV-HC-P	a: 4/10	b: 2/10	c: 0/10	d: 3/10
p35PPV-HC-KP	a: 0/10	b: 0/9	c: 2/10	d: 1/5

*: Anzahl infiziert/Anzahl inokuliert, a, b, c und d: unabhängige Versuche

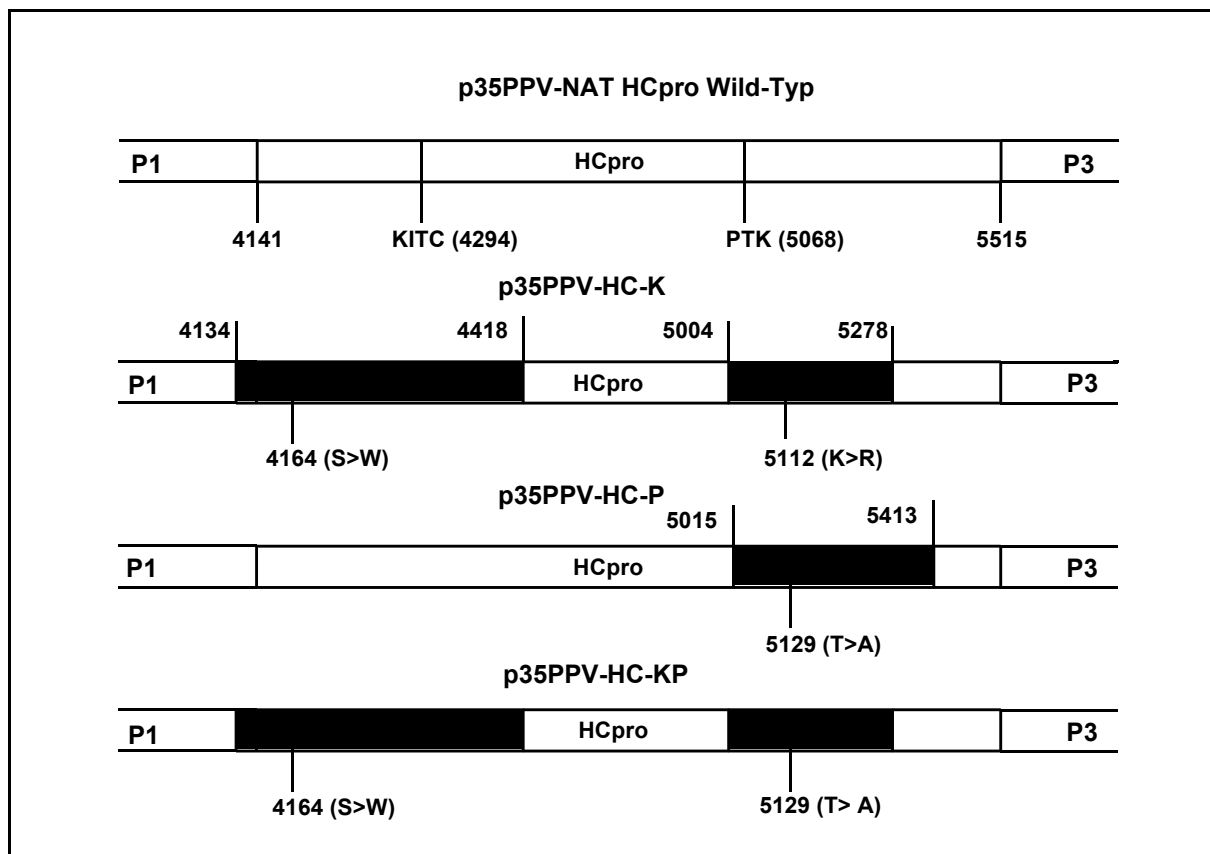


Abb. 12: Zusätzliche Aminosäureaustausche der sequenzierten Bereiche der unterschiedlich mutierten HCpro in p35PPV-HC-K, -P, -KP im Vergleich zur Wild-Typ Sequenz.

HCpro: Helferkomponente-Protease, P1: Protein 1 PPV, P3: Protein 3 PPV; schraffierte Bereiche = sequenzierte Bereiche.

Bei der Sequenzierung der HCpro Gene wurde sich auf die in Abb. 12 dargestellten Bereiche beschränkt. Im sequenzierten Bereich wurden nur die Nukleotidaustausche berücksichtigt, die auf Aminosäureebene zu einem Austausch führten. Nukleotidaustausche, die keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz des PPV-NAT hatten (stumme Austausche), blieben unberücksichtigt. In den Mutanten p35PPV-HC-K und HC-KP führte ein Nukleotidaustausch an Position 4146 zum Aminosäureaustausch von unpolarem, basischen Serin zu unpolarem Tryptophan. In der HC-K Mutante führte ein Nukleotidaustausch an Position 5112 zum Aminosäureaustausch von basischem Lysin zu ebenfalls basischem Arginin. Weiterhin fand in den HC-P und HC-KP Mutanten ein Nukleotidaustausch an Position 5129 statt, der zu dem Aminosäureaustausch von unpolarem, basischen Threonin zu unpolarem Alanin führte.

4.5 Untersuchungen mit verschiedenen Mutanten des CP-Gens in p35PPV-NAT

4.5.1 Versuche mit viralen Assemblierungsmutanten

4.5.1.1 Herstellung von viralen Assemblierungsmutanten

Um den Einfluß der ins CP-Gen eingeführten Mutationen auf die systemische Infektiosität von p35PPV-NAT zu überprüfen, wurden die CP-Gene mit den Mutationen CP-RQ, -D und RQ-D (siehe 4.1.1.1) in den infektiösen "full-length" Klon des p35PPV-NAT gegen die unmutierten CP-Bereiche ausgetauscht. Als Ausgangsplasmide dienten pe35SL-NAT-CP-RQ, -D, -RQ-D, die schon zu Pflanzentransformationsexperimenten verwendet worden waren. Die einzelnen CP-Gene mit den Mutationen konnten über eine gerichtete *SacI/PstI*-Klonierung direkt in p35PPV-NAT überführt werden. Mit dieser Klonierung erhielt der "full-length" Klon neben den Mutationen, zusätzlich zum Polyadenylierungssignal (pA), ein pA des CaMV. Die Konstrukte p35PPV-CP-RQ, -D, -RQ-D wurden über eine Reihe von Restriktionskontrollen überprüft. Die Plasmidpräparationen wurden zur Infektion von Pflanzen mittels Partikelbombardment verwendet.

4.5.1.2 Untersuchungen zur Infektiosität

Alle drei Assemblierungsmutanten des p35PPV-NAT waren in mehrmaligen unabhängigen Partikelbombardment Versuchen, im Vergleich zur 100 %-igen Infektiosität des Wild-Typ Klons des p35PPV-NAT, nicht in der Lage *N. benthamiana* systemisch zu infizieren (Tab. 27).

4.5.1.3 Nachweis der Komplementation

Beim Partikelbombardment von transgenen *N. benthamiana* der Linie 17.27.4., die ein intaktes CP-AT exprimiert, zeigte sich, daß die Assemblierungsmutanten in der Lage waren, wenn auch mit einer weitaus geringeren Infektionsrate, die Recovery-resistenten Pflanzen systemisch zu infizieren. Daraus konnte geschlossen werden, daß ein intaktes transgenes PPV-CP das assemblierungsdefekte CP komplementieren kann. Über dieses Phänomen erhielten die defekten Viren ihre Fähigkeit zurück, die Pflanzen systemisch zu infizieren.

Die Hüllproteingene der CP-RQ-D und der CP-RQ Mutante wurden mit den Primern Uni-Poty/Uni-Poly-T (siehe Anhang 8.8.12) amplifiziert und kloniert. Mit dem Primer Uni-Poty (Nemchinov *et al.*, 1996) wurde sichergestellt, daß ausschließlich virale RNA und kein transgenes Transkript amplifiziert werden konnte, da die homologe Sequenz für den Primer Uni-Poty im NIb-Gen liegt, welches in der transgenen Sequenz nicht vorhanden war. Die eingefügten Mutationen konnten mittels Sequenzierung bestätigt werden. Dies zeigte, daß keine rekonstituierende Rekombination stattgefunden hatte. Die Symptome der systemischen Infektion durch Komplementation sind in Abb. 13 dargestellt. Sie traten mit einer Verzögerung von ein bis zwei Wochen im Vergleich zu unmutiertem PPV-NAT auf und unterschieden sich deutlich von den Wild-Typ Symptomen. Nur lokale Blattaufhellungen waren sichtbar. Es konnte keine Epinastie oder Blattrollen wie bei dem PPV-NAT Wild-Typ beobachtet werden. Die ELISA-Untersuchungen mit dem Antiserum gegen die HCpro zeigten ähnliche Werte wie das Wildtyp-PPV-NAT. Im Elektronenmikroskop konnten in ISEM Präparaten jedoch nur nach intensivem Durchmustern der Präparate Partikel nachgewiesen werden. Die Recovery-Resistenz schien von den eingefügten Mutationen nicht beeinträchtigt zu sein. Auch hier war der Neuaustrieb zwei bis drei Wochen nach Auftreten der ersten Symptome symptomfrei.

Um auszuschließen, daß über die Klonierung oder die Replikation in *E. coli* weitere Mutationen in den p35PPV-NAT eingefügt worden waren, wurde der ausgetauschte Bereich von der Restriktionsschnittstelle *SacI* bis *PstI* (12046/12907) gegen den ursprünglichen Teil des "full-length" Klon zurückgetauscht (siehe 4.5.1.1). Alle Rücktausche erwiesen sich in *N. benthamiana* Pflanzen als infektiös [CP-RQ-Rücktausch 5/20, CP-D-Rücktausch 5/5, CP-RQ-D-Rücktausch 4/5 (Anz. Pflanzen infiziert/inokuliert)]. Daraus konnte geschlossen werden, daß nur die eingefügten Assemblierungsmutationen für die beobachteten Effekte verantwortlich waren. Die Tab. 27 zeigt die zusammengefaßten Ergebnisse aller Partikelbombardment-Versuche.

Tab. 27: Infektiosität von p35PPV-NAT-Assemblierungsmutanten in *N. benthamiana* und Komplementation in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen (17.27.4.)

Assemblierungsmutante	Partikelbombardment <i>N. benthamiana</i> *	Partikelbombardment transgene 17.27.4. *
p35PPV-CP-RQ-D	0/30	12/30
p35PPV-CP-RQ	0/15	17/30
p35PPV-CP-D	0/15	3/30
p35PPV-Wildtyp	20/20	20/20

*: Anzahl infiziert/Anzahl inokuliert

Die geringe Infektionsrate der p35PPV-NAT-CP-D in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen wurde nicht der eingefügten D-Mutation zugeschrieben, da die Doppelmutante (-CP-RQ-D) eine weitaus höhere Infektionsrate besaß. Sie war wahrscheinlich auf die schlechte Qualität oder Ausbeute einer Plasmidpräparation zurückzuführen. Weiterhin erzeugte die CP-D Mutante nach Komplementation und systemischer Infektion bei den verschiedenen Passagen vergleichbare Infektionsraten, wie auch die beiden anderen Assemblierungsmutanten (siehe 4.5.1.5).



Abb. 13: Komplementationssymptome einer CP-Assemblierungsmutante des p35PPV-NAT-RQ in einer transgenen *N. benthamiana* Pflanze (17.27.4.) neben einer nichtinfizierten *N. benthamiana* Pflanze.

4.5.1.4 Unterdrückung der Komplementation in transgenen *N. benthamiana* mit modifiziertem Hüllproteingen

Die oben beschriebenen Untersuchungen zeigten, daß ein intaktes transgenes CP des PPV in transgenen *N. benthamiana* das assemblierungsdefekte CP einer Mutante komplementieren kann. Da die neu hergestellten transgenen *N. benthamiana* die assemblierungsdefekten Hüllproteine des PPV exprimierten, sollte es für die Assemblierungsmutanten des p35PPV-NAT, trotz des transgenen CP, nicht möglich sein, diese Pflanzen systemisch zu infizieren. In diesen transgenen Pflanzen kann das transgene CP über Komplementation keine Funktion zur Verfügung stellen, die das defekte virale CP nicht selbst besitzt.

Die neu hergestellten transgenen *N. benthamiana*, die mit den gleichen defekten CP-Genen des PPV transformiert worden waren, sollten also assemblierungsdefekte p35PPV-NAT nicht komplementieren. Um dies zu überprüfen wurden verschiedene der neu hergestellten Linien zur Infektion mit den drei CP-Defektmutanten ausgewählt.

Fünf Pflanzen jeder Linie wurden neben fünf Pflanzen der Linie 17.27.4. (Positivkontrolle der Inokulation) mit Preßsäften aus den mit Mutanten infizierten Pflanzen (Linie 17.27.4.) inokuliert. Wie die Tab. 28 zeigt, wurde keine der CP-Defektmutanten des p35PPV-NAT in den neu hergestellten transgenen T₂-Linien vom transgenen CP komplementiert. Die Infektionen wurden mittels ELISA überprüft.

Tab. 28: Komplementation von verschiedenen Hüllprotein-defekten p35PPV-NAT in unterschiedlichen transgenen CP-exprimierenden T₂-Linien von *N. benthamiana*.

p35PPV-NAT Defektmutanten	p35PPV-CP-R Q	p35PPV-CP-D		p35PPV-CP-RQD		
		ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	
<i>N. benthamiana</i>	0/5*	-	0/5*	-	0/5*	-
CP-AT (17.27.4)	5/5	+	3/5	+	4/5	+
CP-RQ (207.14.2)	0/5	-	0/5	-	0/5	-
CP-D (221.16.2)	0/5	-	0/5	-	0/5	-
CP-RQD (219.8.6)	0/5	-	0/5	-	0/5	-
CP-N (210.12.1.)	0/5	-	0/5	-	0/5	-

*: Anzahl infiziert/Anzahl inokuliert, PTA-ELISA mit Antiserum gegen die HCpro

4.5.1.5 Nachweis der Rekombination

Das Auftreten von Komplementation in den transgenen Pflanzen ermöglichte den Mutanten die systemische Ausbreitung in der Pflanze. Die fehlende systemische Infektion in nichttransgenen *N. benthamiana* zeigte, daß auch das CP des PPV, wie das CP anderer Potyviren, an Transportfunktionen beteiligt ist. Über die Komplementation in den Recovery-resistenten Pflanzen wurde den Mutanten eine systemische Infektion und damit eine Replikation in einer großen Anzahl von Pflanzenzellen ermöglicht. Dies belegen die unter 4.5.1.6 durchgeführten Untersuchungen. Damit war ein System gefunden, welches es ermöglichte, Rekombinationsuntersuchungen unter hohem Selektionsdruck durchzuführen. Die häufige Replikation und die Recovery-Resistenz sollten die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination zwischen defektem CP-Gen und intaktem transgenem CP-Gen erhöhen. Mit der Rekombination könnte die Fähigkeit zur systemischen Infektiosität

von nichttransgenen *N. benthamiana* wiederhergestellt werden. Da das CP der einzelnen p35PPV-NAT Mutanten im Vergleich zum transgenen Hüllproteingen (CP-AT) eine 45 Bp Deletion am N-terminalen Ende aufweist, könnte eine Rekombination in diesem Bereich unter Umständen über die Integration dieser Sequenz in das virale Genom nachgewiesen werden.

Um nachzuweisen, ob das intakte transgene CP-Gen über Rekombination die Assemblierungsmutation zur Originalsequenz revertiert, wurden Preßsäfte aus Blättern, die mit den unterschiedlichen Mutanten infizierten transgenen *N. benthamiana*, als Mischprobe auf nichttransgene Pflanzen inokuliert. Eine Parallelinokulation auf transgene Pflanzen (Linie 17.27.4.) wurde zur Überprüfung der Inokulationseffizienz durchgeführt. Die nichttransgenen Pflanzen dienten somit als Filter, denn nur rekonstituierte Viren mit intaktem Hüllprotein können nichttransgene Pflanzen unter diesen Versuchsbedingungen systemisch infizieren. Da nach der ersten Passage keine Rekonstitution beobachtet werden konnte, wurden sukzessive insgesamt fünf Passagen über einen Zeitraum von mehreren Monaten durchgeführt. Damit sollte über eine häufigere Replikation die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Rekombinationsereignisses erhöht werden. In der dritten Passage wurde eine nichttransgene *N. benthamiana* Pflanze von PPV-CP-RQ systemisch infiziert. Das Hüllproteingen wurde aus einer Gesamt-RNA-Präparation mit dem Primerpaar Uni-Poty/Uni-Poly-T amplifiziert und in einen T-Vektor kloniert. Der relevante Bereich des N-Terminus und der Mutation wurden sequenziert. Die Assemblierungsmutation war durch die Wild-Typ-Sequenz ersetzt worden. Es konnte jedoch keine Sequenz des transgenen CP-AT, als definitiver Beweis einer Rekombination, nachgewiesen werden. Die beiden anderen Assemblierungsmutanten (CP-RQ-D und -D) blieben bis zur fünften Passage ausschließlich auf transgene Pflanzen der Linie 17.27.4. mit normalen Komplementationssymptomen beschränkt. Um diese Rekonstitution zu reproduzieren, wurde das Experiment des Partikelbombardments mit anschließenden fünf Passagen zweimal wiederholt. In diesen nachfolgenden Experimenten konnte jedoch bei keiner der drei Assemblierungsmutanten eine Rekombination zwischen defektem viralem Gen und intaktem transgenem CP-Gen in der Linie 17.27.4. nachgewiesen werden.

Haldeman-Cahill *et al.* (1998) zeigten eine Beteiligung des 3'-NTR bei Potyviren an der Initiation der Replikation. Greene & Allison (1996) führten ähnliche Rekombinationsversuche wie in dieser Arbeit mit CP-Defektmutanten des CCMV in

transgenen Pflanzen durch, die das korrespondierende intakte CP-Gen mit vollständiger 3'-NTR exprimierten. In diesen Untersuchungen wurden 3% (7 von 235 Pflanzen) rekonstituierte Rekombinante nachgewiesen. Wurde jedoch ein Teil der 3'-NTR aus der transgenen Sequenz entfernt, führte dies zu einer drastischen Reduktion des Auftretens von Rekombinanten.

Die transgene Expressionskassette der Linie 17.27.4. besaß nur 54 Bp des 3'-NTR am 3'-Ende des Hüllproteingens (CP-AT). Aus diesem Grund wurden die Rekombinationsuntersuchungen mit einer PPV-CP exprimierenden Linie, die eine vollständige 3'-NTR besaß, wiederholt. Zu diesem Zweck stand die transgene T₂-Linie 4.30.45. zur Verfügung, die mit dem CP-NAT transformiert worden war. Diese exprimierte, wie die Linie 17.27.4., das CP (siehe 4.2.2) und wies ebenso eine Recovery-Resistenz auf. In zwei unabhängigen Versuchen wurden jeweils fünf Pflanzen dieser Linie mit den drei unterschiedlichen Assemblierungsmutanten mittels Partikelbombardment inokuliert. Nach dem Auftreten von Komplementationssymptomen wurden die gleichen oben angegebenen Passagen, sowohl auf transgene Pflanzen der Linie 4.30.45., wie auch auf nichttransgene *N. benthamiana*, durchgeführt. Bei p35PPV-CP-RQ und -CP-RQ-D konnte schon in der ersten Passage eine systemische Infektion von nichttransgenen *N. benthamiana* beobachtet werden. Bei p35PPV-CP-D wurde erst nach der zweiten Passage in der Linie 4.30.45. eine Rekonstitution nachgewiesen. In der Wiederholung des Experimentes konnte bei allen drei Mutanten schon in der ersten Passage das Auftreten einer Rekonstitution nachgewiesen werden (Tab. 29). Die Tatsache, daß eine Mutante erst in der zweiten Passage rekonstituiert wurde, zeigte an, daß diese Mutante in diesem Fall nicht in der erstinfizierten Pflanze über Rekombination rekonstituiert wurde, sondern komplementiert und auch passagiert wurde, bevor die rekonstituierende Rekombination stattfand.

Aus den Gesamtnukleinsäurepräparationen der infizierten nichttransgenen *N. benthamiana* Pflanzen wurde mit den Primerpaar Uni-Poty/Uni-Poly-T in der RT/PCR das jeweilige virale Hüllproteingens amplifiziert und in einen T-Vektor kloniert. Keiner der untersuchten Klone der verschiedenen Mutanten besaß noch eine oder beide der eingefügten Restriktionsschnittstellen, mit denen die Mutationen markiert worden waren (RQ= *Aat*II, D= *Bg*II). Ein Klon der Mutante p35PPV-NAT-CP-D wurde vom 3'-Ende her sequenziert und 973 Bp inklusive der 3'-NTR bestimmt. Dabei wurde kein Austausch zur PPV-NAT Wild-Typ Sequenz festgestellt. Da alle Klone der

p35PPV-NAT-CP-RQ und -CP-RQ-D Mutanten die entsprechenden Marker-Restriktionsschnittstellen nicht mehr aufwiesen, konnte davon ausgegangen werden, daß auch hier die Original PPV-NAT Sequenz wiederhergestellt worden war. Auf eine Sequenzierung der einzelnen CP-Gene wurde daher verzichtet.

Tab. 29: Infektiosität von p35PPV-NAT Assemblierungsmutanten in transgenen *N. benthamiana* (Linie 4.30.45) und Infektiosität von *N. benthamiana* nach Passage in 4.30.45.

Assemblierungs- mutante	Partikelbombardment transgene 4.30.45 * a: 1. Versuch, b: 2. Versuch	Passage von transgenen auf nichttransgene <i>N. benthamiana</i> *
p35PPV-CP-RQ-D	a: 3/5 b: 2/5	5/5 (1. Passage) 4/5 (1. Passage)
p35PPV-CP-RQ	a: 4/5 b: 1/5	3/5 (1. Passage) 5/5 (1. Passage)
p35PPV-CP-D	a: 2/5 b: 3/10	1/5 (2. Passage) 1/3 (1. Passage)

*: Anzahl infiziert/Anzahl inokuliert

Die verschiedenen Assemblierungsmutanten des p35PPV-NAT infizierten zwischen einer und vier von fünf Pflanzen der Linie 4.30.45. mittels Partikelbombardment. Da bei der Inokulation einer Mischprobe auf nichttransgene *N. benthamiana* Pflanzen in der ersten oder zweiten Passage Pflanzen infiziert werden konnten, muß in mindestens 25 % der primär inokulierten transgenen Pflanzen eine Rekonstitution stattgefunden haben. Aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Pflanzen, die mit den einzelnen Mutanten infiziert worden waren, wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

4.5.1.6 Untersuchungen zur Assemblierung

Das Ziel der folgenden Untersuchungen war, für das in dieser Arbeit verwendete Potyvirus PPV-NAT, die Beteiligung der Motive RQ und D des CP an der Partikelassemblierung *in-planta* zu verifizieren. Diese Untersuchungen waren notwendig, um die Ergebnisse der Untersuchungen zur Heterologen Enkapsidierung (siehe 4.3) der neu erzeugten transgenen Pflanzen, die mit assemblierungsdefekten

CP-Genen des PPV transformiert worden waren, abzusichern. Der direkte Nachweis der Verhinderung der Partikelassemblierung wurde nach folgender Strategie vorgenommen. Es wurde ein modifizierter "full-length" Klon des p35PPV-NAT verwendet, welcher zusätzlich mit dem *gus*-Gen (β -Glucuronidase) als Expressionsmarker zwischen dem NIb- und CP-Gen ausgestattet war (Prof. Dr. Maiß, persönliche Mitteilung). Dieser Klon war in der Lage, *N. benthamiana* Pflanzen systemisch zu infizieren. Auch konnte eine β -Glucuronidase-Aktivität mittels *gus*-Test (3.2.1.9) in *N. benthamiana* Pflanzen nachgewiesen werden, die direkt mit dem Klon p35PPV-*gus*-CP bombardiert worden waren. In diesen Klon wurden die Assemblierungsmutationen RQ-DV und DF-KI aus p35PPV-CP-RQ-D eingefügt, (Produkt: p35PPV-*gus*-CP-RQ-D) (Prof. Dr. E. Maiß, persönliche Mitteilung).

Einzelne Blätter von *N. benthamiana* sollten mit dem Klon p35PPV-*gus*-CP-RQ-D mit Hilfe der Partikelkanone PDS1000 (siehe 3.2.13.2) bombardiert werden. Mittels *gus*-Test sollte eine Replikation der Defektmutante nachgewiesen werden.

Über einen Vergleich der Größe der blau gefärbten Blattflächen mit denen, die von intaktem p35PPV-NAT-*gus*-CP erzeugt worden waren, sollte auf den Einfluß der Mutationen auf die Transportfunktionen in *N. benthamiana* Pflanzen geschlossen werden. Nach erfolgreichem *gus*-Test sollten aus einzelnen blaugefärbten Blattbereichen mittels ISEM (siehe 3.4.3) Viruspartikel im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. Könnten beide mutierten Aminosäuremotive RQ und D tatsächlich eine Assemblierung verhindern, so dürften aus *gus*-gefärbten Blattbereichen, die von p35PPV-NAT-*gus*-CP-RQ-D erzeugt wurden, keine Viruspartikel nachweisbar sein. Auf der anderen Seite sollte es jedoch möglich sein, bei Bombardment der Assemblierungsmutante auf Blätter der transgenen Linie 4.30.45., aufgrund der Komplementation, *gus*-gefärbte Blattbereiche der Wild-Typ Größe, wie auch Viruspartikel nachzuweisen.

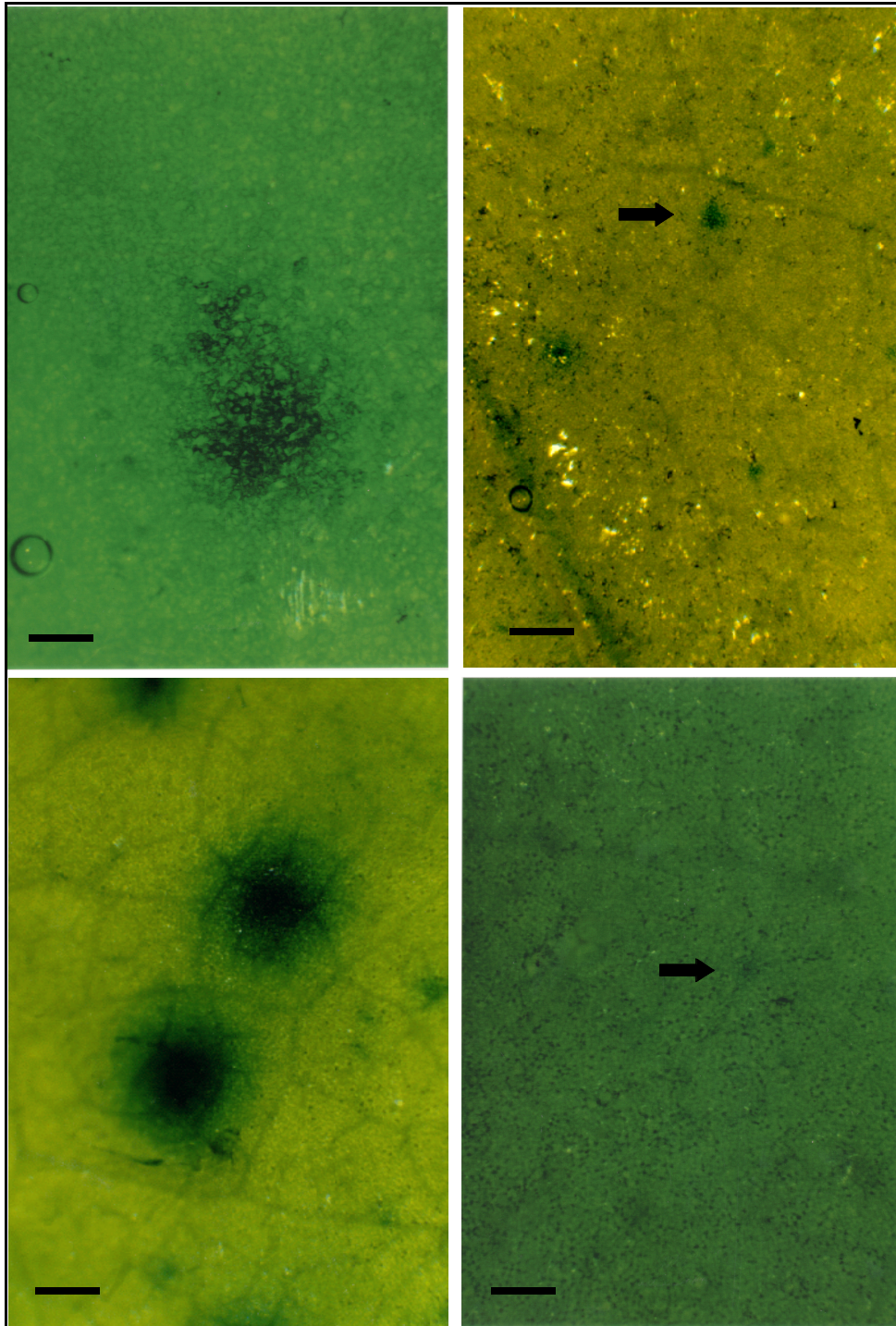


Abb. 14 Beispielfotos von *gus*-gefärbten Blattbereichen, von verschiedenen *gus*-markierten viralen Klonen erzeugt

Von links nach rechts: p35PPV-NAT-*gus*-CP (*N.b.*), p35PPV-NAT-*gus*-CP-RQ-D (*N.b.*), p35PPV-NAT-*gus*-CP-RQ-D (*N.b.* 4.30.45.), pPVX-*gus*-Bsp120I (*N.b.*), *N.b.*= *N. benthamiana*. Der Balken entspricht 250 μm .

Tab. 30: Ergebnisse der Auszählung und Vermessung von *gus*-gefärbten Blattbereichen und Viruspartikeln in dekorierten ISEM Präparaten von p35PPV-NAT-*gus*-CP, p35PPV-NAT-*gus*-CP-RQ-D, pPVX-*gus*-Bsp120I

Klon	p35PPV-NAT- <i>gus</i> -CP	p35PPV-NAT- <i>gus</i> -CP-RQ-D	p35PPV-NAT- <i>gus</i> -CP-RQ-D	pPVX201- <i>gus</i> -Bsp120I
bombardierte Blätter	<i>N. b.</i>	<i>N. b.</i>	<i>N. b.</i> (4.30.45.)	<i>N. b.</i>
Anzahl <i>gus</i> -Blattflecke	217	116	200	191
Mittelwerte Durchmesser	746 μm^a	155,7 μm^b	517,5 μm^c	149,2 μm^b
SD	$\pm 9,99 \mu\text{m}$	$\pm 1,62 \mu\text{m}$	$\pm 5,13 \mu\text{m}$	$\pm 2,55 \mu\text{m}$
Anzahl und Fläche durchgemusterter Blickfelder	60 (2,1 mm ²)	120 (4,2 mm ²)	60 (2,1 mm ²)	60 (2,1 mm ²)
Mittelwerte Anzahl Partikel/Blickfeld	93,75	0	1,92	14,2

N.b.: *N. benthamiana*; b: signifikant verschieden von a ($p = 0.0001$); c: signifikant verschieden von a und b ($p = 0.0001$)

Um die Sensitivität des elektronenmikroskopischen Nachweises zu überprüfen, wurden parallel Blätter von *N. benthamiana* Pflanzen mit dem Klon des ausbreitungsdefekten PVX (pPVX-*gus*-Bsp120I) (Chapman *et al.*, 1992) (siehe auch 4.7) bombardiert, welcher nach Morozow *et al.* (1997) in *N. benthamiana* Blättern *gus*-gefärbte Blattbereiche produzieren konnte. Bei ausreichender Sensitivität des ISEM sollten aus *gus*-gefärbten Blattbereichen, die von dieser PVX Mutante in *N. benthamiana* Blättern erzeugt werden, PVX-Viruspartikel nachweisbar sein. Es wurden unterschiedliche Anzahlen von *N. benthamiana* Blättern mit den einzelnen Klonen bombardiert (3.2.13.2) und, wie unter 3.2.1.9 beschrieben, *gus*-Tests durchgeführt. Die Abb. 14 zeigt *gus*-gefärbte Blattbereiche, die von den verschiedenen Klonen erzeugt werden konnten. Die *gus*-gefärbten Blattbereiche der verschiedenen viralen Klone wurden vermessen, anschließend präpariert und zum ISEM mit spezifischen Antiseren gegen das PVX oder das PPV eingesetzt (siehe 2.1 und 3.4.3). Die einzelnen Präparate wurden zur exakten Identifizierung der Viren mit spezifischen Antiseren, wie unter 3.4.4 beschrieben, dekoriert. Die Blickfelder der verschiedenen Präparate wurden in

unterschiedlichen Anzahlen auf das Vorhandensein von Viruspartikeln durchgemustert und die Viruspartikel gezählt. Die Ergebnisse sind in der Tab. 30 dargestellt.

Eine statistische Auswertung der Mittelwerte der Durchmesser der *gus*-gefärbten Blattbereiche der verschiedenen Klone erfolgte mit dem Dunnett Test (SAS; 1996). Wie aus der Tab. 30 hervorgeht, waren die *gus*-gefärbten Bereiche, die vom p35PPV-NAT-*gus*-CP erzeugt wurden, wesentlich größer, als die von der PPV-Assemblierungsmutante (p35PPV-NAT-*gus*-CP-RQ-D). In transgenen *N. benthamiana* Blättern wurden jedoch *gus*-gefärbte Bereiche erzeugt, die signifikant kleiner waren, als die des unmutierten PPV-*gus*, aber auch signifikant größer, als die in nichttransgenen *N. benthamiana* Blättern. Die Assemblierungsmutante war also in den nichttransgenen Blättern, wie auch die PVX-Mutante, ausbreitungsdefizient. Die Durchmesser der Bereiche waren voneinander nicht signifikant unterschiedlich. In transgenen Pflanzen konnte der Ausbreitungsdefekt der PPV-Mutante zumindest teilweise von dem transgenen CP durch Komplementation aufgehoben werden.

Aus den *gus*-gefärbten Bereichen in *N. benthamiana* Blättern von p35PPV-*gus*-CP und pPVX-*gus*-Bsp120I konnten die PPV bzw. PVX-Partikel im ISEM mit anschließender Dekoration nachgewiesen werden. Die PVX-Dekoration war jedoch wesentlich schwächer, als die der PPV-Partikel. Dies wurde auf eine geringere Spezifität oder eine geringere Konzentration der IgG des Antiserums zurückgeführt. Aus den *gus*-gefärbten Bereichen, die mit der Assemblierungsmutante infiziert waren, konnten in jeweils 30 Blickfeldern, auf vier unabhängig voneinander erzeugten ISEM Präparaten, keine PPV-Partikel nachgewiesen werden. Die ausbreitungsdefekten PVX Viren konnten jedoch aus einzeln infizierten Zellen präpariert und nachgewiesen werden. In den transgenen *N. benthamiana* Blättern, in denen die PPV Assemblierungsmutante komplementiert wurde, war es möglich, Viruspartikel im ISEM zu detektieren. Die Anzahl der PPV-Viruspartikel, die in den transgenen Blättern mit p35PPV-*gus*-CP-RQ-D nachgewiesen werden konnte, war jedoch ca. um den Faktor 50 geringer, als die Anzahl von p35PPV-*gus*-CP in nichttransgenen Pflanzen. Dies wurde auf eine eventuell vorhandene begrenzende Konzentration des transgenen CP für die Partikelassemblierung zurückgeführt. Die durch p35PPV-NAT-*gus*-CP-RQ-D hervorgerufene *gus*-Färbung in nichttransgenen *N. benthamiana* Blättern zeigte, daß durch die eingefügte Mutation im CP die Replikation auf zellulärer Ebene nicht verhindert wurde. Die fehlende Ausbreitung bestätigte die unter 4.5.1.2 festgestellten

Ergebnisse zur fehlenden systemischen Infektiosität dieser Mutante. Die unter 4.5.1.3 festgestellte Beobachtung, daß über Komplementation die systemische Infektiosität der Mutante wiederhergestellt werden konnte, wurde hier mit der Erzeugung von signifikant größeren *gus*-Flecken in transgenen Blättern bestätigt.

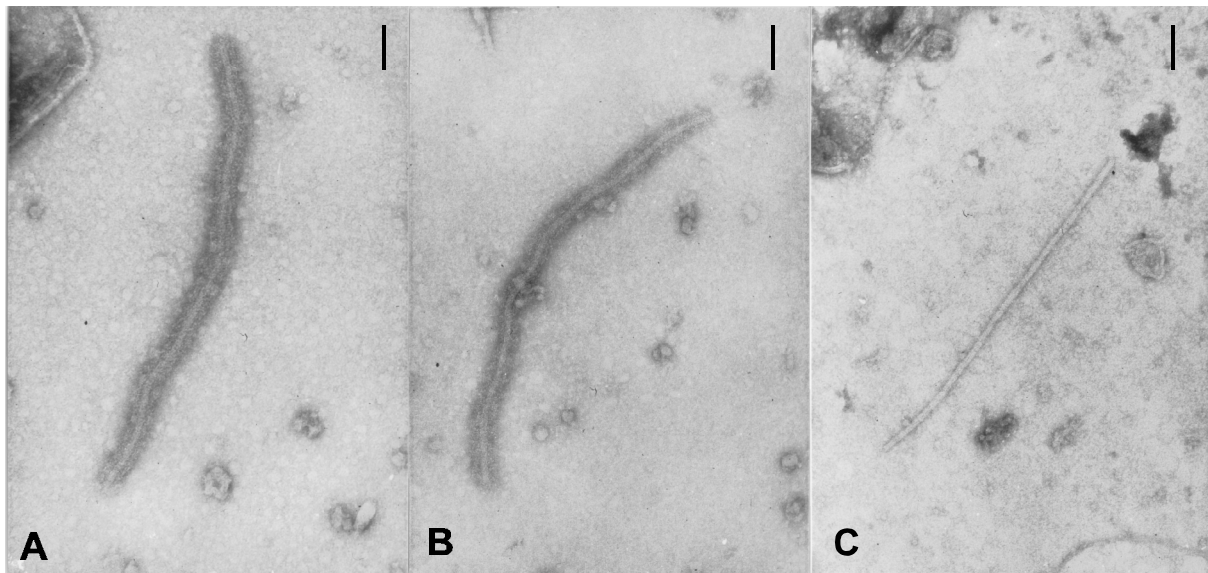


Abb. 15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von PPV oder PVX Partikeln; aus *gus*-Flecken mittels ISEM und Dekoration nachgewiesen.

A) p35PPV-NAT-*gus*-CP in *N. benthamiana*; B) p35PPV-NAT-*gus*-CP-RQ-D in Linie 4.30.45., C) pPVX-*gus*-Bsp120l in *N. benthamiana*. Der Balken entspricht 100 nm.

Um diese experimentellen Daten der Beteiligung der konservierten Aminosäuren RQ und D des CP an der Partikelassemblierung auf eine breitere Basis zu stellen, wurden Untersuchungen zur Vorhersage der Proteinsekundärstruktur des Wild-Typ PPV CP und der Doppelassemblierungsmutante CP-RQ-D durchgeführt. Zu diesem Zweck konnte via Internet eine Proteindatenbank mit 1560 Proteindomänen bekannter Sekundärstruktur verwendet werden (siehe 3.6). Die beiden Aminosäuresequenzen wurden, mit den in der Datenbank vorhandenen Sequenzen, auf Aminosäurehomologie verglichen und daraus eine Proteinsekundärstruktur unter Angabe der α -helikalen Bereiche und β -Faltblattstrukturen errechnet (Russel *et al.*, 1997). Für das unmutierte PPV CP wurden in den beiden Bereichen der Assemblierungsmotive α -helikale Bereiche vorhergesagt. Diese prognostizierten α -Helices wurden jedoch durch die verschiedenen Aminosäureaustausche nicht beeinflusst. Im RQ-Motiv wurde durch die *in-vitro* Mutagenese basisches, positiv geladenes R durch saures, negativ

geladenes D ersetzt. Weiterhin wurde polares, ungeladenes Q durch unpolares, ungeladenes L ersetzt. Im D-Motiv wurde saures, negativ geladenes D durch basisches, positiv geladenes K ersetzt. Die unterschiedlichen Polaritäten und Ladungen der ausgetauschten Aminosäuren schienen keinen Einfluß auf die Ausbildung der vorhergesagten Sekundärstruktur des CP zu haben. Ob jedoch durch die veränderten Ladungen der ausgetauschten Aminosäuren die Ausbildung der postulierten "salt bridge" (siehe Einleitung) und damit die Ausbildung einer funktionellen Tertiärstruktur verhindert wurde, kann anhand dieser Daten nicht ausgesagt werden.

4.5.2 Untersuchungen mit einer Leserastermutante des CP-Gens

4.5.2.1 Herstellung einer Leserastermutante

Um die Rekombinationen zwischen den viralen Defektmutanten und den intakten korrespondierenden Genen in transgenen Pflanzen nachzuweisen, wurde zusätzlich zu den Assemblierungsmutanten eine Leserastermutante im CP-Gen hergestellt und diesbezüglich untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Restriktionsschnittstelle nahe des 3'-Endes des CP-Gens [*SpI* (*BsiWI*)₁₂₄₂₁], die im gesamten "full-length" Klon p35PPV-NAT nur einmal vorkommt ("single-site"), verdaut, die überstehenden 5'-Enden mit Klenow-Fragment aufgefüllt, religiert und transformiert (Produkt: p35PPV-NAT-*SpI*). Durch das Einfügen von vier zusätzlichen Nukleotiden kam es im CP-Gen zu einem Leserasterwechsel, der zu einem Stopcodon an Position 12435 führte. Damit fehlten dem CP dieser Mutante 53 Aminosäuren am C-Terminus. Um mit dieser Leserastermutante die Untersuchungen zur Rekombination unter Ausübung eines Selektionsdruckes durchführen zu können, müßte die Leserastermutation die systemische Infektiosität von p35PPV-NAT verhindern. Zur Untersuchung der systemischen Infektiosität mittels Partikelbombardment, wurde von dem Klon p35PPV-NAT-*SpI* Plasmid-DNA in größeren Mengen präpariert.

4.5.2.2 Versuche zur Infektiosität, Komplementation und Rekombination

In den Partikelbombardment-Versuchen zur Infektion von *N. benthamiana* Pflanzen war die Leserastermutante p35PPV-NAT-*SpI* nicht in der Lage, systemische

Infektionen zu erzeugen. Das offensichtlich defekte CP wurde jedoch in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen, die das intakte CP des PPV exprimieren (Linie 17.27.4.), komplementiert. Die auftretenden Komplementations Symptome waren von denen der verschiedenen CP-Assemblierungsmutanten (siehe 4.5.1.4.) nicht zu unterscheiden. Auch die Recovery-Resistenzreaktion wurde nicht beeinflusst. Um nachzuweisen, ob eine Rekombination mit dem transgenen CP, wie schon für die CP-Assemblierungsmutanten durchgeführt, die Leserastermutation revertieren kann, wurden die Preßsäfte der infizierten transgenen Pflanzen der Linie 17.27.4. auf nichttransgene *N. benthamiana* inokuliert. Da die nichttransgenen Pflanzen mit dieser Inokulation infiziert werden konnten, wurde davon ausgegangen, daß eine Rekonstitution stattgefunden hatte. Das CP-Gen wurde mit dem Primerpaar Uni-Poty/Uni-Poly-T mittels einer IC-RT/PCR mit dem Programm RNA-RT (siehe 3.2.4.2) amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die Auswertung ergab die vollständige Wiederherstellung der CP-PPV-NAT Sequenz. Eine Rekombination mit dem 5'-Ende des CP, also eine CP-AT Sequenz, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Das Inokulationsexperiment wurde zweimal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt. Das CP-Gen wurde jedoch nur einmal sequenziert. Um zu kontrollieren, ob der von der Mutation unbeeinflusste Bereich des Genoms von p35PPV-NAT bei der Klonierung unverändert geblieben war, wurde auch hier das unmutierte Original-CP-Gen in einem *SacI/PstI*-Fragment (Pos. 12046/12907) gegen den mutierten Bereich in der Leserastermutante ausgetauscht. Der zurückgetauschte Klon erlangte seine Fähigkeit wieder, systemische Infektionen zu erzeugen, der beobachtete Effekt war also ausschließlich auf die Mutation zurückzuführen. Zu einem späteren Zeitpunkt, als die transgene Linie 4.30.45., welche das CP-NAT mit vollständigem 3'-NTR exprimierte, für Rekombinationsversuche zur Verfügung stand, wurde das Rekombinationsexperiment reproduziert. Auch hier wurden schon nach einer Passage in der Linie 4.30.45 nichttransgene *N. benthamiana* Pflanzen infiziert. Die Ergebnisse der einzelnen Experimente sind in Tab. 31 zusammengefaßt.

Tab. 31: Infektiosität der p35PPV-NAT-*SpII* Leserastermutante in *N. benthamiana* und in transgenen 17.27.4. und 4.30.45. *N. benthamiana* Pflanzen. Infektiosität von *N. benthamiana* Pflanzen nach Passage in transgenen Pflanzen.

Partikelbomb. <i>N.</i> <i>benthamiana</i>	Partikelbomb 17.27.4. *	Passage von 17.27.4. auf nichttransgene <i>N. benthamiana</i> *	Partikelbomb 4.30.45. *	Passage von 4.30.45. auf nichttransgene <i>N. benthamiana</i> *
a: 0/10 b: 0/10 c: 0/5	a: 4/10 b: 3/10 c: 3/5	a: 3/4 b: 3/3 c: 5/5	a: 1/5 n.u. n.u.	a: 4/5 n.u. n.u.

*: Anzahl infiziert/Anzahl inokuliert, n.u.: nicht untersucht, a, b: c: :Wiederholungen

Mit der CP-Leserastermutante des p35PPV-NAT konnten mittels Partikelbombardment zwischen einer und zwei von fünf inokulierten transgenen *N. benthamiana* Pflanzen infiziert werden. Da bei der anschließenden Inokulation einer Mischprobe auf nichttransgenen Pflanzen eine systemische Infektion erzielt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, daß in mindestens 20 % der primär inokulierten Pflanzen eine Rekonstitution der Mutante stattgefunden haben mußte. Auf eine statistische Auswertung wurde, aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Pflanzen, verzichtet.

4.5.3 Versuche mit Hüllproteinchimären

4.5.3.1 Herstellung von Hüllproteinchimären

Die Herstellung von hybriden Pflanzenviren oder Viruschimären ist in der Vergangenheit vor allem als Möglichkeit genutzt worden, den Virustransport in der Pflanze zu untersuchen. Solovyev *et al.* (1996, 1997 und 1999) untersuchten TGB-Austauschmutanten des BSMV mit verschiedenen Vertretern der Hordeivirusgruppe und einem Vertreter der Dianthovirusgruppe, sowie dem "movement" Protein des TMV auf die Fähigkeit zur systemischen Ausbreitung in verschiedenen Wirtspflanzen. In fast allen Fällen konnten infektiöse Chimären erzeugt werden. In der Bromovirusgruppe sind ähnliche Untersuchungen zur Austauschbarkeit von Transportproteingenen und ihrem Einfluß auf die systemische Ausbreitung von De Jong *et al.* (1995) durchgeführt worden. Diese Arbeiten dienten der Untersuchung der

funktionellen Homologie gleichartiger Virusproteine. Gibbs & Cooper (1995) leiteten aus Sequenzvergleichen verschiedener Luteoviren Rekombinationsereignisse zwischen zwei Virusgenomen ab, die zu funktionsfähigen Chimären geführt haben. In der Potyvirusgruppe, zu dem das PPV gehört, sind keine derartigen Untersuchungen zur funktionellen Austauschbarkeit von Genen oder Genfragmenten bekannt.

In dieser Arbeit wurden Mutanten mit Sequenzaustauschen in Teilen des Hüllproteins des PPV-NAT hergestellt. Diese *in-vitro*-Rekombinanten sollten ein mögliches *in-vivo*-Rekombinationsereignis simulieren. Solch ein Rekombinationsereignis könnte unter Umständen zwischen der transgenen viralen Sequenz und einem infizierenden Virusgenom entstehen. Mit diesen Viruschimären sollte erstmals untersucht werden, ob diese Art von Chimären zweier homologer Gene im Kontext des PPV-Genoms lebensfähig sein können. Die Infektion von *N. benthamiana* Pflanzen mit diesen chimären Konstrukten sollte den Einfluß des Austausches auf die Symptomausprägung zeigen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob diese Chimären mit dem vollständigen funktionellen PPV-CP-Gen in transgenen Pflanzen rekombinieren. Dabei könnte bei homologer Rekombination die Wild-Typ PPV-Sequenz restauriert werden oder eine Mutante mit neukombinierter Sequenz entstehen. Die Sequenzierung von eventuell auftretenden Rekombinanten könnte Aufschluß über die Stabilität gegenüber der Wild-Typ Sequenz geben.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Austauschmutanten im CP-Gen von p35PPV-NAT hergestellt und auf ihre Infektiosität in *N. benthamiana* untersucht. Als auszutauschender Bereich wurde die Kernregion des CP-Gens gewählt, der im Gegensatz zum N- und C-Terminus nicht auf der Oberfläche des Hüllproteins lokalisiert ist und eine geringere Sequenzvariabilität besitzt (siehe Einleitung).

Die Strategie sah vor, diesen Kernbereich des PPV-CP gegen die adäquaten Bereiche anderer Potyviren auszutauschen. Als Austauschbereich im CP-Gen von 35PPV-NAT wurde der Bereich zwischen den Restriktionsschnittstellen *SacI/SpI* (12046/12421) gewählt (siehe Anhang 8.2). Für den Austausch wurden entsprechende Kernbereiche von nahe verwandten Potyviren (ZYMV, PVY, TVMV) und einem Vertreter der Gattung Tritimovirus (BrSMV) gewählt. Die Kernbereiche sollten mittels spezifischer RT-PCR an die, in den auszutauschenden Bereichen nicht vorhandenen, Restriktionsschnittstellen *SacI/SpI* zur Klonierung angepaßt werden. Dabei blieb das offene Leseraster des CP-Gens unbeeinflusst. Die Leseraster der verschiedenen CP-Gene wurden über ein Sequenz-"alignment" mit dem Programm ClustalX auf

Sequenzhomologie verglichen. Für jedes Virus wurden zwei sequenzspezifische Primer ausgewählt und synthetisiert, die die Restriktionsschnittstellen zur anschließenden Klonierung am 5'- und 3'-Ende der jeweiligen Sequenz in der RT/PCR integrierten. Die unterschiedlichen Viren lagen als infiziertes Pflanzenmaterial vor. Im Falle des BrSMV stand ein Subklon des BrSMV CP-Gens zur direkten Amplifizierung mittels PCR zur Verfügung (Götz & Maiss, 1995). Die Abb. 16 zeigt eine systematische Darstellung der Chimärenherstellung.

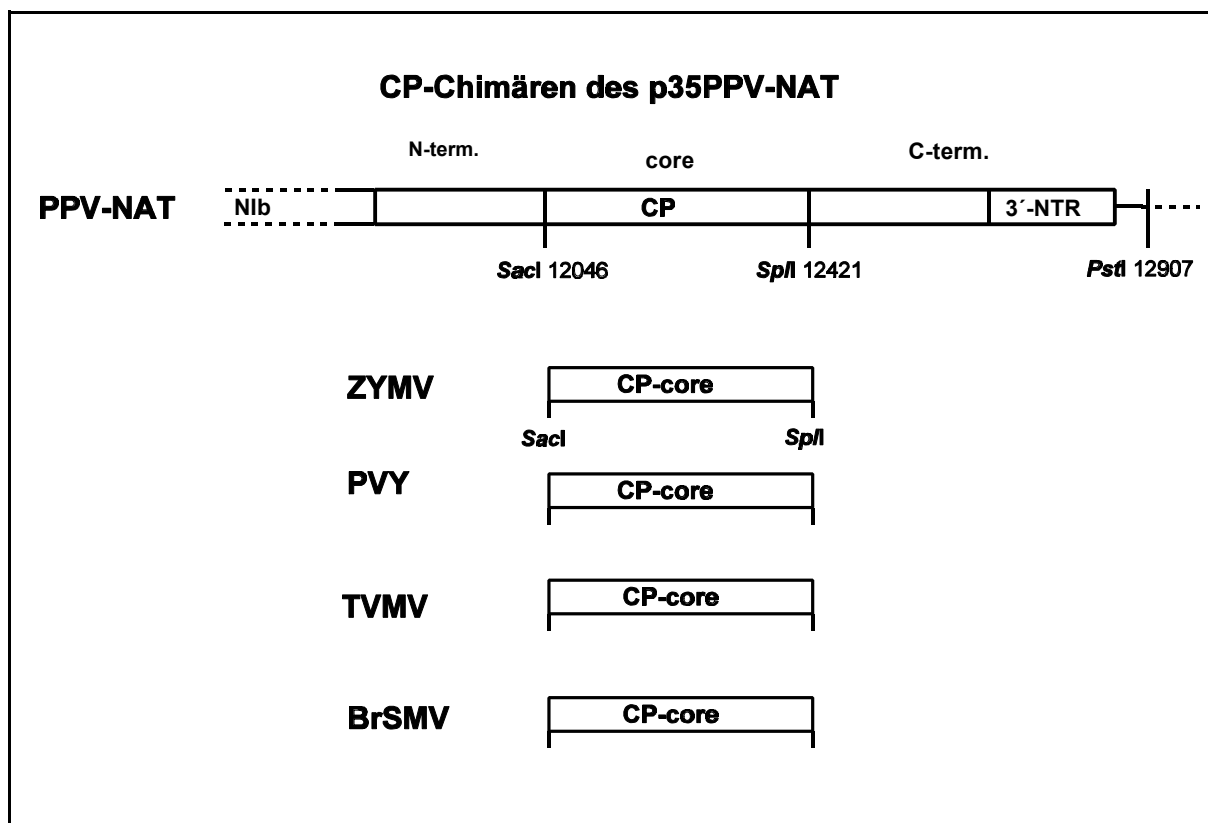


Abb. 16: Strategie zur Herstellung der verschiedenen CP-Chimären in p35PPV-NAT

Der Kernbereich des CP-Gens von p35PPV-NAT wurde durch folgende Klonierungsstrategie ersetzt:

p35PPV-ZYMV

Aus den mit ZYMV infizierten *C. sativus* Pflanzen wurde, zur Amplifizierung des CP Kernbereiches, Gesamt-RNA hergestellt und zur RT/PCR mit dem Primerpaar

ZYMV1/ZYMV2 (siehe Anhang 8.8.12) eingesetzt (Programm RNA-RT, siehe 3.2.4.2). Das 385 Bp große PCR-Fragment wurde mit den Enzymen *SacI/BamHI* in pBIISKM *SacI/BamHI* kloniert. Zur Überprüfung der Sequenz wurde das gesamte Insert sequenziert. Das Zwischenprodukt wurde pBIISKM-ZYMV benannt. In diesen pBIISKM-ZYMV wurde ein Teil des p35PPV-NAT *BamHI/PstI* kloniert. Damit befand sich die PPV-Kassette am 5'-Ende des auszutauschenden ZYMV-Kernbereiches. Das ZYMV CP Kernfragment konnte durch Entfernen eines *SpII*-Fragmentes aus dem Plasmid vor das PPV 3'-Ende kloniert werden, so daß aus diesem Zwischenkonstrukt die Sequenz des CP Kernbereiches, unter Verwendung der Enzyme *SacI/PstI*, direkt in p35PPV-NAT ausgetauscht werden konnte (Produkt: p35PPV-ZYMV).

p35PPV-TVMV

Zur Amplifizierung und Klonierung des CP-Kernbereiches lag das TVMV in *N. benthamiana* Pflanzen vor. Auch hier wurde Gesamt-RNA aus infiziertem Blattmaterial hergestellt und zur RT/PCR mit dem Programm RNA-RT mit dem Primerpaar TVMV-up/TVMV-low eingesetzt. Das 385 Bp große PCR-Fragment wurde direkt in einen T-Vektor kloniert und die Sequenz des Kernbereiches bestimmt. Der Austausch in p35PPV-NAT mußte wegen einer internen *PstI*-Restriktions-Schnittstelle mit den Enzymen *SacI/SpII* erfolgen (Produkt: p35PPV-TVMV).

p35PPV-PVY

Das PVY lag in *N. benthamiana* Pflanzen vor. Die RNA-Präparation, Klonierung und Sequenzierung des PCR-Fragmentes erfolgten wie bei dem TVMV. Die spezifischen Primer waren PVY-up/PVY-low. Anschließend konnte es mit den Enzymen *SacI/SpII* in pBIISKM mit einem *SacI/PstI* Insert von p35PPV-NAT kloniert werden. Der Austausch des Kernbereiches erfolgte mit den Enzymen *SacI/PstI* in p35PPV-NAT (Produkt: p35PPV-PVY).

p35PPV-BrSMV

Zur Amplifizierung wurde im Falle des BrSMV ein CP-Subklon des BrSMV verwendet (Dr. R. Götz, persönliche Mitteilung). Hier wurde eine 1/100 Verdünnung des Plasmids für eine Standard-PCR mit 50°C Annealing-Temperatur mit Primern BrSMV-up/BrSMV-low eingesetzt. Die Klonierung und der Austausch in p35PPV-NAT erfolgte wie für das PVY angegeben (Produkt: p35PPV-BrSMV).

Alle Plasmide der rekombinanten “full-length” Klone wurden über eine Anzahl von unterschiedlichen Restriktionsverdau überprüft und zur Infektiositätstestung mittels Partikelbombardment in größeren Mengen präpariert.

4.5.3.2 Untersuchungen zur Infektiosität

Die einzelnen “full-length” Klone des p35PPV-NAT mit dem chimärem CP-Gen wurden neben p35PPV-NAT mittels Partikelbombardment auf ihre Fähigkeit, *N. benthamiana* Pflanzen systemisch zu infizieren, überprüft (Tab.32). Die inokulierten Pflanzen wurden visuell auf das Auftreten von Symptomen bonitiert. Aufgrund des veränderten CP der Mutanten wurde das Auftreten einer systemischen Infektion mittels ELISA mit Antiserum gegen die HCpro (AS 568) nachgewiesen. Das p35PPV-ZYMV war die einzige Chimäre, die in der Lage war, *N. benthamiana* Pflanzen systemisch zu infizieren. Dies konnte im PTA-ELISA und im Tropfpräparat mit anschließender Golddekoration mit AS 570 trotz chimärem CP nachgewiesen werden. Die ELISA-Werte waren mit denen des PPV vergleichbar. Im Vergleich zum PPV waren die Symptome jedoch milder und ein Blattrollen trat nicht auf. Nur in älteren, voll entfaltenen Blättern konnten leichte lokale Blattaufhellungen beobachtet werden. Die Symptome sind in Abb. 17 dargestellt. Bei keinem der anderen Konstrukte konnten im PTA-ELISA, im Vergleich zum PPV, positive Werte erhalten werden. Im ISEM mit dem CP-Antiserum (AS 570) konnten, in nur einem Infektionsexperiment mit der p35PPV-PVY-Chimäre, Partikel in nichttransgenen *N. benthamiana* Pflanzen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis konnte jedoch trotz mehrfacher Wiederholungen aus unterschiedlichen Partikelbombardment Versuchen nicht reproduziert werden.

Das Original CP “core”-Fragment *SacI/PstI* von p35PPV-NAT wurde in p35PPV-ZYMV mit den Enzymen *SacI/PstI* zurückgetauscht. Damit sollte sichergestellt werden, daß nur der ausgetauschte Bereich für die beobachteten Effekte verantwortlich war. Mit dem Rücktausch konnten mittels Partikelbombardment die ursprünglichen Symptome vom Wild-Typ PPV-NAT wiederhergestellt werden. Für alle anderen Chimären wurden keine Rücktauschklonierungen durchgeführt.

Tab. 32: Infektiosität Hüllprotein-chimärer p35PPV-NAT in nichttransgenen und CP-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen (Linie 17.27.4.).

PPV-Mutanten	Partikel- bombardment <i>N. benthamiana</i> *	Partikelbombardment transgene 17.27.4. <i>N. benthamiana</i> *	Passage von transgenen auf nichttransgene <i>N. benthamiana</i> *
p35PPV-NAT (WT)	36/42	16/16	n.u.
p35PPV-CP-BrSMV	0/16	0/16	n.u.
p35PPV-CP-TVMV	0/26	0/26	n.u.
p35PPV-CP-PVY	0/36	18/26	36/42
p35PPV-CP-ZYMV	8/30	38/40	15/15

*:Anzahl infiziert/Anzahl inokuliert, n.u.= nicht untersucht, WT = Wild-Typ

4.5.3.3 Untersuchungen zur Komplementation

Alle chimären Konstrukte wurden mittels Partikelbombardment auf Komplementation in *N. benthamiana* Pflanzen der Linie 17.27.4. untersucht. Bei diesen Untersuchungen konnte für die chimären p35PPV-ZYMV und p35PPV-PVY ein ähnliches Symptombild wie bei der Komplementation der Assemblierungsmutanten in der transgenen Linie 17.27.4. festgestellt werden. Die Konstrukte p35PPV-TVMV und p35PPV-BrSMV wurden vom intakten transgenen CP nicht komplementiert. Die Symptome sind in Abb. 17 und 18 dargestellt, eine Zusammenfassung der einzelnen Partikelbombardment Versuche zeigt die Tab. 32.

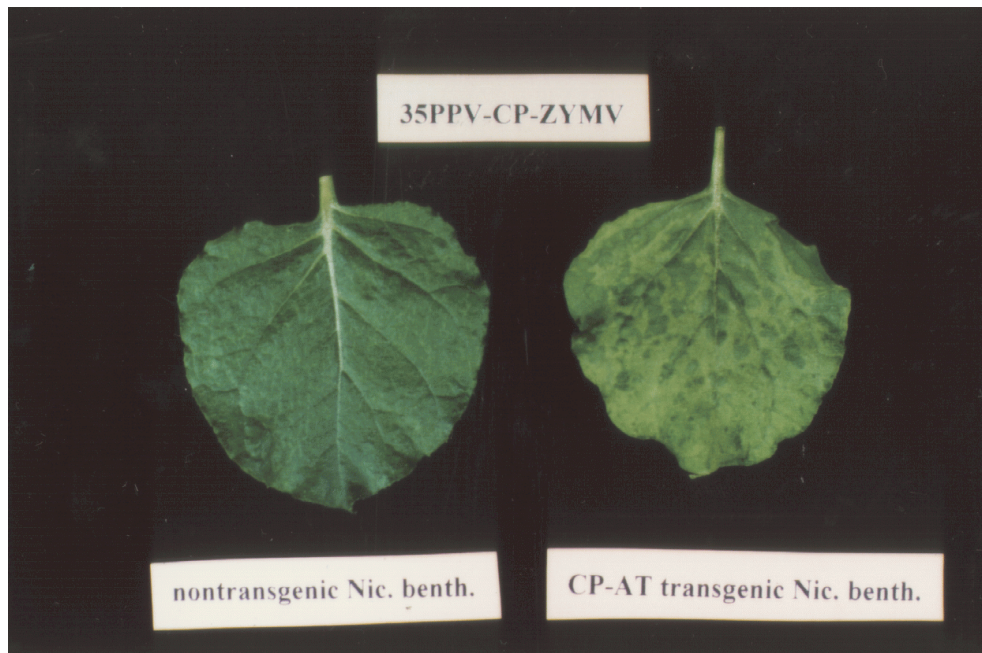


Abb. 17: Systemische Infektiosität von p35PPV-ZYMV in nichttransgenen und transgenen 17.27.4. *N. benthamiana* Pflanzen

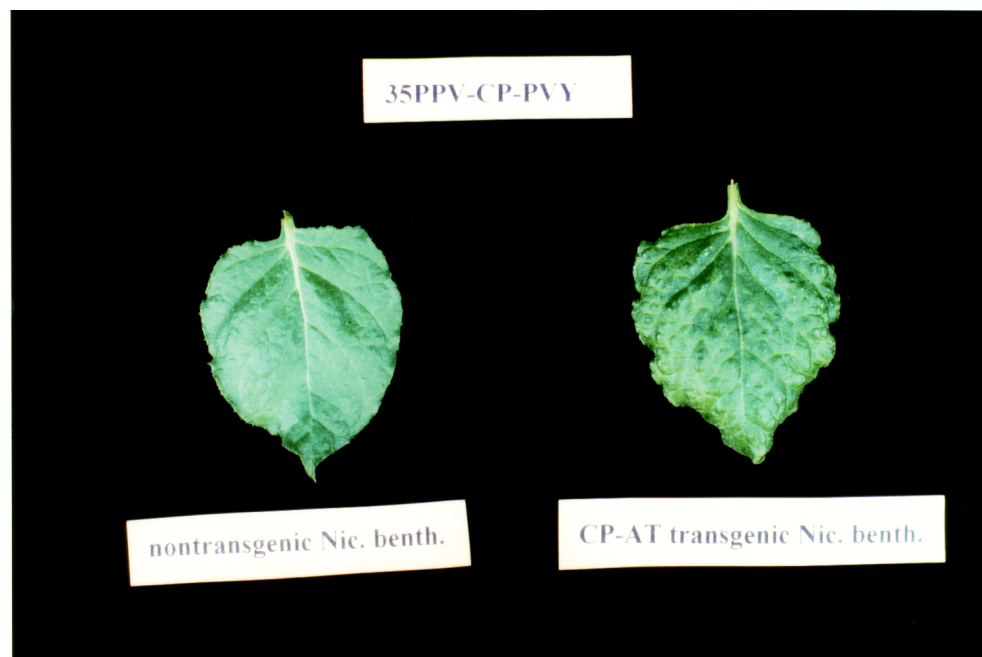


Abb. 18: Fehlende systemische Infektiosität in *N. benthamiana* Pflanzen und Komplementation in 17.27.4. *N. benthamiana* von p35PPV-PVY

Sequenzvergleich der verschiedenen Kernbereiche der CP-Gene

Mit dem Programm ClustalX (siehe 3.6) wurde auf Aminosäureebene ein Sequenzvergleich der im CP von p35PPV-NAT ausgetauschten Bereiche durchgeführt. Dieser Vergleich sollte Rückschlüsse von der Aminosäurehomologie auf die Funktionalität des jeweiligen chimären Hüllproteins ermöglichen. Der Sequenzvergleich ist im Anhang 8.8.40 dargestellt. Die Auswertungen wurden mit Hilfe des Programms Tree View (siehe 3.6) in ein phylogenetisches Baumdiagramm überführt (siehe Abb. 19).

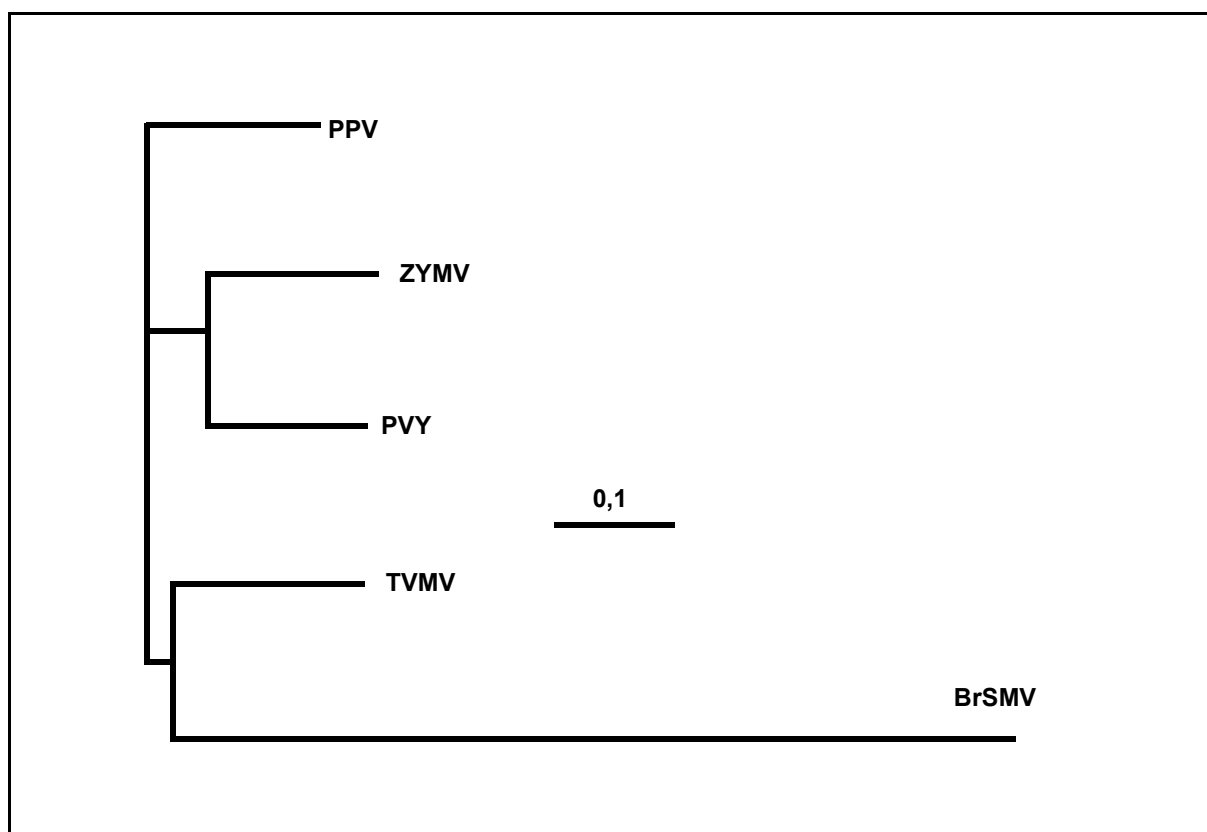


Abb. 19: Phylogramm der Nukleotidsequenzen der ausgetauschten Kernbereiche des PPV-NAT-CP.

Der Balken stellt die prozentuale Abweichung der Sequenzen dividiert durch 100 dar.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Verwandtschaftsbeziehungen des ausgetauschten Bereiches zeigen eine größere Übereinstimmung auf Nukleotidebene von ZYMV und PVY gegenüber PPV als TVMV und BrSMV. Der Kernbereich des BrSMV zeigt die geringste Nukleotidhomologie im Vergleich zum PPV. Diese Ergebnisse korrelieren mit

den Ergebnissen der Infektiositäts- und Komplementationsuntersuchungen. Der ZYMV Kernbereich, welcher die höchste Homologie aufweist, führte im Austausch des PPV Kernbereiches zu einer lebensfähigen Chimäre. Der PVY Kernbereich führte im Austausch wahrscheinlich zu einer ausbreitungsdefekten Chimäre, die Replikation des Virus schien jedoch nicht verhindert zu sein, welches die mögliche Komplementation in transgenen Pflanzen anzeigte. Der Austausch der verwandtschaftlich entfernteren Kernbereiche von TVMV und BrSMV führte zu einer Chimäre, die auch von dem transgenen intakten PPV-CP nicht komplementiert werden konnte.

4.5.3.4 Nachweis der Rekombination

Die Preßsäfte aus mit p35PPV-ZYMV und -PVY infizierten 17.27.4. *N. benthamiana* Pflanzen wurden auf transgene (17.27.4.) und nichttransgene *N. benthamiana* Pflanzen abgerieben. Damit sollte untersucht werden, ob Rekombinationen zwischen dem transgenen intakten CP-Gen und dem chimären Hüllproteingen die Wild-Typ Sequenz wiederherstellen oder eine neu kombinierte Sequenz erzeugen können. Bei einer aufgetretenen Rekombination zur Restauration der PPV-Wild-Typ Sequenz würde PPV-PVY in der Lage sein, *N. benthamiana* zu infizieren, beziehungsweise PPV-ZYMV Wild-Typ PPV-Symptome produzieren.

Nach der Komplementation durch das transgene CP in der Linie 17.27.4. war p35PPV-PVY in der Lage, nichttransgene *N. benthamiana* zu infizieren (Tab.32). Dies deutete auf eine aufgetretene Rekombination hin. Es wurden 12 Parallelklone des CP hergestellt, die mit einem spezifischen Restriktionsverdau auf das Vorhandensein des PVY-Kernbereiches überprüft wurden. Alle Klone zeigten die Abwesenheit einer PPV-CP spezifischen *EcoRI*-Schnittstelle. Da jedoch die Möglichkeit bestand, daß nur Teilsequenzen des Kernbereiches über Rekombination ausgetauscht wurden, wurde das CP-Gen eines Klones sequenziert. Die Sequenzierung des relevanten Bereiches ergab keine Veränderung der PVY-Sequenz im ausgetauschten Bereich zwischen den Restriktionsschnittstellen *SacI* und *SplI*. Das gleiche Ergebnis ergab die Sequenzierung von PPV-ZYMV aus *N. benthamiana* Pflanzen nach der Passage in der Linie 17.27.4.. In diesem Fall waren zuvor 24 hergestellte CP Parallelklone auf das Vorhandensein einer PPV-CP spezifischen *EcoRI*-Schnittstelle überprüft. Auch hier konnte kein Klon mit dieser Restriktionsschnittstelle nachgewiesen werden. Das Phänomen der Infektiosität von PPV-PVY in nichttransgenen *N. benthamiana* Pflanzen

konnte also nicht über eine Rekombination im CP Kernbereich erklärt werden. Ebenso wurde der ZYMV-Kernbereich in den transgenen Pflanzen der Linie 17.27.4. nicht durch den adäquaten PPV CP-Bereich über Rekombination ersetzt.

Die Ursache der fehlenden Infektiosität beim Primärbombardment von p35PPV-PVY konnte nicht untersucht werden, da unter Umständen Nukleotidaustausche im gesamten Genom zu suchen sein müßten, die zu einer Adaption des Virus, hinsichtlich der Fähigkeit systemische Infektionen zu erzeugen, geführt haben könnten. Trotzdem konnten die PPV-PVY-Chimäre, wie auch die PPV-ZYMV-Chimäre, für weitere Rekombinationsuntersuchungen verwendet werden. Um den Einfluß häufigerer Replikation in transgenen 17.27.4. der beiden Chimären auf das Auftreten von Wild-Typ Sequenz rekonstituierenden Rekombinationen zu überprüfen, wurden insgesamt fünf Passagen in jeweils fünf 17.27.4. Pflanzen durchgeführt. Dabei wurden immer Mischproben aus allen infizierten Pflanzen zur Inokulation benutzt. Anschließend wurden die unterschiedlichen CP-Gene erneut kloniert. Von p35PPV-ZYMV wurden erneut sechs Parallelklone und von p35PPV-PVY 12 Parallelklone mittels Restriktionsverdau auf das Vorhandensein von PPV CP-Bereichen untersucht. Es konnte jedoch in keinem der Klone die PPV-CP spezifische *EcoRI* Restriktionsschnittstelle nachgewiesen werden. Die erneute Sequenzierung des Kernbereiches des CP-Gens der Chimären nach diesen Passagen ergab für beide Chimären keine Rekombination des relevanten Bereiches. Die Tab. 32 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten Inokulationsexperimente.

Nachdem die Inokulationsexperimente der beiden Chimären p35PPV-ZYMV und -PVY zu keinem Nachweis einer Rekombination in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen der Linie 17.27.4. geführt hatten, wurde die Linie 4.30.45. für die gleichen Inokulationsexperimente verwendet, welche die vollständige 3'-NTR am 3'-Ende des CP-Gen beinhaltet. Jeweils fünf Pflanzen der Linie 4.30.45. wurden mittels Partikelbombardment mit p35PPV-ZYMV und -PVY infiziert. Wie in den vorausgegangenen Experimenten mit der Linie 17.27.4. schon gezeigt, wurden beide Chimären auch in der Linie 4.30.45. komplementiert, bzw. war p35PPV-PVY nach der Komplementation in 4.30.45. in der Lage, *N. benthamiana* systemisch zu infizieren. Die Infektion wurde mittels PTA-ELISA überprüft. Ungefähr eine Woche nach dem Auftreten von Komplementationssymptomen wurde der Pflanzenpreßsaft einer Mischprobe von einzelnen Blättern aller infizierten Pflanzen auf je drei nichttransgene

N. benthamiana Pflanzen mechanisch inokuliert. Um die Rekombinationen zu identifizieren, die den Kernbereich des CP-Gens zur Wild-Typ Sequenz rekonstituiert hatten, sollte eine spezifische RT/PCR durchgeführt werden. Mit dieser PCR sollten ausschließlich rekombinante Sequenzen amplifiziert werden, die die Wild-Typ PPV-NAT CP-Sequenz zwischen *SacI* und *SpI* integriert hatten. Ein "antisense"-Primer wurde homolog zum CP Kernbereich des PPV synthetisiert (PPV-REK), der zusammen mit dem Uni-Poty-Primer in der RT/PCR nur dann zur Amplifizierung eines 932 Bp-Fragmentes führte, wenn eine rekonstituierende Rekombination stattgefunden hatte. Da der Uni-Poty-Primer homolog zu den Sequenzen des NIb war, die in der transgenen Sequenz nicht vorkommen, wurde eine Amplifikation des Transgens ausgeschlossen. Mit Hilfe dieses spezifischen Primers war es möglich, aus einer Gesamtnukleinsäurepräparation der mit PPV-ZYMV bzw. -PVY infizierten *N. benthamiana* Pflanzen, ein 932 Bp Fragment zu amplifizieren. Damit war gezeigt, daß beide Chimären in der Linie 4.30.45., zumindest in der Primerregion, nahe der *SpI*-Restriktionsschnittstelle zu PPV-NAT-Wild-Typ Sequenz rekombiniert hatten. So wurden zusätzlich aus den beiden Gesamtnukleinsäurepräparationen, mit den Primern Uni-Poty/Uni-Poly-T, beide CP-Gene amplifiziert, um neben den unvollständigen auch vollständige CP-Sequenzen klonieren zu können. Weiterhin könnten unter Umständen in parallel analysierten Klonen der Uni-Poty/Uni-Poly-T PCR-Fragmente neben den Rekombinanten noch die ursprünglichen Chimären nachgewiesen werden. Die verschiedenen PCR-Fragmente wurden in einen T-Vektor kloniert und mittels verschiedener Restriktionsenzyme analysiert.

Tab. 33: Infektiosität von p35PPV-NAT Hüllproteinchimären in transgenen 4.30.45 *N. benthamiana* Pflanzen und Infektiosität von *N. benthamiana* Pflanzen nach der Passage in 4.30.45.

PPV-NAT-Chimäre	Partikelbombardment transgene 4.30.45 *	Passage von 4.30.45. auf nichttransgene <i>N. benthamiana</i> *
p35PPV-ZYMV	2/10	6/6 (1. Passage)
p35PPV-PVY	2/5	3/3 (1. Passage)

*: Anzahl infiziert/Anzahl inokuliert

Alle fünf Parallelklone des PCR-Fragmentes des vollständigen CP-Genes der ZYMV-Chimäre enthielten die interne *EcoRI*-Schnittstelle zwischen der *SacI* und *SpI*

Restriktionsschnittstelle der PPV Wild-Typ Sequenz, die in der ZYMV Kernregion nicht vorkommt. So wurde ein Klon vom 5'-Ende ausgehend sequenziert und 910 Bp des CP-Gens bestimmt. Bis auf einen Nukleotidaustausch, der sich jedoch außerhalb der ausgetauschten Kernregion befand, wurde ausschließlich die PPV-NAT Wild-Typ Sequenz nachgewiesen. Da drei parallel erzeugte CP-Klone eines PCR-Fragmentes der PVY-Chimäre ebenfalls die interne *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle aufwiesen, wurde hier auf eine Sequenzierung verzichtet. Es konnte davon ausgegangen werden, daß auch hier die PPV Wild-Typ Sequenz wiederhergestellt worden war.

4.6 Nachweis der RNA-RNA Rekombination

Die durchgeführten Untersuchungen zum Auftreten von Rekombination, zwischen verschiedenen Defektmutanten des PPV-NAT und intaktem CP-Gen in transgenen *N. benthamiana* in der transgenen Linie 4.30.45., ermöglichen keine Aussage über die Art der aufgetretenen Rekombination. Prinzipiell sind zwei verschiedene Arten der Rekombination möglich. Die erste ist eine RNA-RNA Rekombination, deren Ursache, wie in der Einleitung beschrieben, wahrscheinlich ein Template-Wechsel des viralen Replikationskomplexes darstellt. Da in dieser Arbeit ausschließlich mit cDNA-Klonen des PPV-NAT gearbeitet wurde, könnten die nachgewiesenen Rekombinationen im Prinzip auch eine Folge einer DNA-DNA Rekombination einer pflanzlichen Rekombinase sein. Sollte dies der Fall sein, wären die Ergebnisse zumindest für die Rekombinationsuntersuchungen an transgenen virusresistenten Pflanzen nicht aussagekräftig. Es war daher notwendig, nachzuweisen, ob hier eine RNA-RNA- oder eine DNA-DNA-Rekombination vorlag. Zu diesem Zweck wurde eine Assemblierungsmutante des p35PPV-NAT (CP-RQ-D) mittels Partikelbombardment in transgene *N. benthamiana* Pflanzen der Linie 17.27.4. eingebracht. Wie unter 4.5.1.5 und 4.5.3.4 bereits gezeigt, fand in dieser Linie nur eine Komplementation der verschiedenen Mutanten, und keine Rekonstitution über Rekombination, statt. Von dem cDNA Klon wurde ein *in-vivo* Transkript hergestellt und die virale RNA mit transgenem CP heterolog enkapsidiert. Anschließend wurde aus systemisch infizierten Blättern eine Passage von komplementiertem PPV-NAT-CP-RQ-D auf *N. benthamiana* Pflanzen der Linie 4.30.45., die eine Rekombination ermöglichte, durchgeführt. Eine parallel durchgeführte Inokulation von nichttransgenen *N. benthamiana* Pflanzen sollte zeigen, daß in Pflanzen der Linie 17.27.4. tatsächlich keine rekonstituierende

Rekombination stattgefunden hatte. Wie im Kapitel 4.5.1.5 schon angegeben sollte die Rekombination nach der Passage von Pflanzen der Linie 4.30.45. auf nichttransgene *N. benthamiana* Pflanzen nachgewiesen werden.

Fünf transgene *N. benthamiana* Pflanzen (Linie 17.27.4.) wurden mit der Mutante p35PPV-NAT-CP-RQ-D mittels Partikelbombardment infiziert. Eine Pflanze zeigte nach etwa drei Wochen die typischen Komplementationssymptome. Der Preßsaft der infizierten Pflanze wurde auf jeweils fünf transgene (Linie 4.30.45.) und nichttransgene *N. benthamiana* Pflanzen mechanisch inokuliert. Nur in drei der fünf transgenen Pflanzen (Linie 4.30.45.) konnte ein Auftreten von Symptomen beobachtet werden. Die nichttransgenen Pflanzen blieben virusfrei, wie anhand der fehlenden Symptome beobachtet und im PTA-ELISA (AS 568 HCpro) gezeigt werden konnte. Mit einer Preßsaftinokulation von fünf nichttransgenen *N. benthamiana* Pflanzen aus jeder der infizierten Pflanzen war es möglich, nichttransgene *N. benthamiana* Pflanzen zu infizieren. Wie unter 4.5.1.5 angegeben, wurde das rekombinante CP-Gen amplifiziert und kloniert. Mittels Restriktionsverdau wurde das Vorhandensein der eingefügten Restriktionsschnittstellen überprüft (*AatII*, *BglII*). Als Positivkontrolle wurde pe35SL-NAT-CP-RQ-D verdaut. Die Schnittstellen konnten nicht nachgewiesen werden, so daß von einer Rekonstitution der PPV Wild-Typ Sequenz ausgegangen wurde.

4.7 Herstellung eines Systems zur Erzeugung und Überprüfung von viralen *in-vivo* Rekombinanten

Die Untersuchung von Rekombinationen zwischen Viren und transgenen Sequenzen viraler Herkunft erfordert die Herstellung von transgenen Pflanzen. Dieses relativ zeitaufwendige Verfahren mußte bisher bei der Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher viraler Sequenzen auf die Rekombinationshäufigkeit für jede virale Sequenz durchgeführt werden. Einige virale Sequenzbereiche unterstützen als transgene Sequenz die Rekombination mit viralen Defektmutanten stärker als andere, das heißt ein häufigeres oder weniger häufiges Auftreten von rekonstituierenden Rekombinationsereignissen konnte beobachtet werden. Dies wurde bei den Untersuchungen zur Rekombination der p35PPV-NAT Assemblierungsmutanten und der p35PPV-NAT-Chimären in den verschiedenen CP-transgenen Linien 17.27.4. (unvollständige 3'-NTR) und 4.30.45. (vollständige 3'-NTR) deutlich (siehe 4.5.1.5 und 4.5.3.4).

Die transiente Expression von viralen Genen in Pflanzen, die gleichzeitig mit viralen Defektmutanten infiziert werden, bietet unter Umständen eine Möglichkeit Rekombinationen nachzuweisen und die damit verbundenen Mechanismen näher zu untersuchen, ohne transgene Pflanzen herstellen zu müssen. Morozow *et al.* (1997) zeigten, daß zwei unterschiedliche pflanzliche Expressionsplasmide gemeinsam auf dem Trägermaterial Wolfram präzipitiert und für Expressionsstudien mittels Partikelbombardment in einer Pflanzenzelle zur Expression gebracht werden können. Gal-On *et al.* (1998) berichteten von rekonstituierenden Rekombinationen zweier defekter ZYMV "full-length" Klone, die nach der Co-Präzipitation in einzelne Pflanzenzellen bombardiert worden waren.

Somit wurden zum Zweck des Nachweises von rekonstituierenden Rekombinationen 20 nichttransgene *N. benthamiana* Pflanzen über ein Co-Bombardment mit dem Pflanzenexpressionsplasmid pe35SL-NAT-CP, welches das intakte CP-Gen des PPV-NAT unter Kontrolle des eukaryontischen 35S-Promotors enthält, zusammen mit dem Plasmid p35PPV-CP-RQ-D inokuliert (siehe 4.5.1.1 und 8.2). Nach der Hypothese sollten vom pe35SL-NAT-CP, ausgehend vom 35S-Promotor, transient CP-Transkripte erzeugt werden. Diese könnten über Rekombination des viralen Replikase-Komplexes die Assemblierungsmutante p35PPV-CP-RQ-D über homologe Rekombination rekonstituieren. Die Defektmutante wäre wieder in der Lage, *N. benthamiana* systemisch zu infizieren. Also würde ein systemisches Auftreten von PPV-Symptomen die erfolgte Rekombination anzeigen. Dieses Experiment blieb jedoch erfolglos. Es konnte bei keiner der inokulierten Pflanzen ein Auftreten von PPV-Symptomen beobachtet werden. Da die transiente Expression nur von kurzer Dauer ist, weil keine stabile Integration ins Pflanzengenom erfolgt, wurde eine andere Strategie entwickelt.

Die Sequenz von Interesse, also das intakte PPV-CP Gen, sollte von einem pflanzlichen Expressionsvektor viraler Herkunft in den Pflanzen transkribiert werden. Nach der Hypothese sollten mit der PVX-Replikation weitaus größere Mengen des PPV-CP-Transkriptes hergestellt werden, als durch transiente Expression.

Zu diesem Zweck wurde der Expressionsvektor pPVX201 (Chapman *et al.*, 1992) eingesetzt. In diesen Pflanzenexpressionsvektor kann eine beliebige Sequenz unter Kontrolle des zusätzlich vorhandenen subgenomischen Promotors des CP gebracht und in Pflanzen transkribiert werden. Ein Co-Bombardment mit dem entsprechend mutierten p35PPV-NAT und dem chimären pPVX könnte zu ähnlichen Rekom-

binationsereignissen führen, wie sie in transgenen Pflanzen mit PPV-Defektmutanten beobachtet worden sind (siehe 4.5.1.5 und 4.5.3.4). Um zu verhindern, daß sich das chimäre PVX in der beschossenen Pflanze systemisch ausbreitet und damit das direkte Erkennen des Auftretens von rekombinanten intakten Viren des p35PPV-NAT unmöglich macht, sollte die Ausbreitungsfunktion des pPVX zerstört werden.

In vorhergehenden Arbeiten war eine hohe Rekombinationsrate zwischen assemblierungsdefekten p35PPV-NAT (CP-RQ, -D, RQ-D) und dem intakten transgenen CP-Gen mit vollständigem 3'-Ende in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen nachgewiesen worden (4.5.1.5.). Um dieses Rekombinationsexperiment in diesem veränderten System zu reproduzieren, sollte das intakte PPV-CP mit vollständigem 3'-NTR in den pflanzlichen Expressionsvektor pPVX201 kloniert werden. Anschließend sollten nichttransgene *N. benthamiana* über Co-Bombardment mit den p35PPV-CP-Assemblierungsmutanten und dem ausbreitungsdefizienten pPVX-CP-NAT inokuliert werden.

Die drei verschiedenen p35PPV-NAT-Assemblierungsmutanten waren bereits vorhanden (siehe 4.5.1). Von diesen Klonen wurde Plasmidmaterial in größeren Mengen für das Partikelbombardment hergestellt.

Zuerst mußte die Fähigkeit zur systemischen Ausbreitung von pPVX201 zerstört werden. Dies sollte über Einfügen einer Leserastermutation erfolgen. Zu diesem Zweck konnte eine Restriktionsschnittstelle *Bsp120I*, die sich im M1-Gen des PVX befindet, mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt werden. Das M1-Gen stellt eins der drei Gene des "triple gene block" (TGB) dar, die für die systemische Ausbreitung des PVX in der Pflanze verantwortlich sind (Beck *et al.*, 1991). Der erzeugte Leserasterwechsel führt zu einem Stopcodon. Damit bleibt das pPVX201-*Bsp120I* auf die erstinfizierte Zelle beschränkt (Angell *et al.*, 1996) Diese ausbreitungsdefiziente Leserastermutante des pPVX201 wurde bereits von Morozow *et al.* (1997) erfolgreich für Komplementationsstudien mittels Partikelbombardment verwendet.

Im nächsten Schritt sollte das unmutierte CP-Gen mit der vollständigen 3'-NTR des PPV-NAT in pPVX201-*Bsp120I* kloniert werden. Dies erfolgte nach der gleichen Strategie wie unter 4.2.2.1 beschrieben. Das Konstrukt pPVX201-*Bsp120I*-CP-NAT wurde zu Co-Bombardmentversuchen mit den verschiedenen p35PPV-NAT mit defektem CP (CP-RQ, -D, -RQ-D) auf nichttransgene *N. benthamiana* Pflanzen eingesetzt.

Mit allen drei Defektmutanten (p35PPV-CP-Q, CP-D, CP-RQ-D) konnte bei einzelnen

beschossenen Pflanzen (Tab. 34) mittels ELISA eine systemische Infektion mit dem PPV festgestellt werden.

Aus Blattmaterial der mit p35PPV-NAT-CP-RQ-D und chimärem pPVX inokulierten Pflanzen wurde Gesamt-RNA hergestellt. Unter Verwendung der RT/PCR und den Primern Uni-Poty/Uni-Poly-T konnte ein PCR-Fragment des rekombinanten CP-Gens erzeugt, kloniert und sequenziert werden. Mit dem Uni-Poty-Primer, der homolog zu Nlb-Sequenzen des PPV ist, konnte sichergestellt werden, daß keine Amplifikation im pPVX-Bsp120I-CP-NAT möglich war. Alle drei Assemblierungsmutanten CP-RQ, CP-D und CP-RQ-D waren zur Wildtyp-Sequenz des CP-NAT restauriert worden. Aufgrund eines fehlenden sequenzspezifischen Markers konnte anhand der Sequenz nicht nachgewiesen werden, an welcher Stelle des Gens der vermutete "template switch" des viralen Replikationskomplexes aufgetreten war. Die Rekombinanten, die aus dem Bombardment der beiden anderen p35PPV-NAT Assemblierungsmutanten hervorgegangen waren (CP-RQ und CP-D), wurden ebenfalls kloniert, jedoch nicht sequenziert, da auch hier von einer exakten Rekonstitution des PPV Wildtyp-CP-Gens ausgegangen werden konnte. Die Ergebnisse der einzelnen Co-Bombardmentversuche der Assemblierungsmutanten mit den entsprechenden Negativkontrollen sind in Tab. 34 zusammengefaßt. Dieses Ergebnis zeigte, daß die prinzipielle Möglichkeit besteht, *in-vivo* Rekombinante herstellen zu können. Bei diesen Rekombinanten handelte es sich jedoch ausschließlich um rekonstituierte PPV-NAT mit der Wild-Typ Sequenz. Es fehlte der Nachweis eines Rekombinationsmarkers und der Nachweis, daß auch eine nicht 100 %-ige Homologie der einzelnen Sequenzen ausreichend ist, um eine intakte *in-vivo* Rekombinante zu erzeugen. Somit war das Ziel weiterer Rekombinationsuntersuchungen, die PPV-CP-Sequenz im chimären pPVX Expressionsvektor mit einem sequenzspezifischen Marker zu versehen, der nach erfolgtem Co-Bombardment einen eindeutigen Nachweis des Rekombinationsereignisses ermöglichen sollte.

Zu diesem Zweck wurde das CP-Gen des Sauerkirschisolates des PPV (PPV-SoC) gewählt. Es besitzt eine 81 %-ige Sequenzhomologie zum CP des PPV-NAT Isolates (DNASIS Ver. 2.0). Mit Hilfe des Gens des CP-SoC sollte untersucht werden, ob das intakte CP-SoC Gen in pPVX-Bsp120I über Rekombination eine Assemblierungsmutante des p35PPV-NAT in *N. benthamiana* Pflanzen rekonstituieren könnte. Bei einer auftretenden Rekombination könnte, unter Umständen anhand der Nukleotidaustausche, auch der Ort des Rekombinationsereignisses eingegrenzt werden.

Zu diesem Zweck wurde das vollständige Gen des CP-SoC in pPVX-*Bsp120I* kloniert. Das vollständige Gen des CP-SoC mit der vollständigen 3'-NTR des PPV-SoC lag kloniert in dem Plasmid pPCRII-PPV-SoC-CP vor. Es wurde mit den Enzymen *SacI/XbaI* in pT7T319U *SacI/XbaI* umklontiert, um anschließend mit Hilfe der Enzyme *ClaI/SalI* in pPVX-*Bsp120I* umklontiert werden zu können (Produkt: pPVX-*Bsp120I*-CP-SoC). Von dem Klon wurden größere Mengen der Plasmid-DNA zum Zweck des Partikelbombardments hergestellt. Der Klon des pPVX-*Bsp120I*-CP-SoC und der Assemblierungsmutante p35PPV-NAT-CP-RQ-D wurden zum Co-Bombardment auf *N. benthamiana* Pflanzen eingesetzt. Von den 150 beschossenen Pflanzen konnte bei einer Pflanze ein Auftreten von systemischen PPV-Symptomen beobachtet werden (siehe Tab. 34).

Tab. 34: Ergebnisse des Co-Bombardments verschiedener p35PPV-NAT Hüllproteindefektmutanten mit pe35SL-NAT-CP oder pPVX-*Bsp120I*-CP-NAT

p35PPV-NAT Mutante	Partikelbombardment <i>N. benthamiana</i> *
p35PPV-CP-RQ-D + pe35SL-NAT-CP	0/20
p35PPV-CP-RQ + pPVX- <i>Bsp120I</i> -CP-NAT	1/40
p35PPV-CP-D + pPVX- <i>Bsp120I</i> -CP-NAT	2/30
p35PPV-CP-RQ-D + pPVX- <i>Bsp120I</i> -CP-NAT	6/40
p35PPV-CP-RQ-D + pPVX- <i>Bsp120I</i> -CP-SoC	1/150
pPVX- <i>Bsp120I</i> -CP-NAT (Negativkontrolle)	0/5
p35PPV-CP-RQ-D (Negativkontrolle) (siehe auch 4.5.1.2)	0/15

*: Anzahl infiziert/Anzahl inokuliert

Die Präparierte Gesamt-RNA wurde zur RT-PCR mit den Primern Uni-Poty/ Uni-Poly-T und anschließender Klonierung des rekombinanten CP-Gens eingesetzt. Das klonierte CP-Gen wurde vom 3'-Ende her sequenziert. Dabei konnten die letzten 841 Bp des Gens inklusive der 3'-NTR bestimmt werden. Ein Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenz mit beiden unterschiedlichen CP-Genen (CP-NAT und CP-SoC) mit Hilfe des Programmes ClustalX ist im Anhang 8.8.41 angegeben. Der Vergleich zeigte anhand der verschiedenen nachgewiesenen Nukleotidaustausche, daß

wahrscheinlich ein Bereich zwischen 285 bis 307 Bp des CP-Kernbereiches, in dem sich die beiden Assemblierungsmutationen (RQ-DV und DF-KI) befanden, durch die CP-SoC Sequenz ersetzt wurde (mit \square gekennzeichnet). Dabei wurden, zusätzlich zu den rekonstituierten Assemblierungsmutationen, 27 weitere Nukleotidaustausche nachgewiesen. Wird dieser Bereich als vollständig durch die CP-SoC Sequenz ersetzt angenommen, so würden die unterschiedlichen Nukleotidaustausche des Bereiches nur zu einem Austausch zur PPV-Wild-Typ Sequenz auf Aminosäureebene führen (R zu L, durch \supseteq gekennzeichnet, durch G-T verursacht). Der Vergleich der Aminosäuren des sequenzierten Bereiches mit CP-NAT und CP-SoC zeigt jedoch, daß gerade an dieser Stelle die Aminosäure R, statt wie erwartet, L zu finden ist, welches der CP-NAT Aminosäuresequenz und nicht der rekombinanten CP-SoC Aminosäuresequenz entspricht. Der Rest des sequenzierten Bereiches entspricht zu 100 % der PPV-NAT Wild-Typ Sequenz.

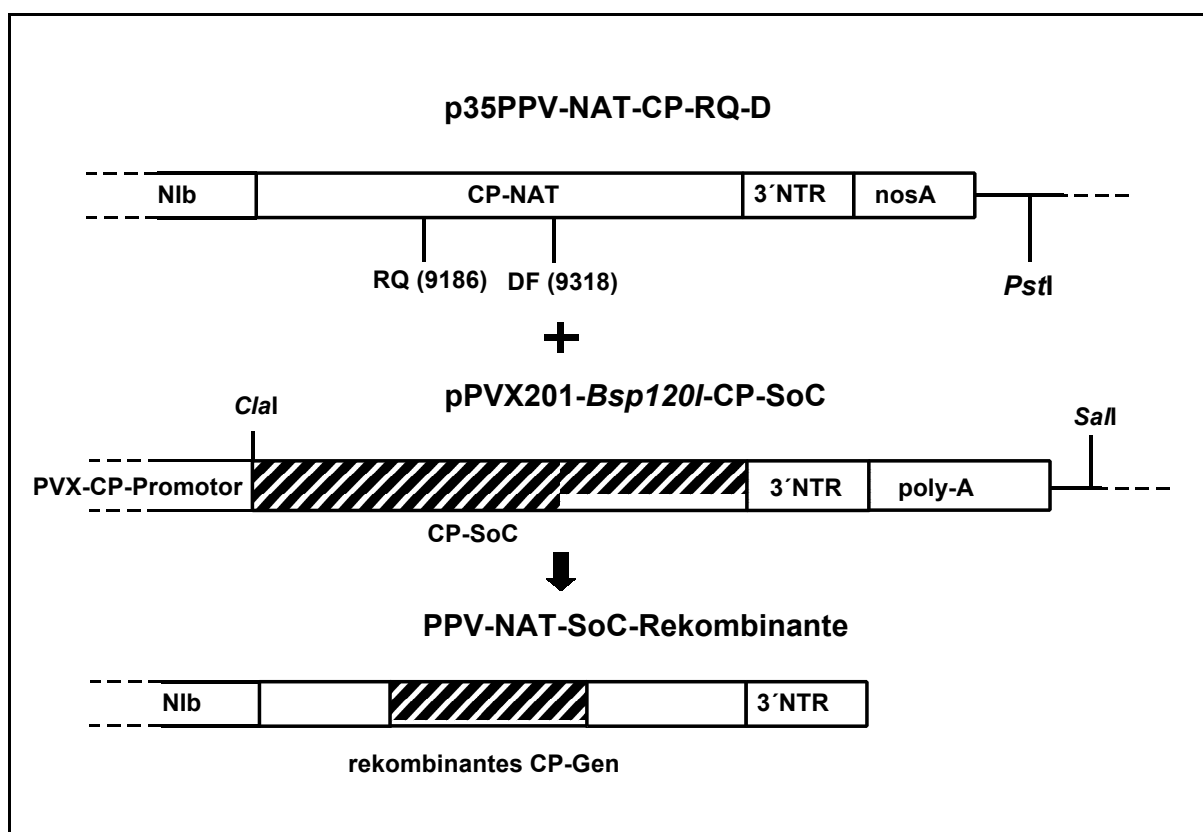


Abb. 20: Rekonstitution von PPV-NAT-CP-RQ-D mit vom PVX exprimierten CP-SoC Gen in *N. benthamiana* Pflanzen zu einer intakten Chimäre

Diese PPV-NAT-SoC-Chimäre wurde schon nach dem Bombardment von 40 Pflanzen nachgewiesen. Durch den Beschuß von weiteren 110 Pflanzen konnte ein gleiches oder ähnliches Rekombinationsereignis, welches zu einer nachweisbaren Chimäre geführt hätte, nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse stellen den ersten Nachweis der homologen Rekombination zwischen einem chimären Virus (pPVX201-CP-SoC) und einer viralen Defektmutante (p35PPV-CP-RQ-D) *in-vivo* dar, der zu einer ausbreitungsfähigen Viruschimäre geführt hat.

Die Abb. 20 verdeutlicht das Ergebnis der Sequenzierung der CP-NAT-SoC Rekombinante.

5 DISKUSSION

5.1 Untersuchung von transgenen virusresistenten *N. benthamiana* Pflanzen mit modifizierten Genen des PPV-NAT

Pflanzentransformation und Regeneration

Alle Konstrukte der verschiedenen mutierten CP- und HCpro-Gene in den binären Plasmiden führten, bei nur 60 transformierten Blattscheiben für jedes Konstrukt, aufgrund der relativ leichten Transformierbarkeit von *N. benthamiana*, zu regenerierten Pflanzen. Diese Pflanzen zeigten eindeutige Markerreaktionen bezüglich der *gus*-Aktivität und Kanamycinresistenz (4.1.4). Dabei wurden zwischen 10 - 23 Pflanzen aus den jeweiligen CP-Konstrukten und 12 - 16 Pflanzen aus den jeweiligen HCpro-Konstrukten regeneriert. Dies könnte ein Hinweis auf den Einfluß der unterschiedlichen viralen Sequenz (CP- und HCpro-Gen) auf die Transformierbarkeit und die Regenerationsfähigkeit bei Agrobakterien vermittelter Transformation sein. Auffällig ist, daß gerade das N-terminal verkürzte CP-Gen zu deutlich mehr (23) regenerierten Pflanzen führte. Die geringe Anzahl der transformierten Blattscheiben läßt jedoch trotz Gleichbehandlung keine eindeutige Aussage zu. Die Literatur liefert ebenfalls keine Anhaltspunkte zur Transformationseffizienz in Abhängigkeit von der zu transformierenden Sequenz. Das Ziel der Transformationsexperimente war die Erzeugung von möglichst vielen transgenen Regeneraten, um ausreichend Material zur Erzeugung von T1- und T2-Generation zur Resistenztestung zu erhalten.

Modifizierte virale Gene und Resistenzwirkung

Alle modifizierten Gene des PPV (HCpro und CP) waren trotz der eingefügten Mutationen oder Verkürzung noch in der Lage in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen Resistenz gegenüber PPV-NAT zu erzeugen (4.1.5). Diese Ergebnisse stützen die Untersuchungen von Pang *et al.* (1997), die mit verkürzten Sequenzabschnitten des TSWV N-Gens in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen Resistenz erzeugen konnten. Auch Lindbo & Dougherty (1992b) konnten mit einem translatierbaren CP des TEV, mit einer N-terminalen Verkürzung von 29 Aminosäuren, Resistenz in transgenen Pflanzen erzeugen. In einem ähnlichen Versuchsansatz deletierten Jacquet *et al.* (1998a) die im CP-Gen des PPV für die Assemblierung verantwortlichen Motive RQ und D und konnten damit, trotz der Modifikationen in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen,

Resistenz gegenüber dem PPV erzeugen. Jacquet *et al.* (1998b) entfernten im CP des PPV das DAG Motiv und in einem zweiten Konstrukt die N-terminalen 140 Aminosäuren des CP. Auch in diesen Fällen konnte eine Resistenz gegenüber dem PPV erzeugt werden. Alle diese hier erwähnten Ergebnisse, wie auch die Untersuchungen in dieser Arbeit, unterstützen die Ergebnisse von Sijen *et al.* (1996), die zeigen konnten, daß schon ein Teil eines viralen Gens ausreichend sein kann, um den Resistenzmechanismus auszulösen.

Überprüfung der Resistenzwirkung gegenüber dem PPV

Die durch die verschiedenen Gene vermittelte Resistenz, in den neu erzeugten transgenen *N. benthamiana* Pflanzen, wurde in dieser Arbeit ausschließlich qualitativ überprüft. Es fand eine mechanische Virusinokulation der transgenen Testpflanzen aus Pflanzenpreßsäften statt. Diese Preßsäfte hatten unbekannte Viruskonzentrationen. Da in *N. benthamiana* jedoch sehr hohe Virustiter erreicht werden, kann davon ausgegangen werden, daß die Resistenztestungen unter hohem Infektionsdruck durchgeführt worden sind. Die Viruskonzentration war in jedem Fall so hoch, daß nichttransgene *N. benthamiana* Kontrollpflanzen und auch Recovery-resistente Pflanzen der Linie 17.27.4 zu 100 % infiziert werden konnten. Es wurde eine sehr hohe Preßsaftkonzentration (Verdünnung 1/5) für die Inokulation gewählt. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen zur Resistenzbestimmung mit Potyviren, war dies eine hohe Inokulumkonzentration. Fang & Grumet (1993) testeten transgene Pflanzen mit einer 1/50-Preßsaftverdünnung von ZYMV, Farinelli & Malnoe (1993) verwendeten eine 1/10-Preßsaftverdünnung von PVY und Linbo & Dougherty eine 1/50-Verdünnung von TEV zur Resistenztestung von transgenen Pflanzen. Maiti *et al.* (1993) erzeugten TVMV-NIb transgene Pflanzen und untersuchten den Einfluß von verschiedenen Inokulumdichten auf die Resistenzreaktion. Die Konzentrationen von 1-50 µg viraler TVMV RNA/ml Inokulum hatten keinen Einfluß auf die Resistenzreaktion der TVMV resistenten Pflanzen. Um die Resistenztestungen der T₁- und T₂-Generation unter starker Selektion durchzuführen, wurden grundsätzlich sehr junge Pflanzen mit einem Alter von 3-4 Wochen verwendet, wobei die nichttransgenen Kontrollpflanzen teilweise mit nekrotischen Reaktionen auf die systemische PPV-Infektion reagierten und abstarben. Aus diesen unterschiedlichen Gründen kann davon ausgegangen werden, daß hier mit einer hohen Inokulumdichte die Resistenz der neu erzeugten transgenen *N. benthamiana* Pflanzen gegenüber dem PPV

überprüft wurde.

Die visuellen Bonituren der Resistenzreaktionen der Pflanzen der einzelnen Linien ließen keinen Unterschied zu parallel inokulierten *N. benthamiana* Pflanzen der transgenen Linie 17.27.4., 4.30.45. und 4.30.60., die mit unmodifizierten CP-Genen des PPV transformiert worden waren, erkennen. Auch zeigten die Pflanzen dieser jeweiligen transgenen Linien das gleiche Resistenzphänomen, wie von den Autoren ursprünglich beschrieben.

Resistenztyp und Resistenzmechanismus

Mit den verschiedenen verwendeten translitierbaren CP- und HCpro-Genen wurden in transgenen *N. benthamiana*, sowohl in der T₁- wie auch in der T₂-Generation, zwei unterschiedliche Resistenzphänomene beobachtet. Einige Linien waren gegenüber einer PPV-Infektion immun, andere waren gegenüber der PPV-Infektion durch mechanische Inokulation empfänglich. Sie erholten sich jedoch zwei bis drei Wochen nach dem Auftreten der ersten systemischen Symptome von der Infektion, welches durch einen symptomfreien Neuaustrieb deutlich wurde (Infektions- und Recovery-Resistenz). Bemerkenswert ist, daß diese unterschiedlichen Resistenzphänomene zum Teil in einer Linie der T₁-Generation (7.8., 21.5., 21.16., 24.7., 27.14., 27.21., 30.20. und 30.30.) nachzuweisen waren. Dies kann wahrscheinlich auf die Heterozygotie des Transgens der T₁-Generation zurückgeführt werden. Weitere Untersuchungen zur Aufspaltung transgener Insertionen bei der Erzeugung der T₁-Generation wurden jedoch nicht durchgeführt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß der Zusammenhang zwischen der Resistenzreaktion der T₁- und der T₂-Generation von dem verwendeten viralen Gen abzuhängen scheint. Wie im Kapitel 4.1.6 Tab. 20 gezeigt, war nur bei dem CP-Gen ein direkter Zusammenhang zwischen der Resistenzreaktion der T₁- und der daraus erzeugten T₂-Generation nachzuweisen. Die homozygoten T₂-Generationen der HC-Konstrukte zeigten nicht die gleiche Resistenzreaktion wie die jeweiligen T₁-Eltern. Um einen Zusammenhang zwischen dem verwendeten Transgen und der Resistenzreaktion der T₁- und T₂-Linien näher untersuchen zu können, müßten weitere Transformationsversuche mit verschiedenen Genen durchgeführt werden. In der Literatur finden sich keine Anhaltspunkte für derartige Zusammenhänge.

Auch innerhalb der nachgewiesenermaßen homozygoten T₂-Generation der verschiedenen Konstrukte zeigten nicht alle Pflanzen einer Linie eine uniforme

Resistenzreaktion bei der Infektion mit dem PPV. Viele CP- und HCpro-transgene T₂-Linien zeigen zwar in allen untersuchten Pflanzen eine PPV-Resistenz, jedoch waren einige Pflanzen Recovery-resistent, andere wiesen eine Infektions-Resistenz auf. Dies könnte unter Umständen, trotz hoher Inokulumdichte, von einer ungleichmäßigen Inokulation beim Resistenztest hervorgerufen worden sein. Wenn auch in diesem Fall vom Resistenzmechanismus des posttranskriptionalen "gene-silencing" ausgegangen wird, ist vorstellbar, daß bei unterschiedlicher Anzahl erstinfizierter Zellen bei der Inokulation der Grenzwert der RNA-Konzentration, der zu einer sequenzspezifischen Degradation führt, durch die virale Vermehrung, früher oder später nach der Inokulation erreicht wird. Damit würden Pflanzen, bei denen der Degradationsmechanismus später einsetzt, schon systemische Symptome aufweisen, während bei anderen Pflanzen der Mechanismus schon vor dem Einsetzen der Symptome wirksam wurde. Damit wären diese inhomogenen Resistenzreaktionen erklärbar. Weitere Untersuchungen zur Virusvermehrung während der Zeit zwischen Infektion und dem Auftreten von systemischen Symptomen könnten hier zu genaueren Aussagen führen.

Um den Resistenzmechanismus der homozygoten T₂-Linien näher zu untersuchen, wurden die in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind kritisch zu beurteilen, da, wie schon im Ergebnisteil gezeigt, zusätzlich eingefügte Sequenzen in das pPVX201 über Rekombination wieder aus dem Virusgenom eliminiert wurden. Obwohl das verwendete System des Pflanzenexpressionsvektors pPVX201 aufgrund der hohen Rekombinationsrate fehlerbehaftet ist, lassen die Ergebnisse der Infektionsversuche, über den Vergleich mit den Arbeiten von English *et al.* (1996), die Schlußfolgerung zu, daß die Resistenz gegenüber dem PPV wahrscheinlich auf das in der Einleitung beschriebene PTGS zurückzuführen ist. Dies gilt in jedem Fall für die mit höheren Pflanzenzahlen untersuchten Infektions-resistenten CP-transgenen, die ebenfalls in hohem Maße eine Infektions-Resistenz gegenüber dem pPVX mit chimärem PPV-CP-Gen aufwiesen. Ob die Resistenz der Recovery-resistenten Linien der CP-Konstrukte ebenfalls auf diesen Resistenzmechanismus zurückzuführen ist, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht abschließend beurteilt werden. Beide unabhängigen Versuche zeigen, daß Recovery-resistente *N. benthamiana* Linien vom entsprechenden pPVX zu weit höheren Anteilen infiziert wurden, als Linien, die eine Infektions-Resistenz aufwiesen. Dies könnte bedeuten, daß entweder die Recovery-Resistenz nicht auf einem

sequenzspezifischen Degradationsmechanismus beruht oder im chimären pPVX die entsprechende homologe Sequenz vor dem Einsetzen des Resistenzmechanismus über Rekombination entfernt wurde. Dies könnte erklären, warum in diesen Linien gegenüber dem chimären pPVX keine Recovery-Resistenz beobachtet werden konnte. Auch Sijen *et al.* (1996) berichteten von vergleichbaren Rekombinationen in pPVX201 mit einer zusätzlichen Insertion.

Es liegen jedoch verschiedene Untersuchungen vor, in denen vergleichbare Resistenzphänomene nachgewiesen werden konnten, die ebenfalls über den Mechanismus einer sequenzspezifischen RNA-Degradation erklärt werden konnten. Lindbo & Dougherty (1992b) beobachteten vergleichbare Resistenzphänomene mit dem translatierbaren CP des TEV in transgenen Pflanzen. Die Autoren hatten auch ein CP mit einer N-terminalen Deletion von 29 Aminosäuren untersucht und dabei sowohl Recovery- wie auch Infektions-Resistenz erhalten. Jacquet *et al.* (1998) erzeugten ebenfalls PPV-CP transgene *N. benthamiana* Pflanzen, die beide Resistenztypen aufwiesen. In den Recovery-resistenten Linien ging die Resistenzreaktion mit der Regulation des mRNA- und Protein-Gehaltes einher. In Infektions-resistenten Linien konnte nur sehr wenig oder überhaupt keine transgene mRNA detektiert werden. Ling *et al.* (1991), Fang & Grumet (1993) sowie Lindbo *et al.* (1993) verwendeten potyvirale CP-Sequenzen zur Erzeugung von Pathogen -vermittelter Resistenz und berichteten vom gleichen Recovery-Resistenzphänomen. Lindbo *et al.* (1993) fanden ein vergleichbares Resistenzphänomen in transgenen Tabakpflanzen, die mit dem translatierbaren CP-Gens des TEV transformiert worden waren. Nach der Infektion und der Recovery-Reaktion konnten die Autoren keine TEV Viruspartikel mehr im symptomfreien Neuaustrieb nachweisen (DAS-ELISA, Blattlausübertragung). Sie waren aber in der Lage, über Pfropfexperimente aus infizierten Recovery-Pflanzen nichttransgene Tabakspresse zu infizieren. Die Resistenzreaktion induzierte im Neuaustrieb eine Infektionsresistenz. Der Resistenzmechanismus war auch auf Protoplastenebene wirksam, das heißt eine Replikation des TEV wurde unterdrückt. Die Untersuchungen der transgenen Expression zeigten, daß in Recovery-Gewebe kein transgenes CP mehr nachzuweisen war. Auch der CP-mRNA Gehalt war stark reduziert. Die Autoren schlußfolgerten, daß die Resistenz auf der RNA-Ebene wirksam sein könnte, und die virale wie auch die transgene mRNA nach Infektion sequenzspezifisch abgebaut werden. Dougherty *et al.* (1994) berichteten von den gleichen Resistenzphänomenen, wie sie auch in dieser Arbeit gefunden wurden. In

dem Fall wurden jedoch ausschließlich nichttranslatierbare CP-Gene des TEV verwendet. Auch dort wurde der umgekehrte Zusammenhang zwischen der mRNA-Konzentration des Transgens und der Resistenzreaktion gefunden. Dabei konnte ebenfalls in Infektions-resistenten Linien weniger Transkript nachgewiesen werden, als in den Recovery-resistenten Linien. Die Autoren nahmen für die nichttranslatierbaren Konstrukte, wie für die oben erwähnten translatierbaren Konstrukte, den gleichen Resistenzmechanismus an. Zwischen den Infektions- und Recovery-resistenten Linien bestünde nach den Autoren nur der Unterschied, daß der Resistenzmechanismus bei den Recovery-resistenten Linien erst nach der viralen Infektion aktiviert wird.

Smith *et al.* (1994) verwendeten translatierbare, nichttranslatierbare und antisense Konstrukte des PVY CP-Gens zur Pflanzentransformation. Sie berichteten in keinem Fall vom Auftreten einer Recovery-Resistenz. Hier wurden jedoch nur Linien mit nichttranslatierbaren CP-Genen auf Transkript-Konzentration untersucht. Es wurde ebenfalls ein umgekehrter Zusammenhang zwischen Transkriptkonzentration und Resistenz beobachtet. Somit schlußfolgerten die Autoren, wie schon in der Einleitung erwähnt, daß ein RNA-Degradationsmechanismus oberhalb eines Schwellenwertes der RNA-Konzentration die transgene mRNA, wie auch die virale RNA, abbaut.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden keine Untersuchungen zur Bestimmung der transgenen Transkriptkonzentration durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl der Arbeiten zur Resistenzzeugung mit potyviralen CP-Genen, die zum direkten Vergleich zur Verfügung stehen, kann jedoch geschlossen werden, daß auch die Recovery-Resistenz über den Mechanismus des PTGS gesteuert wird. Der Resistenzmechanismus setzt nur erst nach der systemischen Infektion, wahrscheinlich nach Überschreitung einer gewissen viralen RNA-Konzentration, ein.

Beim Gen der HCpro des PPV handelt es sich um ein Nichtstrukturgen. Mit den unterschiedlich modifizierten translatierbaren HCpro-Genen konnten in dieser Arbeit vergleichbare Resistenzphänomene wie mit den CP-Konstrukten erzeugt werden. Die visuell bonitierten Resistenzreaktionen unterschieden sich in keiner Weise voneinander. Auch die HCpro-transgenen, Infektions-resistenten Linien ließen eine Schutzwirkung gegenüber dem pPVX-HCpro erkennen, obwohl nur geringe Pflanzenzahlen untersucht wurden. Wenn überhaupt ein Unterschied zwischen viralen Genen mit unterschiedlichen Funktionen besteht und kein genereller ausschließlich sequenzspezifischer Mechanismus von vornherein angenommen werden kann, sollten

zum Vergleich Arbeiten herangezogen werden, in denen ebenfalls potyvirale Nichtstrukturgene zur Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz verwendet wurden. Korte *et al.* (1995) verwendeten neben den CP-Konstrukten auch das translatierbare Nichtstrukturgene des CI und beobachteten sowohl Infektions- wie auch Recovery-Resistenz. Guo & Garcia (1997) verwendeten ebenfalls ein translatierbares Nichtstrukturgene des PPV (Nib) zur Resistenzherstellung in *N. benthamiana* Pflanzen. Auch hier wurde das Recovery-Phänomen beobachtet und untersucht. In den symptomfreien neuausgetriebenen Blättern konnte mittels ELISA und Lokalläsionenuntersuchungen nach und nach weniger Virus, nach Einsetzen der Recovery -Reaktion, nachgewiesen werden. Das transgene Transkript war nachweisbar, wurde jedoch nach der Infektion mit dem PPV drastisch reduziert. Moreno *et al.* (1998) fanden bei der Verwendung der translatierbaren P1 und P3 des TVMV Infektions- und Recovery-resistente Tabak-Linien. In diesen Untersuchungen konnte in den transgenen Pflanzen, die das Recovery-Phänomen zeigten, transgenes Transkript nachgewiesen werden, welches nach der Virusinokulation abnahm. In Infektions-resistenten Pflanzen hingegen war weder vor noch nach Virusinokulation ein transgenes Transkript nachzuweisen. Eine vergleichbare Recovery-Resistenzreaktion, mit Abnahme der Transkriptkonzentration nach der Infektion, konnte von Jones *et al.* (1998) mit dem translatierbaren Nib-Gen des PSbMV nachgewiesen werden.

Zum zweifelsfreien Nachweis des Mechanismus, der in den hier vorliegenden Untersuchungen für die Recovery-Resistenz verantwortlich gemacht werden kann, fehlt entweder der direkte Nachweis der transgenen Transkriptkonzentration oder der direkte Nachweis des PTGS über das pPVX-201-System. Zu diesem Zweck müsste allerdings das System des pPVX-201 mit den chimären Genen so optimiert werden, daß eine zusätzliche Sequenz nicht über Rekombination wieder aus dem PVX Genom entfernt wird. Eine Teilssequenz, sowohl des CP wie auch des HCpro-Gens, könnte unter Umständen ausreichen, um den Sequenzmechanismus auszulösen. Unter Umständen würde sie, aufgrund der geringeren Größe, über einen längeren Zeitraum stabil im PVX-Genom beibehalten werden.

Es wurden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der transgenen Linien bezüglich der Kopienzahl (4.2.1.) und der Proteinexpression (4.2.2.) vorgenommen, die an dieser Stelle diskutiert werden sollen. Wie schon beschrieben, soll nach Goodwin *et al.* (1996) die Anzahl der Kopien des Transgens das Transkriptionsniveau

bestimmen. Schon damit wird festgelegt, ob der Degradations-Schwellenwert der mRNA Konzentration schon im uninfizierten Stadium überschritten wird und damit eine Infektions-Resistenz vorliegt, oder ob die Degradation erst nach Infektion einsetzt und damit eine Recovery-Resistenz vorliegt. Diese Untersuchungen wurden jedoch an Linien mit nichttranslatierbaren CP-Genen des TEV durchgeführt. Da jedoch die Möglichkeit besteht, daß der Resistenzmechanismus für translatierbare und nichttranslatierbare Gene ein und derselbe ist, sollte dieser Zusammenhang überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde von den verschiedenen CP- und HCpro-transgenen homozygoten *N. benthamiana* Linien mit unterschiedlicher Resistenzreaktion die Anzahl der transgenen Insertionen bestimmt (siehe 4.2.1. und Tab. 19). Der Vergleich von Anzahl der transgenen Insertionen und aufgetretener Resistenzreaktion ergibt jedoch keinen eindeutigen Zusammenhang. Es sind beispielsweise Linien mit nur einer Kopie des Transgens erzeugt worden (207.16.1., 221.12.1., 219.8.6., 227.17.2. und 230.22.6.), die eine eindeutige Infektions-Resistenz aufweisen. Auf der anderen Seite zeigen auch Linien mit dreifacher Insertion des Transgens (224.28.12. und 230.28.11.) eine eindeutige Recovery-Resistenz (4.2.2, Tab. 21). Hier ist der von Goodwin *et al.* (1996) beobachtete Zusammenhang nicht zu erkennen. Eine Ursache könnte die von Dougherty *et al.* (1994) diskutierte Integration des Transgens im Pflanzengenom sein. Goodwin *et al.* (1996) erzeugten über Kreuzung aus einer Linie mit Infektionsresistenz und drei Kopien des nichttranslatierbaren TEV CP-Gens, verschiedene Linien mit ein bis zwei transgenen Kopien. Die transgenen Insertionsorte waren jedoch die gleichen. Unter Umständen ist der Ort der transgenen Insertion für die Aktivierung des wirtseigenen Regulationsmechanismus von Bedeutung. Jede in dieser Arbeit erzeugte Linie kann verschiedene Insertionsorte des Transgens im Pflanzengenom aufweisen. So könnte eine Kopie des Transgens, die sich an einem Insertionsort befindet, an dem die transgene Expression stark reguliert wird, zu einer Infektions-Resistenz führen. Auf der anderen Seite könnten mehrere Kopien des Transgens, an entsprechend weniger stark regulierten Insertionsorten, "nur" zu einer Recovery-Resistenz führen. Damit wäre das von Goodwin *et al.* (1996) aufgestellte Modell trotzdem gültig. Um dies zu überprüfen, müßte allerdings in weiteren Arbeiten die Konzentration der transgenen mRNA in einzelnen Linien bestimmt werden.

Nach dem Modell von Goodwin müßten Linien, die eine Recovery-Resistenz aufweisen, bei denen also der Regulationsmechanismus erst nach viraler Infektion greift, das transgene Protein exprimieren. Infektions-resistente Linien dagegen, bei

denen der Degradationsmechanismus der transgenen RNA auch ohne eine Infektion schon wirksam ist, dürften kein Protein exprimieren.

Betrachtet man die Ergebnisse zur Proteinexpression der einzelnen Linien mit gleichen Resistenzphänomenen, stehen 11 Linien, die Recovery-Resistenz aufweisen und das transgene Protein exprimieren, 3 Linien gegenüber, die keine Translation des Transgens aufweisen. Innerhalb der Linien mit einer Infektions-Resistenz stehen 8 Linien, die kein Protein exprimieren, 2 Linien, bei denen Proteinexpression nachweisbar war, gegenüber (siehe 4.2.2). Die nichtvorhandene Expression der Recovery-resistenten Linien läßt sich möglicherweise damit erklären, daß das Expressionsniveau für einen Nachweis zu niedrig war. Die Proteinexpression einer Infektions-resistenten Linie läßt sich, unter Berücksichtigung des Smith Modells, nur so erklären, daß sich die mRNA Konzentration des Transgens ohne eine virale Infektion direkt unterhalb des Schwellenwertes der Degradation befindet und somit auch die jeweilige mRNA translatiert wird. Bei der Infektion einer solchen Linie könnte durch die Replikation des PPV in der Inkubationszeit, die etwa fünf Tage beträgt ohne das systemische Symptome sichtbar werden, der Schwellenwert der RNA überschritten und der Resistenzmechanismus ausgelöst werden.

Unterstellt man die Notwendigkeit des Vorhandenseins des transgenen CP oder eine Abhängigkeit des Resistenzeffektes, wie es von Powell *et al.* (1990) und Hemenway *et al.* (1988) nachgewiesen wurde, so konnte ein derartiger Effekt bei den hier erzeugten transgenen Linien, bezüglich der Expression des Transgens, nicht beobachtet werden.

5.2 Versuche mit CP-Chimären des p35PPV-NAT

Die im Kapitel 4.5.3 hergestellten und untersuchten CP-Chimären des PPV-NAT (ZYMV, PVY, TVMV, BrSMV) wurden in dieser Arbeit für Rekombinationsuntersuchungen genutzt. Wie in den Kapiteln 4.5.3.2 und 4.5.3.3 beschrieben, waren nicht alle Chimären in der Lage, *N. benthamiana* Pflanzen systemisch zu infizieren, noch wurden alle Chimären vom transgenen intakten PPV-CP in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen komplementiert. Für die Chimäre p35PPV-ZYMV konnte sicher gezeigt werden, daß sie *N. benthamiana* Pflanzen systemisch infizieren kann. Die p35PPV-PVY-Chimäre konnte erst nach Passage in Pflanzen der Linie 17.27.4. die *N. benthamiana* Pflanzen systemisch infizieren. Für diese Chimäre konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob eine Adaption durch

die Replikation in den transgenen Pflanzen stattgefunden hatte. Möglicherweise haben auch andere Faktoren, wie Konzentration des Inokulums bei der Erstinfektion, für die fehlende systemische Infektiosität in nichttransgenen Pflanzen eine Rolle gespielt. Die Chimären p35PPV-TVMV und -BrSMV zeigten weder eine systemische Infektiosität in nichttransgenen *N. benthamiana* Pflanzen, noch wurden sie vom transgenen CP komplementiert. Dies wurde in sofern nicht erwartet, da trotz der Mutation noch von einer vollständigen Prozessierung des Polyproteins ausgegangen werden konnte und Faktoren des CP von der transgenen Pflanzen zur Verfügung gestellt wurden. Unter Umständen beeinflusste auch dieser zentrale Bereich des CP-Gens mit einer veränderten Sequenz die Replikation des viralen Genoms, so daß die beiden Chimären nicht komplementiert werden konnten. Dies ist nicht außergewöhnlich, denn auch Solovyev *et al.* (1999) konnten zeigen, daß die TGB Chimären des BSMV mit anderen Vertretern des Genus *Hordeivirus* nicht in jedem Fall zu funktionellen und lebensfähigen Viren führte. Weiterhin ist bemerkenswert, daß die Infektiosität der einzelnen Chimären mit der Nukleinsäurehomologie des ausgetauschten Bereiches zu korrelieren schien (Abb. 19). Um diese Aussage auf eine breitere Basis stellen zu können, müßten jedoch verschiedene Chimären dieses CP-Bereiches mit anderen nahe verwandten Potyviren oder PPV-Isolaten hergestellt und auf ihre Infektiosität oder Komplementation durch transgenes PPV-CP überprüft werden. Mit dieser Information wäre die Möglichkeit gegeben, schon durch vorherige Sequenzhomologievergleiche, Vorhersagen auf die Lebensfähigkeit solcher Chimären zu treffen. In einem nächsten Schritt könnten sukzessive größere Genabschnitte ersetzt werden, um weitere Funktionen des CP zu lokalisieren. Die beiden Chimären p35PPV-NAT-ZYMV und -PVY könnten in weiteren Untersuchungen, bezüglich des Einflusses des ausgetauschten Bereiches auf eine systemische Ausbreitung in Wirten des ZYMV oder PVY, charakterisiert werden. Untersuchungen zur Replikation in *N. benthamiana* Pflanzen würden Aufschluß über einzelne Funktionen, die auf diesem Genabschnitt lokalisiert sind, ermöglichen.

Die Chimären p35PPV-ZYMV und -PVY sind ein weiteres Beispiel dafür, daß synthetische Rekombinante zweier Spezies lebensfähig sein können. Beispiele in der Literatur finden sich bei Solovyev *et al.* (1996, 1997 und 1999), Ding *et al.* (1996) und Salánki *et al.* (1997). Alle diese Chimären, wie auch die in dieser Arbeit erzeugten, erscheinen eher als Kompromiß zweier nicht vollständig kompatibler Genome. Das

einziges Beispiel einer synthetischen Rekombinante mit einer erhöhten Virulenz wurde von Ding *et al.* (1996) nachgewiesen. DeJong *et al.* (1995) konnten über Ersatz des "movement"-Proteins des BMV den Wirtskreis des Virus erweitern. Diese Chimären könnten ein mögliches *in-vivo* Rekombinationsereignis simulieren. Diese Art der interspezifischen Rekombinanten sind bisher weder in experimentellen Systemen unter optimierten Bedingungen, noch bei der Verwendung von transgenen virusresistenten Pflanzen, nachgewiesen worden. Die größte Zahl der natürlich auftretenden Rekombinanten, ob nun in Mischinfektionen oder in transgenen Pflanzen, dürfte keinen Selektionsvorteil haben und nicht überlebensfähig sein. Damit solch eine Rekombinante einen Selektionsvorteil hat, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. Dazu gehören die Kompatibilität der Genome, der Selektionsdruck des Wirtes, ein sinnvolles Rekombinationsereignis und auch der Phänotyp der Rekombinante. Alle diese Faktoren verringern die Wahrscheinlichkeit für ein solches Ereignis, welches die Seltenheit, mit der es unter natürlichen Bedingungen auftritt, verständlich macht.

5.3 Begrenzung der Heterologen Enkapsidierung

Die Tatsache, daß ein funktionelles, virales, transgenes CP fremde infizierende Viren heterolog enkapsidiert, und über diese HE Funktionen wie Blattlausübertragbarkeit vermitteln können, wurde bereits ausführlich erläutert. Sollte dieses Phänomen, weil unter Umständen der Wirtskreis dieses Virus erweitert werden könnte, trotz des unveränderten heterolog enkapsidierten Genoms des Virus ein biologisches Risiko darstellen, so bestehen Möglichkeiten dies zu verhindern. Eine Möglichkeit besteht darin, die viralen CP-Gene nichttranslatierbar zur Pflanzentransformation einzusetzen oder Nichtstrukturgene zu verwenden. Wie im Kapitel 4.3 gezeigt werden konnte, kann die HE bei einem translatierbaren CP-Gen eines *Potyvirus* erfolgreich unterdrückt werden. Um die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zur Unterdrückung der Heterologen Enkapsidierung beurteilen zu können, müssen unterschiedliche Teilergebnisse herangezogen werden (siehe 4.2.2, 4.3 und 4.5.1).

Wie im Kapitel 4.2.2 gezeigt, wurden ausschließlich transgene Linien zur Bestimmung der Heterologen Enkapsidierung verwendet, die das transgene CP nachweislich im Westernblot im nichtinfizierten Zustand exprimierten (Tab. 20). Dies gilt ebenso für die Linien, die als Positivkontrolle eingesetzt wurden (17.27.4 und 4.30.45.). Dabei konnte

gezeigt werden, daß das Antiserum (570 IgG) die unterschiedlich mutierten und nicht mutierten, in denaturierter Form vorliegenden, Proteine erkennt (CP-AT, CP-NAT, CP-RQ, -D, -RQ-D und -N). Der Resistenzmechanismus wurde, wie im Kapitel 4.3 beschrieben, in den transgenen Pflanzen nur durch die Infektion mit PPV, nicht jedoch durch unterschiedliche Viren des gleichen Genus bzw. aus verschiedenen Genera ausgelöst. Daher kann ebenfalls davon ausgegangen werden, daß das jeweilige transgene CP auch noch nach der Infektion mit ChVMV, PVY, PVX und TMV exprimiert wurde. Damit waren die Voraussetzungen für die Untersuchungen zur HE gegeben.

Um die Frage zu beantworten, ob die mit Mutationen der Assemblierungsmotive versehenen CP tatsächlich eine Assemblierung *in-planta* verhindern, wurden die im Kapitel 4.5.1.6 beschriebenen Untersuchungen durchgeführt. Diese Versuche, die exemplarisch mit der p35PPV-CP-RQ-D Mutante mit *gus*-Markierung durchgeführt wurden, zeigten aufgrund der mitgeführten Kontrollen zweifelsfrei, daß durch die beiden Mutationen die Assemblierungs- und die Transportfunktionen des PPV unterdrückt werden können (pPVX201-*Bsp*210I-*gus*, p35PPV-NAT-*gus*-CP). Im Umkehrschluß kann auch für das transgene PPV-CP davon ausgegangen werden, daß die Motive RQ und D gemeinsam für die Assemblierung verantwortlich sind. Dies wird ebenfalls durch die Untersuchungen zur Proteinsekundärstruktur unterstützt. Die Untersuchungen ließen keine Aussage zur Tertiärstruktur des modifizierten CP zu. Da die Ladungen der ausgetauschten Aminosäuren jedoch entgegengesetzt gegenüber den ursprünglichen Aminosäuren waren, kann davon ausgegangen werden, daß die postulierte "salt-bridge", die wahrscheinlich zur Ausbildung einer funktionellen Tertiärstruktur führt, durch die Mutagenese zerstört wurde.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Komplementation (4.5.1.3) zeigen, daß nicht nur die Mutation beider Motive, sondern auch die Einzelmutationen die Kurzstreckentransportfunktion des PPV-CP zerstören.

Diese Ergebnisse unterstützen die in Kapitel 4.3 erhaltenen Ergebnisse zur Heterologen Enkapsidierung und umgekehrt. Die Tatsache, daß auch eine Einzelmutation der Assemblierungsmotive zu einer Verhinderung der Heterologen Enkapsidierung führt, zeigt im Umkehrschluß, daß jedes mutierte Motiv für sich schon eine Assemblierung verhindert. Die in Kapitel 4.3 erhaltenen Ergebnisse belegen statistisch abgesichert, daß die Heterologe Enkapsidierung von zwei fremden Potyviren (ChVMV, PVY), durch Einfügung von Assemblierungsmutationen oder einer

N-terminalen Verkürzung von 83 Aminosäuren in das CP des PPV, unterdrückt werden kann.

Wie sind diese Ergebnisse zu beurteilen? Die Verhinderung der Assemblierung und der Heterologen Enkapsidierung mit der doppelten Assemblierungsmutation im CP ist eindeutig nachweisbar und konnte in verschiedenen Versuchsansätzen bestätigt werden (4.3 und 4.5.1.6). Auch bei den Einzelmutationen (CP-RQ oder -D) kann, aufgrund der Versuche zur HE und der Komplementationsuntersuchungen davon ausgegangen werden, daß eine Assemblierung und damit eine Heterologe Enkapsidierung erfolgreich unterdrückt werden kann. Kritisch zu betrachten ist das CP mit verkürztem N-Terminus aber intakten Assemblierungsmotiven. Hier konnte denaturiertes CP-N im Westernblot in transgenen Pflanzen nachgewiesen werden (Tab. 20 Linie 10.12.1.). Prinzipiell besteht jedoch die Möglichkeit, daß das AS 570 dieses verkürzte Protein *in-vivo* nicht mehr erkennen kann, und daher in den elektronenmikroskopischen Tropfpräparaten keine HE mehr nachgewiesen wurde, obwohl sie noch auftrat. Um dies exakt abzusichern, müßten Teilabschnitte des CP des PPV bakteriell exprimiert werden, um die Nachweismöglichkeit des AS einzelner Epitope zu untersuchen ("epitope mapping"). Da bereits mit den drei anderen Konstrukten eine HE mit fremden Potyviren erfolgreich unterdrückt werden konnte, wurde auf diese zusätzlichen Untersuchungen verzichtet.

Mit diesen Ergebnissen wurde demonstriert, daß die Heterologe Enkapsidierung in transgenen PPV resistenten *N. benthamiana* Pflanzen, die mit modifizierten translatierbaren CP-Genen transformiert wurden, unterdrückt werden kann. Dieses Ergebnis stellt, neben der Verwendung nichttranslatierbarer Gene, eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz unter Umgehung des potentiellen Risikos der HE dar. Möglicherweise läßt sich diese Strategie auch auf andere Viren aus verschiedenen Genera, die ebenfalls konservierte Assemblierungsmotive im CP besitzen, übertragen (Dolja *et al.*, 1991).

Wie sind die hier erhaltenen Ergebnisse mit bereits publizierten Untersuchungen vergleichbar? Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die von Jagdish *et al.* (1991) durchgeführten Assemblierungsversuche des JGMV CP in *S. cerevisiae* und *E. coli* mit denen in intakten Pflanzen durchaus vergleichbar sind, auch wenn im bakteriellen oder pilzlichen System die virale RNA nicht vorhanden ist.

Die Ergebnisse zur Assemblierung und HE stützen weiterhin die Untersuchungen von Dolja *et al.* (1995) zur Assemblierung und Kurzstrecken-Transportfunktionen, die mit

vergleichbaren Mutanten des TEV-*gus* durchgeführt wurden. Der qualitative Unterschied zu den hier durchgeführten Untersuchungen besteht darin, daß die Autoren die Assemblierung in Protoplasten und nicht *in-planta* zeigen konnten.

Jaquet *et al.* (1998) waren ebenfalls in der Lage, über die Deletion und nicht über Mutagenese beider einzelner Assemblierungsmotive im PPV-CP, die Partikelassemblierung in *E. coli* zu unterdrücken. Die Autoren überprüften ebenfalls in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen, die mit dem PPV-CP-Gen mit der Deletion beider Assemblierungsmotive transformiert waren, die HE mit dem ZYMV. Dies wurde in elektronenmikroskopischen Dekorationspräparaten ohne Goldmarkierung und über Blattlausübertragungsversuche nachgewiesen. Diese Untersuchungen wurden jedoch weder statistisch abgesichert, noch war die Sensitivität mit dem hier durchgeführten Nachweis über Goldmarkierung vergleichbar.

5.4 Untersuchung von Mutationen im HCpro-Gen von p35PPV-NAT

Die Mutationen in den konservierten Motiven der HCpro (KITC und PTK), die innerhalb der Potyviren für die Bindung der Viruspartikel an die Mundwerkzeuge der Aphiden und damit für die Blattlausübertragung verantwortlich sind, sollten in den HCpro Genen, die zur Pflanzentransformation verwendet wurden, funktionslos gemacht werden. Im KITC Motiv konnte in vergleichbaren Arbeiten die Blattlausübertragung, mit dem Ersatz des K durch eine Aminosäure mit entgegen-gesetzten Eigenschaften (E), verhindert werden. Im PTK Motiv konnte die Übertragung durch den Austausch des T zu A, mit ebenfalls chemisch entgegengesetzten Eigenschaften, verhindert werden. Genau diese Mutationen wurden einzeln und gemeinsam in die HCpro des PPV eingefügt. Die unterschiedlich mutierten translatierbaren Gene waren in der Lage, in transgenen *N. benthamiana* Resistenz gegenüber dem PPV zu vermitteln. Um den Einfluß der verschiedenen Mutationen auf die systemische Infektiosität zu untersuchen, wurden die im Kapitel 4.4 beschriebenen Austauschklonierungen und Infektiositätsuntersuchungen durchgeführt. Erstaunlicherweise hatte die PTK- und die KITC-PTK-Mutante, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, einen Einfluß auf die Symptomausprägung des PPV.

Bei der Sequenzierung von Teilbereichen der verschiedenen HCpro Gene wurden, neben den eingefügten Mutationen, zusätzliche Aminosäureaustausche nachgewiesen (Abb. 12). Diese könnten, wie beschrieben, auf unterschiedliche Art und Weise

eingefügt worden sein. Eine veränderte Symptomausprägung war jedoch nur in den Mutanten p35PPV-HC-P und -HC-KP zu beobachten. Von daher ist anzunehmen, daß die Veränderung des PTK-Motives dafür verantwortlich gemacht werden kann. Sollte tatsächlich eine der zusätzlich nachgewiesenen Aminosäuren für die veränderte Symptomausprägung verantwortlich sein, so kann nur der in beiden Mutanten nachgewiesene Aminosäureaustausch, von unpolarem basischen Serin zu ebenfalls basischen Tryptophan (T-A), oder andere Aminosäureaustausche im nicht sequenzierten aber ausgetauschten Bereich, verantwortlich sein. Dies könnte jedoch nur über Versuche mit einer entsprechenden Mutante des p35PPV-NAT überprüft werden, die so nicht hergestellt wurde.

Wie in der Einleitung beschrieben, waren bisher nur eine Attenuierung der Symptome und eine verringerte Replikation durch die Mutation des KITC Motivs der HCpro eines Potyvirus beobachtet worden. Damit wurde auf eine Beteiligung der HCpro an der potyviralen Symptomatologie hingewiesen. Sollte die mutierte HCpro in einer Wechselwirkung mit einem pflanzlichen Protein stehen, so wäre eine ähnliche Symptomatologie auch in den HCpro-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen zu erwarten gewesen. Von den verschiedenen transgenen *N. benthamiana* Linien zeigte jedoch keine diese Nekrosen, auch nicht bei einer Infektion mit PPV-NAT, wie sie für die Resistenztestungen durchgeführt worden war. Die Tatsache, daß diese schweren Symptome auch bei der Infektion der HCpro transgenen Pflanzen mit dem PPV ausblieben, konnte nur darauf zurückgeführt werden, daß das Virus die unveränderte HCpro mitbringt. Diese liegt sicherlich in einer wesentlich höheren Konzentration vor, als die transgene. So könnte das Ausbleiben der schweren, durch die Mutanten verursachten, Symptome eventuell mit einem Konzentrationseffekt erklärt werden. In weiterführenden Experimenten wäre die Möglichkeit gegeben, die verschiedenen HCpro-Mutanten des p35PPV-NAT zur Untersuchung der Symptomatologie, auch in den natürlichen Wirtspflanzen von PPV, zu verwenden.

Um eine Aussage darüber zu treffen, ob diese verschieden mutierten transgenen HCpro fremde infizierende Viren bezüglich der Blattlausübertragungsfunktionen komplementieren können, müßten die HCpro Gene in p35PPV-AT mit dem aphidenübertragbarem CP eingefügt werden. Anschließend müßte in Blattlausübertragungsversuchen die Fähigkeit der unterschiedlich mutierten HCpro, eine Virusbindung an die Mundwerkzeuge zu vermitteln, überprüft werden. Diese Austauschklonierungen wurden durchgeführt und die Klone auf ihre systemische

Infektiosität untersucht (im Ergebnisteil nicht angegeben). Die aufwendigen Blattlausübertragungsversuche wurden jedoch nicht durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, die jeweiligen HCpro aus Pflanzen zu reinigen und in dem von Blanc *et al.* (1997) beschriebenen "protein-overlay", nach Westernblot, auf die Interaktion mit dem CP des PPV-AT zu überprüfen, um daraus Schlußfolgerungen für die Blattlausübertragbarkeit zu ziehen.

Aufgrund der Konservierung dieser beiden Motive innerhalb der Potyvirusgruppe und der Verwendung von gleichen ausgetauschten Aminosäuren, wie in den erwähnten Untersuchungen beschrieben, kann davon ausgegangen werden, daß die mutierten HCpro eine Blattlausübertragung nicht mehr unterstützen. Der experimentelle Beweis fehlt jedoch.

5.5 Untersuchungen zur Komplementation

Die verschiedenen Assemblierungsmutanten (p35PPV-NAT-CP-RQ, CP-D und CP-RQ-D), wie auch die p35PPV-PVY-Chimäre, wurden vom intakten transgenen CP des PPV in *N. benthamiana* Pflanzen komplementiert (siehe 4.5.1.3 und 4.5.3.3). Dabei fand die Komplementation in beiden verwendeten transgenen Linien, sowohl mit vollständiger, wie auch unvollständiger 3'-NTR, 3' vom CP-Gen statt. Nur wurden in der Linie 4.30.45. die einzelnen Mutanten sehr schnell zur Wild-Typ Sequenz rekonstituiert. Dies zeigt für die Linie 4.30.45 beispielhaft die Infektion mit der CP-D Mutante (4.5.1.5 Tab. 28). Diese wird nach Infektion zuerst vom transgenen CP-NAT komplementiert. Erst in der zweiten Passage von transgenen auf nichtransgene Pflanzen konnte die Wild-Typ Rekombinante nachgewiesen werden.

Diese transgenen Pflanzen ermöglichten jedoch nur die Komplementation, weil sie gegenüber dem PPV eine Recovery-Resistenz aufwies. Dadurch, daß die Resistenzreaktion erst nach der Replikation und Ausbildung von systemischen Symptomen des infizierenden PPV wirksam wird, wird die Komplementation erst ermöglicht. Es ist mit Sicherheit davon auszugehen, daß dieses Komplementations-Phänomen in transgenen Pflanzen, die gegenüber dem PPV immun sind, nicht auftreten würde, da dieser sequenzspezifische Resistenzmechanismus auch gegenüber einer Assemblierungsmutante des p35PPV-NAT wirksam sein dürfte. In visuellen Bonituren gegenüber Assemblierungsmutanten, aber auch gegenüber den unterschiedlichen CP-Chimären des p35PPV-NAT, zeigten auch die Pflanzen der *N.*

benthamiana Linie 17.27.4. das gleiche Phänomen der Recovery-Resistenz wie gegenüber dem PPV-NAT Wildtyp.

Die weitaus geringere Infektionsrate der Mutanten, im Vergleich zum Wild-Typ p35PPV-NAT, könnte verschiedene Ursachen haben (Tab. 25). Im Vergleich mit den Versuchen zur Assemblierung (4.5.1.6), die mit der Partikelkanone PDS1000 an einzelnen Blättern durchgeführt wurden, fiel auf, daß mit der Mutante p35PPV-NAT-*gus*-CP-RQ-D nicht weniger *gus*-gefärbte Blattbereiche in transgenen und nichttransgenen *N. benthamiana* Blättern erzeugt wurden, als mit dem p35PPV-NAT-*gus*-CP. In den elektronenmikroskopischen Tropfpräparaten konnten jedoch nur sehr wenige Viruspartikel gefunden werden. Da offensichtlich die Replikation durch die Mutationen nicht beeinflußt war, wie das Vorhandensein des *gus*-Transkriptes anzeigte, konnte nur die Menge des transgenen CP für die systemische Infektion beschränkend gewirkt haben. Hierzu sind jedoch keine weiteren Versuche durchgeführt worden, da die Komplementation sowohl mit ELISA, als auch in elektronenmikroskopischen Tropfpräparaten oder ISEM, nachgewiesen werden konnte. Ebenso war die Passage der Mutanten mittels Preßsaftinokulation auf weitere transgene *N. benthamiana* Pflanzen möglich, welches die Voraussetzung für die in Kapitel 4.5.1.5 beschriebenen Rekombinationsuntersuchungen war.

Die Untersuchungen der heterologen Komplementation von nahe verwandten Potyviren wurden mangels entsprechender viraler "full-length" Klone nicht vorgenommen. Die unter 4.3 beschriebenen Versuche zur HE, zeigen die Austauschbarkeit des CP zwischen den verschiedenen Potyviren. Dies läßt vermuten, daß das transgene intakte CP des PPV auch fremde Potyviren mit einem CP-Defekt komplementieren könnte.

Das Auftreten der Komplementation ist kein Phänomen, welches ausschließlich in dem hier verwendeten System beobachtet werden konnte. In der Literatur sind jedoch keine Untersuchungen bekannt, die sich mit der Unterdrückung dieses Phänomens in transgenen Pflanzen beschäftigen.

Die Untersuchungen zur Komplementation stehen in einem engen Zusammenhang zu den Ergebnissen der Versuche zur Heterologen Enkapsidierung, zur CP-Assemblierung und auch zur Rekombination. Das Phänomen, welches mit den unterschiedlichen Defektmutanten des p35PPV-NAT in den transgenen Pflanzen der Linien 17.27.4 und 4.30.45. mit dem funktionsfähigem CP beobachtet werden konnte, war eine vollständige Heterologe Enkapsidierung der jeweiligen Mutante mit

transgenem CP (siehe 4.5.1.3 und 4.5.3.2). Dies zeigen die Versuche zur Assemblierung und Komplementation in Kapitel 4.5.1.6. Wie aus der Tab. 30 hervorgeht, konnten mit der Mutante p35PPV-*gus*-CP-RQ-D nur dann eine systemische Ausbreitung und Viruspartikel nachgewiesen werden, wenn sie von dem intakten transgenen CP komplementiert wurde. Dieses wiederum stützt das Ergebnis zur Komplementation der Assemblierungsmutanten des p35PPV-NAT in den neu erzeugten transgenen Linien (siehe 4.5.1.4 und Tab. 28). Die Komplementation konnte durch die Verwendung der unterschiedlich modifizierten CP-Gene, zur Herstellung von virusresistenten *N. benthamiana*, unterdrückt werden. Für diese Untersuchungen wurden ebenfalls Recovery-resistente Linien verwendet, die das jeweilige modifizierte CP exprimierten.

Das Ergebnis zeigt die Möglichkeit, das Phänomen der Komplementation auch bei der Verwendung translatierbarer viraler Gene zu unterdrücken. Die Voraussetzung ist allerdings die Kenntnis der jeweiligen Proteinfunktionen. Hier wurden verschiedene CP-Gene verwendet, die von einem nichtaphidenübertragbaren Isolat (PPV-NAT) stammten. Nach der Modifikation blieb die resistenzvermittelnde Eigenschaft bestehen. Zusätzlich wurden Funktionen wie Assemblierung und Kurzstreckentransport des transgenen CP zerstört, die nun den PPV-Defektmutanten und wahrscheinlich auch fremden Viren nicht mehr zur Verfügung gestellt werden können. Es sind jedoch mit einiger Sicherheit noch nicht alle Funktionen des CP bekannt (siehe Einleitung). Daher besteht prinzipiell die Möglichkeit, daß selbst das assemblierungsdefekte CP noch Funktionen besitzt, bezüglich derer fremde Viren komplementiert werden könnten. Dieses liegt jedoch eher im Bereich der Spekulation. Aufgrund der hier vorliegenden Untersuchungen sollte die Frage diskutiert werden, ob diese hier nachgewiesenen Komplementationsphänomene tatsächlich ein biologisches Risiko bei der Verwendung von transgenen virusresistenten Pflanzen darstellen könnten.

In den verschiedenen vorliegenden Arbeiten zur Komplementation betrachteten nur Jakab *et al.* (1997) und Schoelz & Wintermantel (1993) das Phänomen der Komplementation unter Aspekten der biologischen Sicherheit von transgenen virusresistenten Pflanzen. Jakab *et al.* (1997) zeigten, daß erst die vermehrte Replikation einer CP-Deletionsmutante des PVY in transgenen Pflanzen, durch die Komplementation des transgenen Proteins, eine Rekombination ermöglichte. Die Autoren schlußfolgerten, daß durch die Komplementation die Wahrscheinlichkeit für

eine rekonstituierende Rekombination erhöht wurde. Weiterhin könnte eine Defektmutante somit auf transgene Pflanzen beschränkt bleiben. Im Vergleich zu nichttransgenen Pflanzen wäre somit das defekte Gen vom natürlichen Selektionsdruck befreit. Sämtliche Untersuchungen an transgenen Pflanzen weisen jedoch, wie auch diese Arbeit, ausschließlich homologe Komplementationen nach. Die einzige bisher nachgewiesene heterologe Komplementation ist in Untersuchungen von Morozov *et al.* (1997) zu finden. Sie wurde jedoch nicht in transgenen Pflanzen, sondern nur über transiente Expression nachgewiesen. Auch Arbeiten von Solovyev *et al.* (1996 und 1997), die im BSMV das "movement"-Protein durch ein heterologes ersetzen, zeigten, daß eine heterologe Komplementation prinzipiell möglich ist. Dies konnte hier jedoch durch die Herstellung einer Chimäre und nicht mittels der Komplementation in transgenen Pflanzen gezeigt werden. Durch die homologe Komplementation kann jedoch keine Erkrankung mit neuer Qualität entstehen, auch wenn eine Defektmutante unter fehlendem Selektionsdruck überleben kann. Ob von einer heterologen Komplementation in transgenen Pflanzen ein biologisches Risiko zu skizzieren wäre, ist ebenfalls schwer vorstellbar, aber bisher auch zu wenig untersucht, um an dieser Stelle beurteilt werden zu können.

In dieser Arbeit konnte beispielhaft gezeigt werden, daß innerhalb des Genus *Potyvirus* die Möglichkeit besteht, die Komplementation infizierender CP-Defektmutanten in transgenen Pflanzen zu unterdrücken. Dies wurde durch Zerstörung der konservierten Assemblierungsmotive des transgenen CP-Gens erreicht. Bei transgenen, mit nichttranslatierbaren Genen transformierten Pflanzen, kann dieses Phänomen nicht auftreten.

5.6 Begrenzung der Rekombination in transgenen Pflanzen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß unter der Anwesenheit des transgenen intakten CP-Gen des PPV-NAT, sowohl Assemblierungsmutanten (p35PPV-CP-RQ, -D, -RQ-D) (4.5.1.5), wie auch CP-Chimären (p35PPV-CP-ZYMV, CP-PVY), zur Wild-Typ Sequenz rekonstituiert wurden (4.5.3.4).

Die Versuche zur Art der Rekombination (4.6) ergaben eindeutig, daß die Rekombinationen in den transgenen Pflanzen auf der RNA-Ebene stattgefunden haben. Wird das "RdRp-copy-choice" Modell des viralen Replikasekomplexes zugrundegelegt, können Rückschlüsse auf die Art und Wahrscheinlichkeit der

Rekombination gezogen werden.

Zuerst muß die Frage gestellt werden, ob es sich bei diesen nachgewiesenen Rekombinanten tatsächlich um ein Produkt viraler Rekombination, oder um ein durch das Nachweissystem erzeugtes Artefakt, handelt. Es konnten durch die Inokulation der Pflanzenpreßsäfte aus den transgenen Pflanzen, die mit der jeweiligen Mutante infiziert waren, systemische Infektionen in nichttransgenen *N. benthamiana* Pflanzen erzeugt werden. Dies deutete auf eine aufgetretene Rekombination hin, da die Assemblierungsmutanten nichttransgene Pflanzen nicht direkt infizieren konnten. Nun ist prinzipiell die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß sich das virale Genom durch Fehler des viralen Replikationskomplexes adaptiert hat ("mismatching") (s.u.). Dagegen spricht, daß die Rekonstituierungen nur in transgenen Pflanzen mit intakter 3'-NTR reproduzierbar nachzuweisen waren. Auch in den Pflanzen mit unvollständiger 3'-NTR hätte dann eine Adaption mit gleicher Häufigkeit stattfinden müssen. In den Pflanzen der Linie 17.27.4. wurde die Rekonstitution jedoch nur als sehr seltenes Ereignis nachgewiesen. Die Möglichkeit, daß die Rekombinanten erst durch die Rekombination der RT oder der Taq-Polymerase in jedes der rekombinanten CP-Gene eingefügt worden ist, besteht. Dies belegen verschiedene Untersuchungen zur Rekombination dieser beiden Enzyme (Luo & Taylor, 1990; Negroni *et al.*, 1995 und Zaphiropoulos, 1998). Dies wäre jedoch nur in dem konstruierten Fall möglich, indem das virale Genom sich an anderer Stelle adaptiert hätte, ohne die Assemblierungsmutationen zu revertieren. Bei der RT-PCR wäre die Wild-Typ Sequenz dann über die Rekombination eingefügt worden. Auch dagegen spricht die Tatsache, daß nur in transgenen Pflanzen mit vollständiger 3'-NTR intakte Rekombinante mehrfach nachgewiesen werden konnten. Weiterhin hätten dann in verschiedenen Klonierungen auch CP-Gene mit den eingefügten Mutationen oder Sequenzbereichen auftreten müssen. Dies war jedoch nicht der Fall.

Die Rekonstitution der verschiedenen Mutationen oder eingefügten Sequenzen zur Wild-Typ Sequenz konnte nur dann reproduzierbar nachgewiesen werden, wenn sich die virale 3'-NTR am 3'-Ende der transgenen CP-Sequenz befand. Dies läßt den Schluß zu, daß die 3'-NTR einen starken Einfluß auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Rekombinationen haben muß.

Greene & Allison (1996) (siehe 4.5.1.5) schlußfolgerten aus dem ausschließlichen Nachweis der Rekombination bei Vorhandensein der 3'-NTR des CCMV, daß durch das Weglassen der 3'-NTR der Bereich für eine Rekombination verkürzt, oder die

Replikasebindungsstellen für eine Initiation der RNA-Synthese auf dem Transgen entfernt wurden. Diese Schlußfolgerung läßt sich auch auf das hier verwendete System anwenden. Die 3'-NTR ist sowohl bei den von den Autoren untersuchten Bromoviren, wie auch bei den hier untersuchten Potyviren, an der Initiation der Replikation beteiligt. Wenn der Replikasekomplex die Synthese nicht auf der transgenen Sequenz initiieren kann, ist zur Rekonstitution der jeweiligen viralen Defektmutante ein doppelter Templatewechsel notwendig. Bei Vorhandensein der 3'-NTR reicht auch ein einfacher Templatewechsel. Entweder ist die Wahrscheinlichkeit für einen doppelten Templatewechsel weitaus geringer, oder der notwendige Bereich ist in der transgenen CP-Sequenz für einen doppelten Templatewechsel zu kurz. Letzteres ist eher wahrscheinlich, denn Gal-On *et al.* (1998) fanden bei der Rekombination verschiedener defekter ZYMV "full-length" Klone Wild-Typ ZYMV rekonstituierende Rekombinationen mit großer Häufigkeit, bei denen ein doppelter Templatewechsel des viralen Replikasekomplexes notwendig war. In diesem Fall war jedoch der mögliche Sequenzbereich für einen doppelten Templatewechsel weitaus größer als hier, denn es standen mehrere kBp zur Verfügung, innerhalb dessen der virale Replikationskomplex das Template zweimal wechseln konnte.

Jakab *et al.* (1997) fanden mit einer CP-Deletionsmutante des PVY in transgenen Pflanzen, die das intakte PVY-CP exprimierten, neben der Komplementation auch die Rekombination. In diesem Fall war die 3'-NTR nicht in der transgenen Sequenz enthalten, welches mit den hier durchgeführten Untersuchungen durchaus vergleichbar ist. Die Rekombination konnte jedoch erst nach dreimaliger Passage in insgesamt 30 transgenen Pflanzen, nach einem Zeitraum von vier Monaten, nachgewiesen werden. Auch hier machten die Autoren die fehlende 3'-NTR für das seltene Auftreten des Rekombinationsereignisses verantwortlich. Dies Ergebnis unterstützt das Auftreten des einzigen nicht reproduzierbaren Rekombinationsereignis mit der CP-RQ Mutante in transgenen *N. benthamiana* der Linie 17.27.4. (siehe 4.5.1.5). Unter Umständen handelt es sich auch in diesem Fall um ein sehr seltenes Ereignis, welches selbst mit zwei Wiederholungen des Inokulationsexperimentes mit jeweils fünf Passagen nicht reproduziert werden konnte.

Nur im Fall der CP-Leserastermutante (4.5.2.2) fand eine Rekonstitution auch in den transgenen Pflanzen mit unvollständiger 3'-NTR statt. Ob durch die Leserastermutation im CP des PPV die Ausbreitungsfunktionen, oder auch die Assemblierungs-funktionen betroffen waren, konnte nicht festgestellt werden. Dieses

Ergebnis steht im Gegensatz zu sämtlichen anderen Rekombinationsergebnissen. Der Unterschied zu den noch am ehesten vergleichbaren Einzelassemblierungsmutationen besteht darin, daß die Information auf Nukleotidebene nicht verändert, sondern im Bereich der Restriktionsschnittstelle vier Nukleotide verdoppelt waren. Es muß die Frage gestellt werden, ob hier tatsächlich eine Rekombination zwischen dem Transgen und p35PPV-NAT-*SpII* stattgefunden hat. Unter Umständen könnte der virale Replikasekomplex durch mögliche Fehler bei der häufigen Replikation, bedingt durch die Komplementation, mit einem Leserasterwechsel den Defekt repariert haben. Hancock *et al.* (1995) schlossen von kurzen Wiederholungssequenzen in verschiedenen potyviralen Sequenzen auf ein sogenanntes Replikations "slippage" des viralen Replikationskomplexes, welches diese Strukturen erzeugt haben könnte. Die mittels Klenow-Fragment aufgefüllte Restriktionsschnittstelle, die diesen Leserasterwechsel im CP-Gen des PPV erzeugt, führt zu solch einer sich wiederholenden Sequenz. Wenn dieses "slippage" des viralen Replikationskomplexes bei der Synthese in 5'-Richtung möglich sein sollte, könnte unter Umständen auch ein Überspringen von Nukleotiden in 3'-Syntheserichtung möglich sein. Die Literatur gibt für solche Phänomene jedoch keine Anhaltspunkte. Um zu beweisen, daß der virale Replikationskomplex diesen Leserasterdefekt ohne Rekombination selbst repariert, könnten transgene Pflanzen, die ein intaktes potyviraies CP exprimieren, mit der Mutante infiziert werden, welches in der Lage wäre die Leserastermutante zu komplementieren. Dies könnte zeigen, daß der Leseraster hier nicht über Rekombination rekonstituiert wurde. Egal ob die Rekonstitution des Leserasterdefektes durch Reparatur oder Rekombination erfolgte, die Mutation kann die Replikation der viralen RNA nicht verhindert haben, denn sonst hätte kein funktioneller viraler Replikasekomplex synthetisiert werden können.

Das dieses Phänomen der Genomreparatur für Potyviren nicht ungewöhnlich ist, zeigen die Untersuchungen von Atreya *et al.* (1991) und Atreya & Pirone (1993). In einem Fall wurde im CP des TVMV das für Blattlausübertragung notwendige Motiv DAG zu KAG mutiert. Schon kurze Zeit nach der Infektion der Mutante konnte eine Reversion zur Wild-Typ Sequenz nachgewiesen werden. Eine ähnliche Reversion wurde bei der Mutation des KITC Motivs zu EITC in der HCpro des TVMV beobachtet. Diese Ergebnisse geben einen weiteren experimentellen Hinweis auf die Fehlerrate der viralen RdRp von Potyviren. In den Arbeiten war durch den Aminosäureaustausch jedoch nicht, wie in dem hier beobachteten Fall, die systemische Ausbreitung oder die

Assemblierung des Virus durch die Mutation beeinflusst. In dem hier beobachteten speziellen Fall lag ein hoher Selektionsdruck für die Genomreparatur vor, da die Mutante keine Fähigkeit besaß, nichttransgene *N. benthamiana* Pflanzen systemisch zu infizieren.

Rekombination und Selektionsdruck

In dieser Arbeit wurden Rekombinationsereignisse in transgenen Pflanzen sowohl unter hohem, wie auch unter eher moderatem Selektionsdruck nachgewiesen. Die Assemblierungsmutanten (CP-RQ, -D, -RQ-D), wie auch die PPV-PVY CP-Chimäre des p35PPV-NAT, waren in den Untersuchungen nicht in der Lage *N. benthamiana* Pflanzen systemisch zu infizieren (siehe Kapitel 4.5.1.2 und 4.5.3.2). Das rekombinante Wild-Typ PPV hatte einen großen Selektionsvorteil gegenüber der jeweiligen Mutante. Die PPV-ZYMV CP-Chimäre hingegen konnte *N. benthamiana* Pflanzen systemisch infizieren (4.5.3.2). Trotzdem mußte das rekombinante Wild-Typ PPV gegenüber der Chimäre einen Selektionsvorteil gehabt haben. Der Selektionsdruck war jedoch mit Sicherheit geringer. Diese Ergebnisse sind mit den Untersuchungen von Borja *et al.* (1999) und von Wintermantel & Schoelz (1996) vergleichbar, die ebenfalls Rekombinante in transgenen Pflanzen unter moderatem Selektionsdruck nachweisen konnten (siehe Einleitung). Der hier und in vielen anderen Untersuchungen zum Nachweis von Rekombinationen angelegte Selektionsdruck entspricht mit Sicherheit nicht der natürlichen Situation. Unter natürlichen Bedingungen treten wahrscheinlich, durch die hohen Fehlerrate und die häufige Replikation, viele rekombinante und auch defekte Mutanten auf. Diese können sich jedoch gegenüber der intakten "Mastersequenz" nur dann durchsetzen, wenn sie einen Selektionsvorteil besitzen. Aus diesem Grund ist die Mehrzahl der Viren nicht defekt, und der Selektionsdruck für das Auftreten von Rekombinationen sehr viel geringer. Um das Auftreten von Rekombinationen in transgenen Pflanzen besser abschätzen zu können, wären Versuche mit intakten Viren sicherlich angemessener. Der Nachweis von rekombinanten Viren wäre jedoch ohne die Möglichkeit einer Selektion in einem solchen System sehr mühsam und aufwendig.

Häufigkeit der aufgetretenen Rekombinationen in transgenen Pflanzen

Wie schon im Kapitel 4.5.1.5 und 4.5.3.4 beschrieben, konnten in allen Rekombinationsexperimenten, ob nun mit Assemblierungsmutanten oder CP-Chimären, in mindestens 20% der primär infizierten Pflanzen rekombinante Viren nachgewiesen werden. Der unterschiedliche Selektionsdruck ließ keinen Einfluß auf die Häufigkeit der Rekombination erkennen, soweit dies bei der geringen Anzahl der untersuchten Pflanzen überhaupt möglich war. Die Häufigkeit des Auftretens von Rekombinationen in anderen Untersuchungen ist sehr divergent. Sie schwankt von 3 % nachgewiesener Rekombinanten in Untersuchungen von Greene & Allison (1996) über 12-20 % Rekombinanten, die von Borja *et al.* (1999) gefunden wurden, bis hin zu 30 % bei Gal *et al.* (1992) und 36 % bei Schoelz & Wintermantel (1993). Es gibt daher keinen Anhaltspunkt dafür, daß hier außergewöhnlich hohe Rekombinationsraten gefunden wurden. Die absolut gesehen hohe Rekombinationsrate läßt sich unter Umständen auf die Tatsache zurückführen, daß in jedem der Experimente in transgenen Pflanzen erstens eine homologe Rekombination nachgewiesen wurde und zweitens die Wild-Typ Sequenz des PPV-NAT rekonstituiert wurde. Weiterhin wurden für die Untersuchungen transgene Pflanzen verwendet, die gegenüber dem PPV eine Recovery-Resistenz besaßen und das transgene CP exprimierten. Diese ermöglichte der jeweiligen Mutante durch Komplementation eine systemische Infektion und damit eine häufige Replikation. Da die Replikationshäufigkeit nach dem "RdRp-copy-choice" Modell die Rekombinationshäufigkeit beeinflussen müßte, könnte somit die höhere Rekombinationsrate in den transgenen Pflanzen erklärt werden. Die Ergebnisse der Rekombinationsversuche mit chimärem pPVX (4.7) zeigen jedoch, daß die Komplementation in den transgenen Pflanzen keine Notwendigkeit für ein Rekombinationsereignis darstellte. In diesem verwendeten System fand keine Komplementation der verschiedenen p35PPV-NAT Assemblierungsmutanten statt und trotzdem wurden rekonstituierende Rekombinationen beobachtet.

5.7 Herstellung von viralen *in-vivo* Rekombinanten

Die Rekonstitution der drei Assemblierungsmutanten des p35PPV-NAT konnte ebenso nach dem Co-Bombardment mit chimärem pPVX, welches das vollständige intakte CP-NAT-Gen inklusive der 3'-NTR beinhaltete, nachgewiesen werden (siehe 4.7). Dabei traten die Rekombinanten, die die Wild-Typ Sequenz rekonstituiert hatten, mit

einer geringeren Häufigkeit auf, als in den transgenen Pflanzen beobachtet werden konnte (4.5.1.5). Diese geringere Häufigkeit könnte auf eine geringere Replikation der jeweiligen Defektmutante zurückgeführt werden. Die infizierende Assemblierungsmutante besaß einen Assemblierungs- und Ausbreitungsdefekt. Die Rekombination konnte also nur in der erstinfizierten Zelle stattfinden, da das chimäre pPVX-Bsp120I-CP-NAT die erstinfizierte Zelle ebenfalls nicht verlassen konnte. Da die jeweilige Assemblierungsmutante in transgenen Pflanzen der Linie 4.30.45. vom transgenen CP komplementiert wurde, fand eine Infektion vieler Zellen und damit eine häufigere Replikation der Mutante statt, als im System mit pPVX-Bsp120I-CP-NAT. Aufgrund eines fehlenden Markers in der CP-Sequenz im PVX-Genom konnte nicht geschlossen werden, auf welche Art und Weise diese Rekombinanten erzeugt worden waren. Es konnte nicht festgestellt werden, ob der virale Replikationskomplex ein- oder zweimal das Template wechselte, um die PPV-Wild-Typ Sequenz zu restaurieren. Ebenso wurde nicht festgestellt, ob die 3'-NTR des PPV-CP im PVX-Genom für eine Initiation der Replikation funktionell war.

Neben diesen homologen Rekonstitutionen zur PPV-Wild-Typ Sequenz wurde die Assemblierungsmutante p35PPV-CP-RQ-D, über Rekombination mit der intakten vollständigen Sequenz des CP-SoC in chimärem pPVX, zu einem Virus mit chimärem Hüllproteingen rekonstituiert (siehe 4.7 und Anhang 8.8.41). Dieses bestand aus 5' und 3' PPV-NAT Sequenzen und zentralen CP-SoC Sequenzen. Nach der Definition von Lai (1992) handelt es sich bei dieser Rekombination um eine homologe Rekombination, da die beiden rekombinierenden Sequenzen eine Beziehung zueinander besitzen. Sie stellen zwei verschiedene Isolate eines Virus dar und weisen eine Sequenzhomologie von 81% auf. Dieses Rekombinationsereignis, welches zu der nachgewiesenen infektiösen- und ausbreitungsfähigen CP-Chimäre zweier PPV-Isolate führte, trat mit einer weitaus geringeren Häufigkeit auf, als die rekonstituierenden Rekombinanten der Assemblierungsmutanten mit pPVX-Bsp120I-CP-NAT. Weiterhin mußte aufgrund der nachgewiesenen Nukleotidaustausche diese Rekombinante über einen doppelten Templatewechsel des viralen Replikasekomplexes erzeugt worden sein. Da der 3'-Bereich des rekombinanten CP-Gens CP-NAT Sequenz darstellt, ist davon auszugehen, daß der Replikationskomplex die Synthese des Minusstranges auf der RNA der PPV Assemblierungsmutante initiierte. Er wechselte 3' vor der DF-KI Mutation auf das CP-SoC Transkript, um 5' nach der RQ-DV Mutation auf dem viralen Transkript die Synthese zu vervollständigen. Genau dieser doppelte "template-switch"

könnte die Ursache für die fehlende Reproduzierbarkeit der Rekombinante sein, wenn davon ausgegangen wird, daß der doppelte Templatewechsel weniger häufig auftritt, als der einfache. Das CP-SoC Gen im PVX-Genom war jedoch mit einer vollständigen 3'-NTR versehen, so daß die Rekombination prinzipiell auch über einen einfachen Templatewechsel möglich gewesen wäre. Wie im Anhang 8.8.42 angegeben, sind beim Vergleich der beiden unterschiedlichen 3'-NTR auf einer Länge von 221 Bp 11 Nukleotidaustausche zu finden. Daß der virale Replikasekomplex des PPV-NAT nicht in der Lage ist, die Minusstrangsynthese auf der 3'-NTR des PPV-SoC zu initiieren, ist unwahrscheinlich, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Um dies zu untersuchen, müßten entsprechende Versuche mit einer PPV-Chimäre mit PPV-SoC 3'-NTR durchgeführt werden. Unter Umständen könnte auch die PVX-Sequenz 3' von der 3'-NTR des CP-SoC, welche ebenfalls in der subgenomischen RNA des PVX noch vorhanden ist und an deren 3'-Ende sich das pA befindet, eine Bindung des viralen Replikationskomplexes verhindert haben. Dies würde dann allerdings auch für die Rekonstitution der Assemblierungsmutanten des PPV mit pPVX-Bsp120I-CP-NAT gelten. Ein weiterer Grund für die Seltenheit des Ereignisses könnte die Sequenzhomologie von nur 81% zwischen dem Gen von CP-NAT und CP-SoC sein.

Es war auffällig (siehe 4.7), daß die Rekombination, die zu einer CP-Chimäre aus CP-NAT mit einem zentralen Bereich des CP-SoC geführt hat, unter Annahme eines doppelten "template-switch", im chimären Gen theoretisch nur zu einem einzigen Aminosäureaustausch geführt hätte. Gerade diese Aminosäure Leucin (L) war jedoch zu Arginin (R) ausgetauscht, welches der CP-NAT Sequenz entspricht. Damit trägt die Rekombinante zwar 27 Nukleotidaustausche, jedoch keinen einzigen Aminosäureaustausch im Vergleich zur Wild-Typ Sequenz. Es bestehen mehrere Möglichkeiten, wie dieser Austausch erzeugt wurde. Es kommen Fehler des viralen Replikasekomplexes, der RT, der Taq-Polymerase oder der *E. coli* Polymerase in Frage. Nur Fehler des viralen Replikasekomplexes hätten einen möglichen Selektionsvorteil erzeugt. Es ist nicht auszuschließen, erscheint aber unwahrscheinlich, daß dieser Nukleotidaustausch zufällig eingefügt worden ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Das System wurde etabliert, um *in-vivo* virale Mutanten zu erzeugen und um virale Sequenzen auf ihre Fähigkeit zur Unterstützung der Rekombination untersuchen zu können. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen an, daß es in dem System möglich ist, sowohl Wild-Typ PPV zu rekonstituieren, wie auch eine PPV-Chimäre aus CP-NAT und CP-SoC zu erzeugen. Letzteres jedoch

mit einem nicht unerheblichen Aufwand.

Dieses System birgt jedoch Potential für weitergehende Untersuchungen. Die chimären CP-Gene (CP-NAT-ZYMV oder -PVY), zusammen mit einer Assemblierungsmutante, des p35PPV-NAT könnten in diesem System auf die Rekonstitutionsrate untersucht werden. Weiterhin könnte die minimale Länge einer PPV-CP Sequenz bestimmt werden, die noch in der Lage ist in diesem System eine CP-Mutante zu rekonstituieren. Ebenso besteht die Möglichkeit den Einfluß der 3'-NTR auf die Rekombinationshäufigkeit oder den Rekombinationsmechanismus genauer zu untersuchen.

5.8 Möglichkeiten zur Modifikation von viralen Sequenzen zur Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben am Beispiel eines *Potyvirus* gezeigt, daß die potentiellen Risiken der Heterologen Enkapsidierung, Komplementation und Rekombination in transgenen Pflanzen unterdrückt werden können. Es muß an dieser Stelle ganz deutlich darauf hingewiesen werden, daß Komplementation und Rekombination in Systemen nachgewiesen wurden, die für das Auftreten dieser Phänomene optimiert waren. Für die Detektion wurden virusresistente Pflanzen eingesetzt, die eine Recovery-Resistenz aufwiesen. Die Tatsache, daß der Resistenzmechanismus in diesen Pflanzen erst nach dem Erreichen einer systemischen Infektion einsetzte, ließ die jeweiligen Phänomene mit großer Häufigkeit auftreten. In Pflanzen, die eine Infektions-Resistenz aufweisen, wären mit hoher Wahrscheinlichkeit diese Phänomene nicht mit dieser Häufigkeit nachgewiesen worden.

Diese Ergebnisse sollen gemeinsam mit anderen Untersuchungen betrachtet werden, um die Möglichkeiten zur Modifikation von viralen Genen zur Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz aufzuzeigen.

Um die Phänomene wie Komplementation oder Heterologe Enkapsidierung zu unterdrücken, bestehen verschiedene Möglichkeiten. Zum einen können nichttranslatierbare Gene eingesetzt werden. Wenn das virale Protein nicht exprimiert wird, können fremden Viren auch keine Proteinfunktionen zur Verfügung gestellt werden. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse haben gezeigt, daß die *in-trans* Komplementation von Proteinfunktionen auch bei translatierbaren Genen verhindert

werden kann, indem Aminosäuren, die für bestimmte virale Funktionen notwendig sind, mutiert oder ganz weggelassen wurden. Diese prinzipielle Strategie läßt sich wahrscheinlich auch auf die Aminosäuremotive oder Bereiche anderer viraler Gene, die für Funktionen wie den Kurz-, Langstreckentransport oder die Blattlausübertragbarkeit verantwortlich sind, übertragen.

Für das Phänomen der Rekombination hingegen spielt es keine Rolle, ob die verwendeten viralen Gene translatierbar sind oder nicht. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, daß bestimmte Sequenzbereiche, wie zum Beispiel die 3'-NTR, eine Rekombination stärker unterstützen als andere. Wenn diese Sequenzbereiche wie in diesem Fall bekannt sind, können sie ohne Schwierigkeiten bei der Konstruktion der transgenen Sequenz weggelassen werden. Auch für die 5'-NTR der Potyviren kann davon ausgegangen werden, daß sie bei der Initiation der Replikation bei der Plusstrangsynthese eine Rolle spielen muß. Untersuchungen aus anderen Familien lassen diesen Schluß zu (French & Ahlquist, 1987 und Kim & Hemenway, 1996). Wenn die Bereiche, die bei der Initiation der Replikation eine Rolle spielen, die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Rekombinationen beeinflussen, sollten sie bei der Konstruktion transgener Sequenzen ausgespart werden.

Eine weitere Möglichkeit, Rekombination effektiv zu unterdrücken, besteht sicherlich darin, virale Sequenzen zu verwenden, die zu keinem funktionellen Protein translatiert werden können. Es konnte gezeigt werden, daß sich eine PPV Defektmutante über Rekombination mit dem intakten Transgen rekonstituieren kann. Mit einem defekten Transgen ist dies jedoch nicht möglich. Einen sehr erfolgversprechenden Ansatz stellt in diesem Fall die von Pang *et al.* (1997) untersuchte Möglichkeit der Verkürzung der viralen Gene dar. Wenn bekannt ist, welcher Teil des viralen Gens noch Resistenz vermittelt, könnte ein virales Gen durch das Weglassen bestimmter funktioneller Bereiche für die Unterdrückung der Rekombination optimiert werden. Bei der Suche nach Sequenzbereichen, die eine Rekombination unterstützen, kann das in dieser Arbeit entwickelte System der Expression von viralen Sequenzen mit dem Pflanzenexpressionsvektor pPVX-201 hilfreich sein (s.o.).

Weiterhin bietet das von Sijen *et al.* (1996) durchgeführte "mapping" der viralen Sequenz unter Umständen eine Möglichkeit, um den minimal notwendigen Bereich des Virusgens zur Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz einzugrenzen. Dabei werden sukzessive Teilfragmente des viralen Gens mit Hilfe des Pflanzenexpressionsvektors pPVX-201 transient in den transgenen Pflanzen exprimiert, um den Zielbereich

des pflanzeigenen Degradationsmechanismus zu bestimmen. Solche Untersuchungen könnten auch mit bereits vorhandenen transgenen Pflanzen durchgeführt werden, um folgende Generationen transgener virusresistenter Pflanzen bezüglich der biologischen Sicherheit zu optimieren.

Ein weiterer sehr wichtiger Punkt bei der Erzeugung von Pathogen-vermittelter Resistenz über die Herstellung von transgenen Pflanzen, ist die Kenntnis des Resistenzmechanismus. Wenn das Vorhandensein des viralen Proteins für den Resistenzeffekt essentiell ist, können unter Umständen Mutationen, die die Funktionalität des Proteins beeinflussen, eingefügt werden (Lapidot *et al.*, 1993). Die Mutationen können aber auch, wie am Beispiel des "movement-proteins" des TMV die Resistenz erst ermöglichen (Cooper *et al.*, 1995). Ob in diesem Fall jedoch ein stark verkürztes transgenes Protein noch den erwünschten Resistenzeffekt vermitteln könnte, ist bisher nicht untersucht. Um den Resistenzmechanismus feststellen zu können, bietet sich die Anwendung, der auch in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenexpressionsvektoren bei entsprechender Optimierung, an.

Erfolgversprechend für Aspekte der Rekombination erscheint die Selektion von transgenen Pflanzen, die gegenüber dem Virus, aus dem die entsprechende transgene Sequenz stammt, eine RNA-vermittelte Infektionsresistenz aufweisen. Eine Resistenz, die auf PTGS basiert, ist daher von Vorteil, weil nur geringe Mengen des transgenen Transkriptes und kein transgenes Protein vorhanden sind. Dies wird mit einiger Sicherheit die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Rekombinationen verringern. Die hier aufgezeigten Möglichkeiten zur Verhinderung der Rekombination in transgenen Pflanzen unterstützen den von Allison *et al.* (1996) aufgestellten Forderungskatalog zur Konstruktion von transgenen viralen Sequenzen, die die Rekombination mit fremden Viren verhindern könnten. Hier forderten die Autoren ebenfalls das Weglassen von Sequenzen, die an der Initiation der Replikation beteiligt sind, sowie möglichst kurze Sequenzen zu verwenden und transgene Linien zu selektieren, die minimale transgene Transkriptkonzentrationen aufweisen.

Die zu dem Thema der biologischen Sicherheit von transgenen virusresistenten Pflanzen vorliegenden Arbeiten und die hier in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß diese Risiken vermeidbar sind. Die Voraussetzung dafür ist nicht nur das Verständnis des Resistenzmechanismus, sondern auch die Kenntnis möglichst vieler Funktionen viraler Gene im Lebenszyklus des Virus mit den dazugehörigen Wirt-Interaktionen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Aaziz, R. & Tepfer, M., (1999). Recombination in RNA viruses and in virus resistant transgenic plants. *Journal of General Virology* **80**, 1339-1346.

Allison, R.F., Schneider, W.L. & Greene, A.E., (1996). Recombination in plants expressing viral transgenes. *Seminars in Virology* **7**, 417-422.

Ammar, E.D., Järlfors, U. & Pirone, T.P., (1994). Association of potyvirus helper component protein with virions and the cuticle lining in the maxillary food canal and foregut of an aphid vector. *Phytopathology* **84**, 1054-1060.

An, G., (1987). Binary Ti vectors for plant transformation and promotor analysis. In: R. Wu and L. Grossmann (Hrsg.): *Methods Enzymology* **153**, 292-305. Academic Press, Inc., San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.

An, G., Ebert, P.R., Mitra, A. & Ha, S.B., (1988). Binary vectors. *Plant Molecular Biology Manual* **A3**, 1-19. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C. & Vance, B.B. (1998). A viral suppressor of gene-silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 13079-13084.

Angell, S.H., Davies, C. & Baulcombe, D.C., (1996). Cell-to-cell movement of *Potato virus X* is associated with a change in the size-exclusion limit of plasmodesmata in trichome cells of *Nicotiana clevelandii*. *Virology* **216**, 197-201.

Angell, S.M. & Baulcombe, D.C., (1997). Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating *Potato virus X* RNA. *EMBO Journal* **16**, 3675-3684.

Andersen, K. & Johansen, E., (1998). A single conserved amino acid in the coat protein gene of *Pea seedborne mosaic potyvirus* modulates the ability of the virus to move systemically in *Chenopodium quinoa*. *Virology* **241**, 304-311.

Anonym, (1988). Verordnung zur Bekämpfung der Scharkakrankheit vom 7. Juni 1971. (Bundesgesetzblatt Teil 1 S. 804) geändert durch Verordnung vom 20. Mai 1988 (Bundesgesetzblatt Teil 1 S. 641).

Aranda, M.A., Fraile, A., Dopazo, J., Malpica, J.M. & Garcia-Arenal, F., (1997). Contribution of mutation and RNA recombination to the evolution of a plant pathogenic RNA. *Journal of Molecular Evolution* **44**, 81-88.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Atreya, P.L., Atreya, C.D. & Pirone, T.P. (1991). Amino acid substitution in the coat protein results in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**, 7887-7891.

Atreya, C.D., Atreya, P.L., Thornbury, D.W. & Pirone, T.P., (1992). Site-directed mutations in the potyvirus HC-pro gene affect helper component activity, virus accumulation and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology* **191**, 106-111.

Atreya, C.D. & Pirone, T.P., (1993). Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus - effects of amino-acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**, 11919-11923.

Atreya, P.L., Lopez-Moya, J.J., Chu, M., Atreya, C.D. & Pirone, T.P., (1995). Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology* **76**, 265-270.

Audy, P., Palukaitis, P., Slack, S.A. & Zaitlin, M., (1994). Replicase-mediated resistance to *Potato virus Y* in transgenic tobacco plants. *Molecular Plant Microbe Interactions* **7**, 15-22.

Barnett, O.W., (1991). *Potyviridae*, a proposed family of plant viruses. *Archives of Virology* **118**, 139-141.

Baulcombe, D.C., (1994). Replicase mediated resistance: A novel type of virus resistance in transgenic plants. *Trends in Microbiology* **2**, 60-63.

Baulcombe, D.C., Chapman, S. & Santa Cruz, S., (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infection. *The Plant Journal* **7**, 1045-1053.

Baulcombe, D.C., (1996). RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **32**, 79-88.

Baulcombe, D.C. & English, J.J., (1996). Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Current Opinions in Biotechnology* **7**, 173-180.

Beachy, R.N., (1997). Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinions in Biotechnology* **8**, 215-220.

Beck, D.L., Guilford, P.J., Voot, D.M., Andersen, M.T. & Forster, R.L.S., (1991). Triple block proteins of white clover mosaic potyvirus are required for transport. *Virology* **183**, 695-702.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Berger, P.H., Hunt, A.G., Domier, L.L., Hellmann, G.M., Stram, Y., Thornbury, D.W. & Pirone, T.P., (1989). Expression in transgenic plants of a viral gene product that mediates insect transmission of potyviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **86**, 8402-8406.

Birnboim, H.C. & Doly, J., (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1523.

Blanc, S., Lopez-Moya, J.J., Wang, R., Garcia-Lampasona, S., Thornbury, D.W. & Pirone, T.P., (1997). A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* **231**, 141-147.

Blanc, S., Ammar, E.D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J. & Pirone, T.P., (1999). Mutations in the helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *Journal of General Virology* **79**, 3119-3122.

Borja, M., Rubio, T., Scholthoff, H.B. & Jackson, A.O., (1999). Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene. *Molecular Plant Microbe Interactions* **12**, 153-162.

Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. & Baulcombe, D.C., (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal* **17**, 6739-6746.

Candelier-Harvey, P. & Hull, R., (1993). *Cucumber mosaic virus* genome is encapsidated in *Alfalfa mosaic virus* coat protein expressed in transgenic tobacco plants. *Transgenic Research* **2**, 277-285.

Candresse, T., Revers, F., LeGall, O., Kofalvi, S.A., Marcos, J. & Pallas, V., (1997). Systematic search for recombination events in plant viruses and viroids. In: Balacz, E. and Tepfer, M., (Editors), *Virus resistant transgenic plants: potential ecological impact*. pp. 20-25: Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.

Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D. & Dougherty, W.G., (1989). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO Journal* **8**, 365-370.

Carrington, J.C., Freed, D.D. & Oh, C.-S., (1990). Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. *EMBO Journal* **9**, 1347-1353.

Cervera, M.T., Riechmann, J.L., Martin, M.T. & Garcia, J.A., (1993). 3'-terminal sequences of *Plum pox virus* PS and o6 isolates: Evidence for RNA recombination within the potyvirus group. *Journal of General Virology* **74**, 329-334.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Chapman, S., Kavanagh, T. & Baulcombe, D.C., (1992).** *Potato virus X* as a vector for gene expression in plants. *The Plant Journal* **2**, 549-557.
- Chasan, R., (1993).** Harvesting virus recombinants. *The Plant Cell* **5**, 1489-1491.
- Chen, H., Nelson, R.S. & Sherwood, J.L., (1994).** Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug-selection. *Bio-Techniques* **16**, 664-669.
- Clough, G.H. & Hamm, P.B., (1995).** Coat protein transgenic resistance to *Watermelon mosaic* and *Zucchini yellow mosaic* virus in squash and cantaloupe. *Plant Disease* **79**, 1107-1109.
- Cooper, P.D., Steiner-Pryor, S., Scotti, P.D. & DeLong, D., (1974).** On the nature of poliovirus genetic recombination. *Journal of General Virology* **23**, 41-49.
- Cooper, B., Lapidot, M., Heick, J.A., Dodds, J.A. & Beachy, R.N., (1995).** A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* **206**, 307-313.
- Cooper, B., Schmitz, I., Rao, A.L.N., Beachy, R.N. & Dodds, J.A., (1996).** Cell-to-cell transport of movement-defective *Cucumber mosaic* and *Tobacco mosaic virus* in transgenic plants expressing heterologous movement proteins. *Virology* **216**, 208-213.
- Costa, A.S. & Müller, G.W., (1980).** Tristeza control by cross-protection-a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Disease* **64**, 538-541.
- Creamer, R. & Falk, B.W., (1990).** Direct detection of transcapsidated *Barley yellow dwarf luteovirus* in doubly infected plants. *Journal of General Virology* **71**, 211-217.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldemann-Cahill, R., Schaad, M.C. & Carrington, J.C., (1995).** Long distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component protease. *Plant Cell* **7**, 549-559.
- De Block, M. & Debrouwer, D., (1992).** *In-situ* enzyme histochemistry on plastic-embedded plant material. The development of an artefact-free β -Glucuronidase assay. *Plant Journal* **2**, 261-266.
- De Jong, W., Chu, A. & Ahlquist, P., (1995).** Coding changes in the 3a cell-to-cell movement gene can extend the host range of *Brome mosaic virus* systemic infection. *Virology* **214**, 464-474.
- Deom, C.M., Oliver, M.J. & Beachy, R.M., (1987).** The 30-kilodalton gene product of *Tobacco mosaic virus* potentiates virus movement. *Science* **237**, 389-394.

7 LITERATURVERZEICHNIS

De Zoeten, G.A., (1991). Risk assessment: Do we let history repeat itself. *Phytopathology* **81**, 585-586.

Dinant, S., Blaise, F., Kusiak, C., Astier-Manifacier, S. & Albouy, J., (1993). Heterologous resistance to *Potato virus Y* in transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of *Lettuce mosaic potyvirus*. *Phytopathology* **83**, 813-824.

Ding, S.W., Shi, B.J., Li, W.X. & Symons, R.H., (1996). An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**, 7470-7474.

Dolja, V.V., Boyko, V.P., Agranovsky, A.A. & Koonin, E.V. (1991). Phylogeny of capsid proteins of rod-shaped and filamentous RNA plant viruses: two families with distinct patterns of sequence and probably structure conservation. *Virology* **184**, 79-86.

Dolja, V.V. & Carrington, J.C., (1992). Evolution of positive-strand RNA viruses. *Seminars in Virology* **3**, 315-326.

Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A. & Carrington, J.C., (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of *Tobacco etch potyvirus*. *Virology* **206**, 1007-1016.

Dosba, F., Maison, P., Lansac, M. & Massonie, G., (1987). Experimental transmission of *Plum pox virus* (PPV) to *Prunus mahaleb* and *Prunus avium*. *Journal of Phytopathology* **120**, 199-204.

Dougherty, W.G., Lindbo, J.A., Smith, H.A., Parks, T.D., Swaney, S. & Proebsting, W.M., (1994). RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Molecular Plant Microbe Interactions* **5**, 544-552.

Edwards, M.C., Petty, I.T.D. & Jackson, A.O., (1992). RNA recombination in the genome of *Barley stripe mosaic virus*. *Virology* **189**, 389-392.

Elmayan, T. & Vaucheret, H., (1996). Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced posttranscriptionally. *Plant Journal* **9**, 787-797.

English, J.J., Mueller, E. & Baulcombe, D.C. (1996). Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *The Plant Cell* **8**, 179-188.

Falk, B.W. & Bruening, G. (1994). Will transgenic crops generate new viruses and new diseases? *Science* **263**, 1395-1396.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Fang, G. & Grumet, R., (1993). Genetic engineering of potyvirus resistance using constructs derived from the *Zucchini yellow mosaic virus* coat protein gene. *Molecular Plant Microbe Interactions* **6**, 358-367.

Farinelli, L., Malnoe, P. & Collet, G.F., (1992). Heterologous encapsidation of *Potato virus Y* strain 0 (PVY⁰) with the transgenic coat protein of PVY strain N (PVY^N) in *Solanum tuberosum* cv. Bintje. *Bio/Technology* **10**, 1020-1025.

Farinelli, L. & Malnoe, P., (1993). Coat protein gene-mediated resistance to potato-virus-Y in tobacco - examination of the resistance mechanisms - Is the transgenic coat protein required for protection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**, 284-292.

Figlerowicz, M., Nagy, P.D. & Bujarski, J.J., (1997). A mutation in the putative RNA polymerase gene inhibits nonhomologous, but not homologous, genetic recombination in an RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**, 2073-2078.

Finer, J.J., Vain, P., Jones, M.W. & McMullen, M.D., 1992. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports* **11**, 3222-3228.

Fitch, M.M.M., Manshardt, R.M., Gonsalves, D., Slightom, J.L. & Sandford, J.C., (1994). Virus resistant papaya plants derived from tissue bombarded with the coat protein gene of *Papaya ringspot virus*. *Bio/Technology* **10**, 1466-1472.

Fraile, A., Alonso-Prados, J.L., Aranda, M.A., Bernal, J.J., Malpica, J.M. & Garcia-Arenal, F., (1997). Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA plant virus. *Journal of Virology* **71**, 934-940.

French, R. & Ahlquist, P., (1987). Intercistronic as well as terminal sequences are required for efficient amplification of *Brome mosaic virus* RNA3. *Journal of Virology* **61**, 1457-1465.

Frischmuth, T. & Stanley, J., (1998). Recombination between viral DNA and the transgenic coat protein gene of *African cassava mosaic geminivirus*. *Journal of General Virology* **79**, 1265-1271.

Gal, S., Pisan, B., Hohn, T., Grimsley, N. & Hohn, B., (1992). Agroinfection of transgenic plants leads to viable *Cauliflower mosaic virus* by intermolecular recombination. *Virology* **187**, 525-533.

Gal-On, A., Meiri, E., Huet, H., Hua, W.J., Raccach, B. & Gaba, V., (1995). Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned DNA of *Zucchini yellow mosaic potyvirus*. *Journal of General Virology* **76**, 3223-3227.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Gal-On, A., Meiri, E., Raccah, B. & Gaba, V., (1998). Recombination of engineered defective RNA species produces infective potyvirus in planta. *Journal of Virology* **72**, 5268-5270.

Gibbs, M.J. & Cooper, J.I., (1995). A recombinational event in the history of luteoviruses probably induced by base-pairing between the genomes of two distinct viruses. *Virology* **206**, 1129-1132.

Glick, B.R., (1994). *Molekulare Biotechnologie*. Bernhard R. Glick; Jack J. Pasternak. Spektrum, Akademischer Verlag, Berlin; Heidelberg; Oxford.

Godon, C., Caboche, M. & Danielvedele, K., (1993). Transient plant gene expression - a simple and reproducible method based on flowing particle gun. *Biochimie* **75**, 591-595.

Götz, R. & Maiss, E., (1995). The complete nucleotide sequence and genome organization of the mite-transmitted *Brome streak mosaic rymovirus* in comparison with those of potyviruses. *Journal of General Virology* **76**, 2035-2042.

Golemboski, D.B., Lomonossoff, G.P. & Zaitlin, M., (1990). Plants transformed with a *Tobacco mosaic virus* nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **87**, 6311-6315.

Goodwin, J., Chapman, K., Swaney, S., Parks, T.D., Wernsman, E.A. & Dougherty, W.D., (1996). Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell* **8**, 95-105.

Gray, D.J., Hiebert, E., Lin, C.M., Compton, M.E., McColley, D.W., Harrison, R.J. & Gaba, V.P., (1994). Simplified construction and performance of a device for particle bombardment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **37**, 179-184.

Greene, A.E. & Allison, R.F., (1994). Recombination between viral-RNA and transgenic plant transcripts. *Science* **263**, 1423-1425.

Greene, A.E. & Allison, R.F., (1996). Deletions in the 3' untranslated region of *Cowpea chlorotic mottle virus* transgene reduce recovery of recombinant viruses in transgenic plants. *Virology* **225**, 231-234.

Grumet, R., Bada, R. & Hammar, J., (1992). Analysis of the *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) potyviral helper component, possible identification of an aphid-interaction domain. *Phytopathology* **82**, 1176.

Guo, H.S. & Garcia, J.A., (1997). Delayed resistance to *Plum pox potyvirus* mediated by a mutated RNA replicase gene: involvement of a gene-silencing mechanism. *Molecular Plant Microbe Interactions* **10**, 160-170.

Habili, N. & Francki, R.I., (1974). Comparative studies on *Tomato aspermy* and *Cucumber mosaic viruses*. III. Further studies on relationship and construction of a virus from parts of the two viral genomes. *Virology* **61**, 443-449.

Hagen, L.S., Lot, H., Godon, C., Tepfer, M. & Jaquemond, M., (1994). Infection of *Theobroma cacao* using cloned DNA of *Cacao swollen shoot virus* and particle bombardment. *Phytopathology* **84**, 1239-1243.

Haldeman-Cahill, R., Daros, J.A. & Carrington, J.C., (1998). Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the *Tobacco etch virus* genome. *Journal of Virology* **72**, 4072-4079.

Hamdorf, G., (1992). Untersuchungen über die Anfälligkeit von von Pflaumen- und Zwetschensorten gegenüber dem Scharka-Virus (PPV). *Erwerbsobstbau* **2**, 39-46.

Hamilton, A. & Baulcombe, D.C., (1998). Investigations into the use and mechanisms of gene silencing. Abstract 1.12.20. VIIIth International Congress of Plant Pathology, Birmingham.

Hammond, J. & Kamo, K.K., (1995). Effective resistance to potyvirus infection conferred by expression of antisense RNA in transgenic plants. *Molecular Plant Microbe Interactions* **8**, 674-682.

Hancock, J.M., Chaleeprom, W., Dale, J. & Gibbs, A., (1995). Replication slippage in the evolution of potyviruses. *Journal of General Virology* **76**, 3229-3232.

Hartmann, W., (1995). Elena - eine neue spätreife Zwetschensorte aus Hohenheim. *Obstbau* **20**, 443-445.

Hartmann, W., Grzyb, Z.S., Zmarlicki, K. & Sitarek, M., (1997). Strategy for breeding sharka resistant plums. *Acta-Horticulturae* **478**, 31-38.

Hemenway, C.A., Fang, R.X., Kaniewski, W.K., Chua, N.-H. & Tumer, N.E., (1988). Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the *Potato virus X* coat protein or its antisense RNA. *EMBO Journal* **7**, 1273-1280.

Higgins, D.G. & Sharp, P.M., (1989). Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS* **5**, 151-153.

Hobbs, H.A., Reddy, D.V.R., Rajeshwari, P. & Reddy, A.S., (1987). Use of direct antigen coating and protein A coating ELISA procedures for detection of three peanut viruses. *Plant Disease* **71**, 747-749.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. & Schilperoort, R.A., (1983). A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *A. tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**, 179-180.

Holland, J.J. & Domingo, E., (1998). Origin and evolution of viruses. *Virus Genes* **16**, 13-21.

Hollings, M. & Brunt, A.A., (1981). Potyviruses. In *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, pp 731-807. Edited by E. Kustak. New York: Elsevier/Noth-Holland.

Holt, C.A. & Beachy, R.N., (1991). In vivo complementation of infectious transcripts from mutant *Tobacco mosaic virus* cDNAs in transgenic plants. *Virology* **181**, 109-117.

Hong, Y., Levay, K., Murphy, J. F., Klein, P.G., Shaw, J.G. & Hunt, A.G., (1995). A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. *Virology* **214**, 159-166.

Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. & Fraley, R.T., (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229-1231.

Hu, W.W., Wong, S.M., Goh, C.J. & Loh, C.S., (1998). Synergism in replication of *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) RNA in orchid protoplasts. *Archives of Virology* **143**, 1265-1275.

Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H. & Raccah, B., (1994). Mutations in the helper component protease gene of *Zucchini yellow mosaic-virus* affect its ability to mediate aphid transmissibility. *Journal of General Virology* **75**, 1407-1414.

Ingelbrecht, I.L., Irvine, J.E. & Mirkov, T.E., (1999). Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. *Plant Physiology* **119**, 1187-1198.

Jacquet, C., Delecolle, B., Raccah, B., Lecoq, H., Dunez, J. & Ravelonandro, M., (1998a). Use of modified *Plum pox virus* coat protein genes developed to limit heteroencapsidation-associated risks in transgenic plants. *Journal of General Virology* **79**, 1509-1517.

Jacquet, C., Ravelonandro, M., Bachelier, J. & Dunez, J., (1998b). High resistance to *Plum pox virus* (PPV) in transgenic plants containing modified and truncated forms of PPV coat protein gene. *Transgenic Research* **7**, 29-39.

Jakab, G., Vaistij, F.E., Droz, E. & Malnoe, P., (1997). Transgenic plants expressing viral sequences create a favourable environment for recombination between viral sequences. In: Balácz, E. and Tepfer, M., (Editors), *Virus resistant transgenic plants: potential ecological impact*. pp. 45-50: Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. & Bevan, M.W., (1987). GUS fusions: Beta-Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* **6**, 3901-3907.

Jones, A.L., Johansen, I.E., Bean, S.J., Bach, I. & Maule, A.J., (1998). Specificity of resistance to *Pea seed-borne mosaic potyvirus* in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. *Journal of General Virology* **79**, 3129-3137.

Kantrong, S., Saunal, H., Briand, J.P. & Sako, N., (1995). A single amino acid substitution at N-terminal region of coat protein of *Turnip mosaic virus* alters antigenicity and aphid transmissibility. *Archives of Virology* **140**, 453-467.

Kaplan, I.B., Shintaku, M.H., Li, Q., Zhang, L., Marsh, L.E. & Palukaitis, P., (1995). Complementation of virus movement in transgenic tobacco expressing the *Cucumber mosaic virus 3a* gene. *Virology* **209**, 188-199.

Kegler, H., Fuchs, E., Gruntzig, M. & Schwarz, S., (1998). Some results of 50 years' research on sharka resistance. Originaltitel: Einige Ergebnisse 50jähriger Forschung zur Scharkaresistenz. *Erwerbsobstbau* **40**, 180-184.

Kim, K.H. & Hemenway, C., (1996). The 5' nontranslated region of *Potato virus X* RNA affects both genomic and subgenomic RNA synthesis. *Journal of Virology* **70**, 5533-5540.

Korte, A.M., Maiss, E., Kramer, I. & Casper, R., (1995). Biosafety considerations of different *Plum pox potyvirus* (PPV) genes used for transformation of plants. *Acta Horticulturae* **368**, 280-284. XVI International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases.

Kunze, L. & Nikusch, I., (1996). Schäden an "Ortenauer Zwetsche" durch Scharkabefall. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **38**, 72-75.

Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lahaye, T., Rueger, B., Toepsch, S., Thalhammer, J. & Schulze-Lefert, P., (1996). Detection of single-copy sequences with digoxigenin-labeled probes in a complex plant genome after separation on pulsed-field gels. *Biotechniques* **21**, 1067-1072.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Lai, M.M.C., (1992). RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiological Reviews* **56**, 61-79.

Landsmann, J., Llewellyn, D., Dennis, E.S. & Peacock, W.G., (1988). Organ regulated expression of the *Parasponia andersonii* haemoglobin gene in transgenic tobacco plants. *Molecular and General Genetics* **214**, 68-73.

Lanneau, M. & Candresse, T., (1993). Simplified immunocapture-PCR protocol. Cost 88 Plum Pox Virus Workshop; Moncada, Spain.

Lapidot, M., Gafney, R., Ding, B., Wolf, S., Lucas, W.J. & Beachy, R.N., (1993). A dysfunctional movement protein of *Tobacco mosaic virus* that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant Journal* **4**, 959-970.

Lecoq, H., Ravelonandro, M., Wipf-Scheibel, C., Monsion, M., Raccah, B. & Dunez, J., (1994). Significance of the heterologous encapsidation of *Zucchini yellow mosaic potyvirus* in transgenic plants expressing plum box potyvirus capsid protein. *Bulletin OEPP* **24**, 555-559.

Le Gall, O., Lanneau, M., Candresse, T. & Dunez, J., (1995). The nucleotide sequence of the RNA-2 of an isolate of the english serotype of *Tomato black ring virus*: RNA recombination in the history of nepoviruses. *Journal of General Virology* **76**, 1279-1283.

Li, H.X. & Carrington, C., (1995). Complementation of *Tobacco etch potyvirus* mutants by active RNA polymerase expressed in transgenic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**, 457-461.

Lindbo, J.A. & Dougherty, W.G., (1992a). Untranslatable transcripts of the *Tobacco etch virus* coat protein gene sequence can interfere with *Tobacco etch virus* replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* **189**, 725-733.

Lindbo, J.A. & Dougherty, W.G., (1992b). Pathogen-derived resistance to a potyvirus: Immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**, 144-153.

Lindbo, J.A., Silvarosales, L., Proebsting, W.M. & Dougherty, W.G., (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants - Implications for regulation of gene-expression and virus-resistance *Plant Cell* **5**, 1749-1759.

Ling, K., Namba, S., Gonsalves, C., Slightom, J.L. & Gonsalves, D., (1991). Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the *Papaya ringspot virus coat* protein gene. *Bio/Technology* **9**, 752-758.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Loebenstein, G., (1962).** Inducing partial protection in the host plant with native virus protein. *Virology* **17**, 574-581.
- Loesch-Fries, L.S., Merlo, D., Zinnen, T., Burhop, L. & Hill, K., (1987).** Expression of *Alfalfa mosaic virus* RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO Journal* **6**, 1845-1851.
- Lommel, S.A. & Xiong, Z., (1991).** Reconstitution of a functional *Red clover necrotic mosaic virus* by recombinational rescue of the cell-to-cell movement gene expressed in transgenic plants. *Journal of Cellular Biochemistry* **15A**, 151.
- Lomonossov, G.P., (1995).** Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **33**, 323-342.
- Lopez-Moya, J.J. & Pirone, T.P., (1998).** Charge changes near the N terminus of the coat protein of two potyviruses affect virus movement. *Journal of General Virology* **79**, 161-165.
- Luo, G.X. & Taylor, J., (1990).** Template switching by reverse transcriptase during DNA synthesis. *Journal of Virology* **64**, 4321-4328.
- MacFarlane, S.A., (1997).** Natural recombination among plant virus genomes: Evidence from tobamoviruses *Seminars in Virology* **8**, 25-31.
- Maia, I.G. & Bernardi, F., (1996).** Nucleic acid binding properties of a bacterially expressed *Potato virus Y* helper component-proteinase. *Journal of General Virology* **77**, 869-877.
- Maiss, E., Timpe, U., Briske, A., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, G., Mattanovich, D. & Katinger, H.W.D., (1989).** The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* RNA. *Journal of General Virology* **70**, 513-524.
- Maiss, E., Koenig, R. & Lesemann, D.-E., (1995).** Heterologous encapsidation of viruses in transgenic plants and in mixed infections. 3rd International Symposium on the biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms, Monterey, California United States. 14.-16.11.1994; p 129-140.
- Maiss, E., Timpe, U., Briske, A., Lesemann, D.E. & Casper, R., (1992).** Infectious in vivo transcripts of *Plum pox potyvirus* full-length cDNA clone containing the *Cauliflower mosaic virus* 35S RNA promoter. *Journal of General Virology* **73**, 709-713.
- Maiss, E., (1993).** Das Scharka-Virus der Pflaume (PPV): Ein Beispiel für die Nutzung der molekularbiologischen Charakterisierung von Pflanzenviren. Habilitationsschrift Universität Hannover.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Maiss, E., Briske-Rode, A., Rusche, A. & Casper, R., (1993). Influence of a coat protein sequence motif on aphid transmission of different *Plum pox virus* (PPV) isolates. IXth International Congress of Virology, Glasgow, 360.

Maiti, I.B., Murphy, J.F., Shaw, J.G. & Hunt, A.G., (1993). Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**, 6110-6114.

Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. & Collins, F.S., (1990). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Research* **19**, 1156.

Mattanovich, D., Ruker, F., Machado, A.C., Laimer, M., Regner, F., Steinkellner, H., Himmler, G. & Katinger, H., (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation. *Nucleic Acids Research* **17**, 6747.

Matthews, R.E.F., (1991). *Plant Virology*. Third Edition, Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.

McKinney, H.H., (1929). Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *Journal of Agricultural Research* **39**, 557-578.

Merits, A., Guo, D. & Saarma, M., (1998). VPg, CP and five nonstructural proteins of *Potato virus A* potyvirus bind RNA in a sequence unspecific manner. *Journal of General Virology* **79**, 3123-3127.

Metzlaff, M., O'Dell, M., Cluster, P.D. & Flavell, R.B., (1997). RNA-mediated RNA degradation and chalcone A silencing in petunia. *Cell* **88**, 845-854.

Milne, R.G. & Lesemann, D.-E., (1984). Immunosorbent electron microscopy in plant virus studies. In: Maramorosch, K., and Koprowski, H. (Editors), *Methods in Virology*, Vol. VIII, pp. 85-101. Academic Press, Orlando, Fl.

Moreno, M., Bernal, J.J., Jimenez, I. & Rodriguez-Cerezo, E., (1998). Resistance in plants transformed with the P1 or P3 gene of *Tobacco vein mottling potyvirus*. *Journal of General Virology* **79**, 2819-2827.

Morozov, S.Y., Fedorkin, O.N., Juttner, G., Schiemann, J., Baulcombe, D.C. & Atabekov, J.G., (1997). Complementation of a *Potato virus X* mutant mediated by bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes. *Journal of General Virology* **78**, 2077-2083.

Mullis, K. & Faloona, F., (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335-350.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Murashige, T. & Skoog, F., (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* **15**, 473-497.

Nagel, R., Elliot, A., Masel, A., Birch, R.G. & Manners, J.M., (1990). Elektroporation of binary Ti plasmids vektors into *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes*. *FEMS Microbiology Letters* **67**, 325-328.

Nagy, P.D., Dzanott, A., Ahlquist, P. & Bujarski, J.J., (1995). Mutations in the helicase-like domain of protein 1a alter the sites of RNA-RNA recombination in *Brome mosaic virus*. *Journal of Virology* **69**, 2547-2556.

Nagy, P.D. & Bujarski, J.J., (1996). Homologous RNA recombination in *Brome mosaic virus*: AU-rich sequences decrease the accuracy of crossovers. *Journal of Virology* **70**, 415-426.

Nagy, P.D. & Simon, A.E., (1997). New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* **235**, 1-9.

Namba, S., Ling, K., Gonsalves, C., Slightom, J.L. & Gonsalves, D., (1992). Protection of transgenic plants expressing the coat protein gene of *Watermelon mosaic virus II* or *Zucchini yellow mosaic virus* against six potyviruses. *Phytopathology* **82**, 940-946.

Negrone, M., Ricchetti, M., Nouvel, P. & Buc, H., (1995). Homologous recombination promoted by reverse transcriptase during copying of two distinct RNA templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**, 6971-6975.

Nemchinov, L., Hadidi, A., Maiss, E., Cambra, M., Candresse, T. & Damsteegt, V., (1996). Sour cherry strain of *Plum pox potyvirus* (PPV): Molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains. *Phytopathology* **86**, 1215-1221.

Osbourn, J.K., Sarkar, S. & Wilson, T.M., (1990). Complementation of coat protein-defective TMV mutants in transgenic tobacco plants expressing TMV coat protein. *Virology* **179**, 921-925.

Pang, S.Z., Jan, F.-J. & Gonsalves, D., (1997). Nontarget DNA sequences reduce the transgenic length necessary for RNA-mediated tospovirus resistance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**, 8261-8266.

Peng, Y.H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y. & Raccah, B., (1998). Mutations in the HC-Pro gene of *Zucchini yellow mosaic potyvirus*: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *Journal of General Virology* **79**, 897-904.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Perl, A., Kless, H., Blumenthal, A., Galili, G. & Galun, E., (1992). Improvement of plant regeneration and *gus* expression in scutellar wheat calli by optimization of culture conditions and DNA-microprojectile delivery procedures. *Molecular and General Genetics* **235**, 279-84.

Petruschke, M., (1990). Scharkatolerante Sorten für einen wirtschaftlichen Pflaumen- und Zwetschenanbau. *Erwerbsobstbau*, **32**, 80-83.

Polak, J., Oukropec, I., Kominek, P., Krska, B. & Bittoova, M., (1997). Detection and evaluation of resistance of apricots and peaches to *Plum pox virus*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. **104**, 466-473.

Powell, P.A., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T. & Beachy, R.N., (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the *Tobacco mosaic virus* coat protein gene. *Science* **232**, 738-743.

Powell, P.A., Sanders, P.R., Tumer, N., Fraley, R.T. & Beachy, R.N., (1990). Protection against *Tobacco mosaic virus* infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than than coat protein RNA sequences. *Virology* **175**, 124-130.

Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. & Bowman Vance, V., (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**, 859-868.

Ravelonandro, M., Monsion, M., Delbos, R. & Dunez, J., (1993). Variable resistance to *Plum pox virus* and *Potato virus-Y* infection in transgenic *Nicotiana* plants expressing *Plum pox virus* coat protein. *Plant Science* **91**, 157-169.

Regner, F., da Camara Machado, A., da Camara Machado, M.L., Steinkellner, H., Mattanovich, D., Hanze, V., Weiss, H. & Katinger, H., (1992). Coat protein mediated resistance to *Plum pox virus* in *Nicotiana clevelandii* and *benthamiana*. *Plant Cell Reporter* **11**, 33-33.

Restrepo-Hartwig, M.A. & Carrington, J.C., (1994). The *Tobacco etch potyvirus* 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *Journal of Virology* **68**, 2388-2397.

Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T. & Maule, A.J., (1999). New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Molecular Plant Microbe Interactions* **12**, 367-376.

Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., Le Romancer, M. & Dunez, J., (1996). Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Journal of General Virology* **77**, 1953-1965.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Riechmann, J.L., Lain, S. & Garcia, J.A., (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* **73**, 1-16.

Robinson, D.J., Hamilton, W.D.O., Harrison, B.D. & Baulcombe, D.C., (1987). Two anomalous tobamovirus isolates: Evidence for RNA recombination in nature. *Journal of General Virology* **68**, 2551-2561.

Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L. & Lucas, W.J., (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**, 283-295.

Roossinck, M.J., (1997). Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology* **35**, 191-209.

Rott, M.E., Tremaine, J.H. & Rochon, D.M., (1991). Comparison of the 5' and 3'-termini of *Tomato ringspot virus* RNA1 and RNA2: Evidence for RNA recombination. *Virology* **185**, 468-472.

Ruiz, M.T., Voinnet, O. & Baulcombe, D.C., (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant Cell* **10**, 937-946.

Russell, R.B., Saqi, M.A., Sayle, R.A., Bates, P.A. & Sternberg, M.J., (1997). Recognition of analogous and homologous protein folds: analysis of sequence and structure conservation. *Journal of Molecular Biology* **269**, 423-439.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A., (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Salanki, K., Carrère, I., Jaquemond, M., Balázs, E. & Tepfer, M., (1997). Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with *Cucumber mosaic virus* and *Tomato aspermy virus*. *Journal of Virology* **71**, 3597-3602.

Salomon, R. & Bernardi, F., (1995). Inhibition of viral aphid transmission by the N-terminus of the *Maize dwarf mosaic virus* coat protein. *Virology* **213**, 676-679.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., (1989): *Molecular cloning*. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R., (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **74**, 5463-5467.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Schoelz, J.E. & Wintermantel, W.M., (1993). Expansion of viral host range through complementation and recombination in transgenic plants. *Plant Cell* **5**, 1669-1679.

Scorza, R., Ravelonandro, M., Callahan, A.M., Cordts, J.M., Fuchs, M., Dunez, J. & Gonsalves, D., (1994). Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the *Plum pox virus* coat protein gene. *Plant Cell Reports* **14**, 18-22.

Shi, X.M., Miller, H., Verchot, J., Carrington, J.C. & Vance, V.B., (1997). Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate *Potato virus X*/potyviral synergism. *Virology* **231**, 35-42.

Shirako, Y. & Brakke, M.K., (1984). Spontaneous deletion mutation of *Soil-borne wheat mosaic virus* RNA II. *Journal of General Virology* **65**, 855-858.

Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H. & Ward, C.W., (1988). The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of General Virology* **69**, 1497-1508.

Sijen, T., Wellink, J., Hiriart, J.-B. & Van Kammen, A., (1996). RNA-mediated virus resistance: role of repeated transgenes and delineation of targeted regions. *The Plant Cell* **8**, 2277-2294.

Silva-Rosales, L., Lindbo, J.A. & Dougherty, W.G., (1994). Analysis of transgenic tobacco plants expressing a truncated form of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Plant Molecular Biology* **24**, 929-939.

Simon, A.E. & Bujarski, J.J., (1994). RNA-RNA recombination and evolution in virus infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **32**, 337-362.

Smith, H.A., Swaney, S.L., Parks, T.D., Wernsman, E.A. & Dougherty, W.G., (1994). Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation, and fate of nonessential RNA. *The Plant Cell* **6**, 1441-1453.

Solovyev, A.G., Zelenina, D.A., Savenkov, E.I., Grzelishvili, V.Z., Morozov, S.Y., Lesemann, D.-E., Maiss, E., Casper, R. & Atabekov, J.G., (1996). Movement of a *Barley stripe mosaic virus* chimera with a *Tobacco mosaic virus* movement protein. *Virology* **217**, 435-441.

Solovyev, A.G., Zelenina, D.A., Savenkov, E.I., Grzelishvili, V.Z., Morozov, S.Yu, Maiss, E., Casper, R. & Atabekov, J.G., (1997). Host-controlled cell-to-cell movement of a hybrid *Barley stripe mosaic virus* expressing a dianthovirus movement protein. *Intervirology* **40**, 1-6.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Solovyev, A.G., Savenkov, E.I., Grdzelishvili, V.Z., Kalinina, N.O., Morozov, S.Y., Schiemann, J. & Atabekov, J.G., (1999). Movement of hordeivirus hybrids with exchanges in the triple gene block. *Virology* **253**, 278-287.

Spillane, C., Verchot, J., Kavanagh, T.A. & Baulcombe, D.C., (1997). Concurrent suppression of virus replication and rescue of movement-defective virus in transgenic plants expressing the coat protein of *Potato virus X*. *Virology* **15**, 76-84.

Swaney, S., Powers, H., Goodwin, J., Rosales, L.S. & Dougherty, W.G., (1995). RNA-mediated resistance with nonstructural genes from the *Tobacco etch virus* genome. *Molecular Plant Microbe Interactions* **8**, 1004-1011.

Tanzer, M.M., Thompson, W.F., Law, M.D., Wernsman, E.A. & Uknes, S., (1997). Characterization of post-transcriptionally suppressed transgene expression that confers resistance to *Tobacco etch virus* infection in tobacco plants. *Plant Cell* **9**, 1411-1423.

Tavert-Roudet, G., Ravelonandro, M., Bachelier, J-C. & Dunez, J., (1998). Transgenic *Nicotiana benthamiana* plants containing the P1 gene of *Plum pox virus* are resistant to virus challenge. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 103-107.

Tepfer, M., (1993). Viral genes and transgenic plants. What are the potential environmental risks? *Bio/Technology* **11**, 1125-1132.

Timpe, U., Maiss, E., Landsmann, J. & Casper, R., (1992). "Coat protein mediated cross protection" gegen das Scharka Virus. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* **238**, 212.

Thornbury, D.W., Patterson, C.A., Dessens, J.T. & Pirone, T.P., (1990). Comparative sequence of the helper component (HC) region of *Potato virus Y* and a HC-defective strain, *Potato virus C*. *Virology* **178**, 573-578.

Towbin, H., Theophil, S. & Gordon, J., (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamidgels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **76**, 4350-4354.

Ullmann, A., (1967). Characterisation by in-vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase gene of *E. coli*. *Journal of Molecular Biology* **24**, 339.

Van den Boogart, T., Lomonossoff, G.P. & Davies, J.W., (1998). Can we explain RNA-mediated virus resistance by homology dependant gene silencing. *Molecular Plant Microbe Interactions* **11**, 717-723.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Van Houdt, H., Ingelbrecht, I., Van Montagu, M. & Depicker, A., (1997). Post-transcriptional silencing of a neomycin phosphotransferase II transgene correlates with the accumulation of unproductive RNAs and with increased cytosin methylation of 3' flanking regions. *Plant Journal* **12**, 379-392.

Vardi, E., Sela, I., Edelbaum, O., Livneh, O., Kuznetsova, L. & Stram, Y., (1993). Plants transformed with a cistron of a *Potato virus-Y* protease (Nia) are resistant to virus-infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**, 7513-7517.

Verwoerd, T.C., Dekker, B.M.M. & Hoekema, A., (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research* **17**, 2362.

Vieira, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 159-268.

Voinnet, O., Vain ,P., Angell, S. & Baulcombe, D.C., (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**, 177-187.

Wassenegger, M. & Pelissier, T., (1998). A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Molecular Biology* **37**, 349-362.

Weber, K. & Osborne, M., (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* **224**, 4406-4412.

Wen, F. & Lister, R.M., (1991). Heterologous encapsidation in mixed infections among four isolates of *Barley yellow dwarf virus*. *Journal of General Virology* **72**, 2217-2223.

White, J.L. & Kaper, J.M., (1989). A simple method for detection of viral satellite RNAs in small tissue samples. *Journal of Virological Methods* **23**, 83-94.

White, K.A. & Morris. T.J., (1994). Recombination between defective tombusvirus RNAs generates functional hybrid genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**, 3642-3646.

White, J.L. (1999). An overview on cultivation of virus-resistant crops in the United States. In *Proceedings of the 5th international symposium of biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms*. Edited by J. Schiemann and R. Casper. Braunschweig. (In press).

Wittner, A., Palkovics, L. & Balazs, E., (1998). *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the *Plum pox virus* helicase gene are resistant to virus infection. *Virus Research* **53**, 97-103.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Wintermantel, W.M. & Schoelz, J.E., (1996). Isolation of recombinant viruses between *Cauliflower mosaic virus* and a viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selection pressure. *Virology* **223**, 156-164.

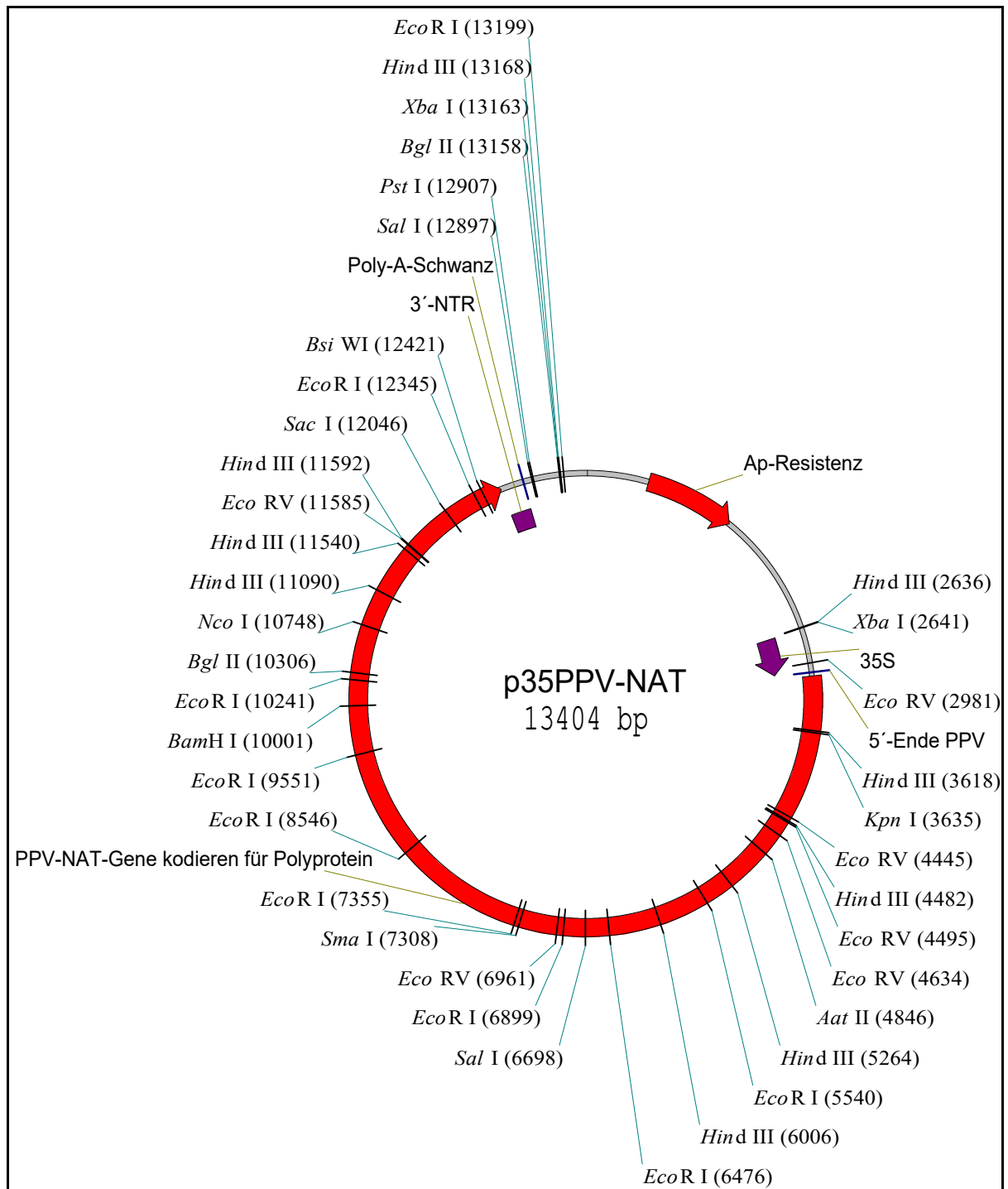
Wu, Y. & Shaw, J.G., (1998). Evidence that assembly of a potyvirus begins near the 5' terminus of the viral RNA. *Journal of General Virology* **79**, 1525-1529.

Zaphiropoulos, P.G., (1998). Non-homologous recombination mediated by *Thermus aquaticus* DNA polymerase I. Evidence supporting a copy choice mechanism. *Nucleic Acids Research* **26**, 2843-2848.

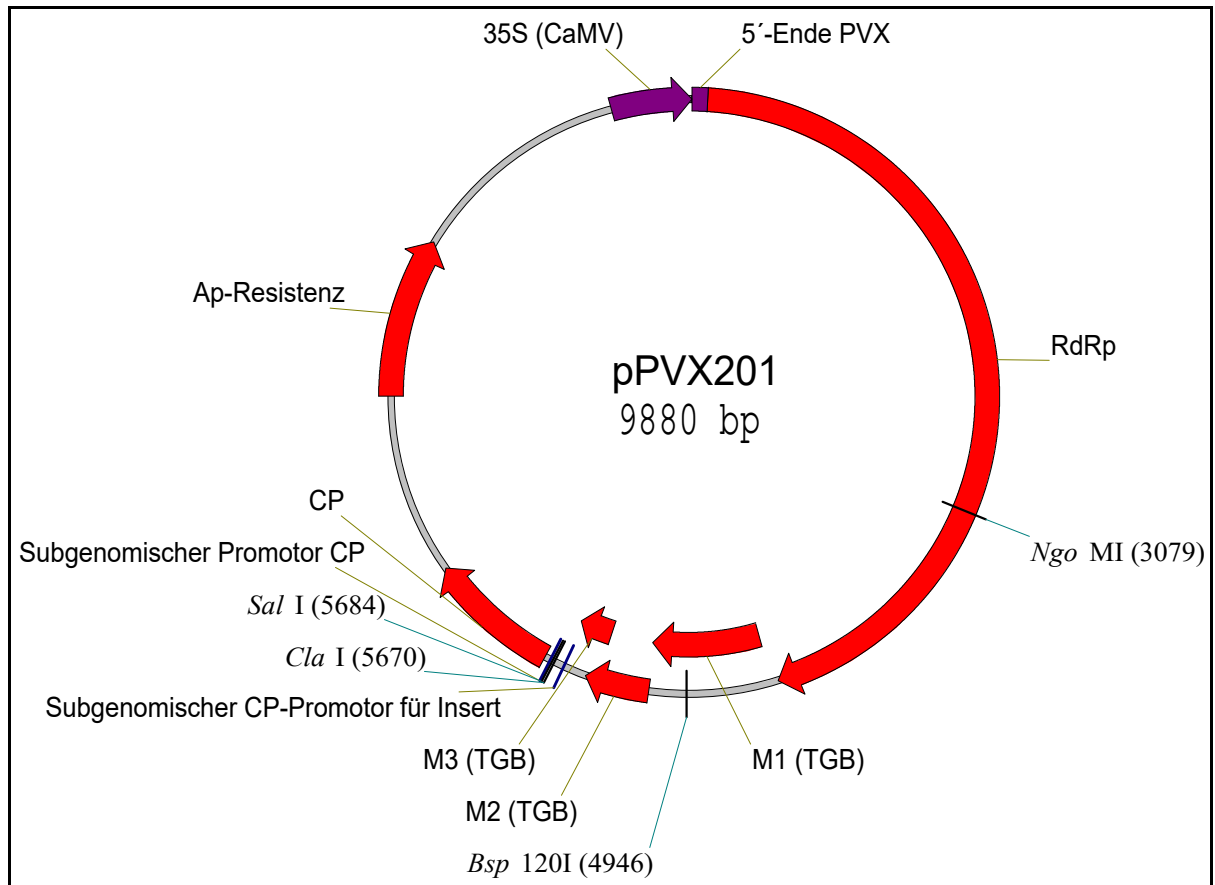
8 ANHANG

8.1 Virale infektiöse full-length Klone

p35PPV-NAT (Prof. Dr. E. Maiß)



pPVX201, (Prof. Dr. D.C. Baulcombe)

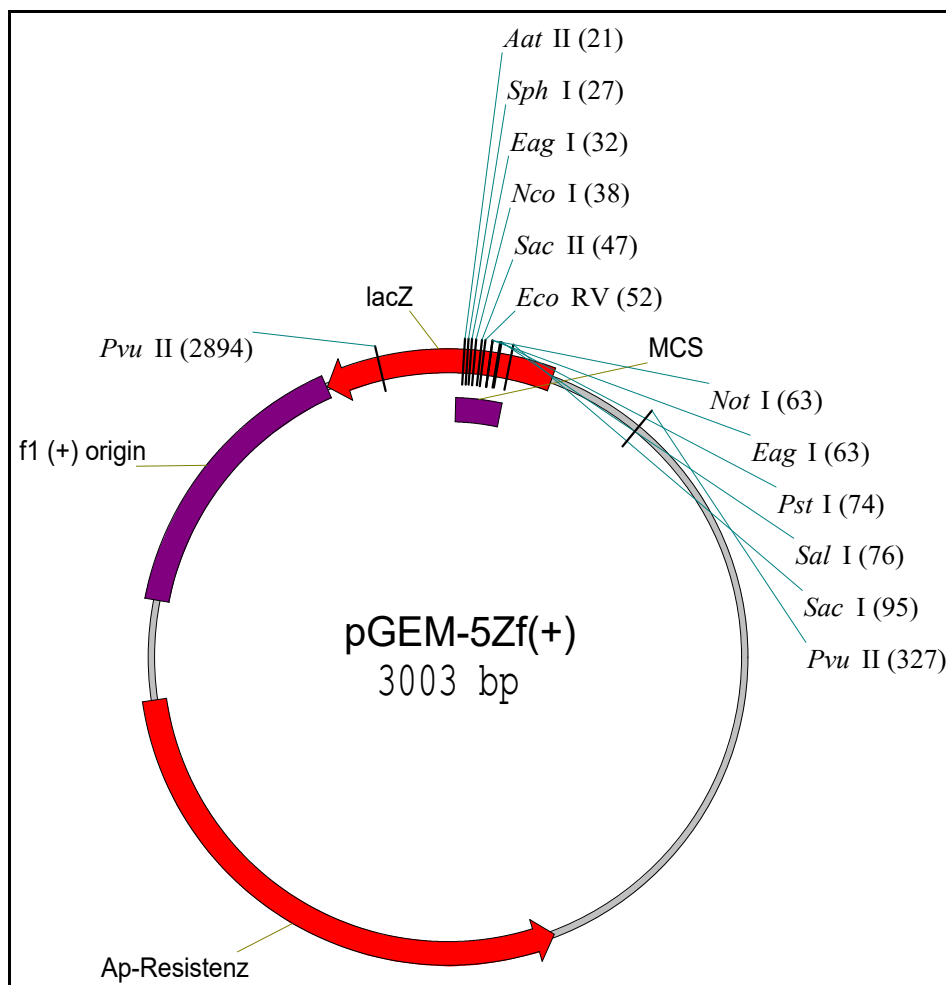


8.2 Plasmide und Klonierungsvektoren

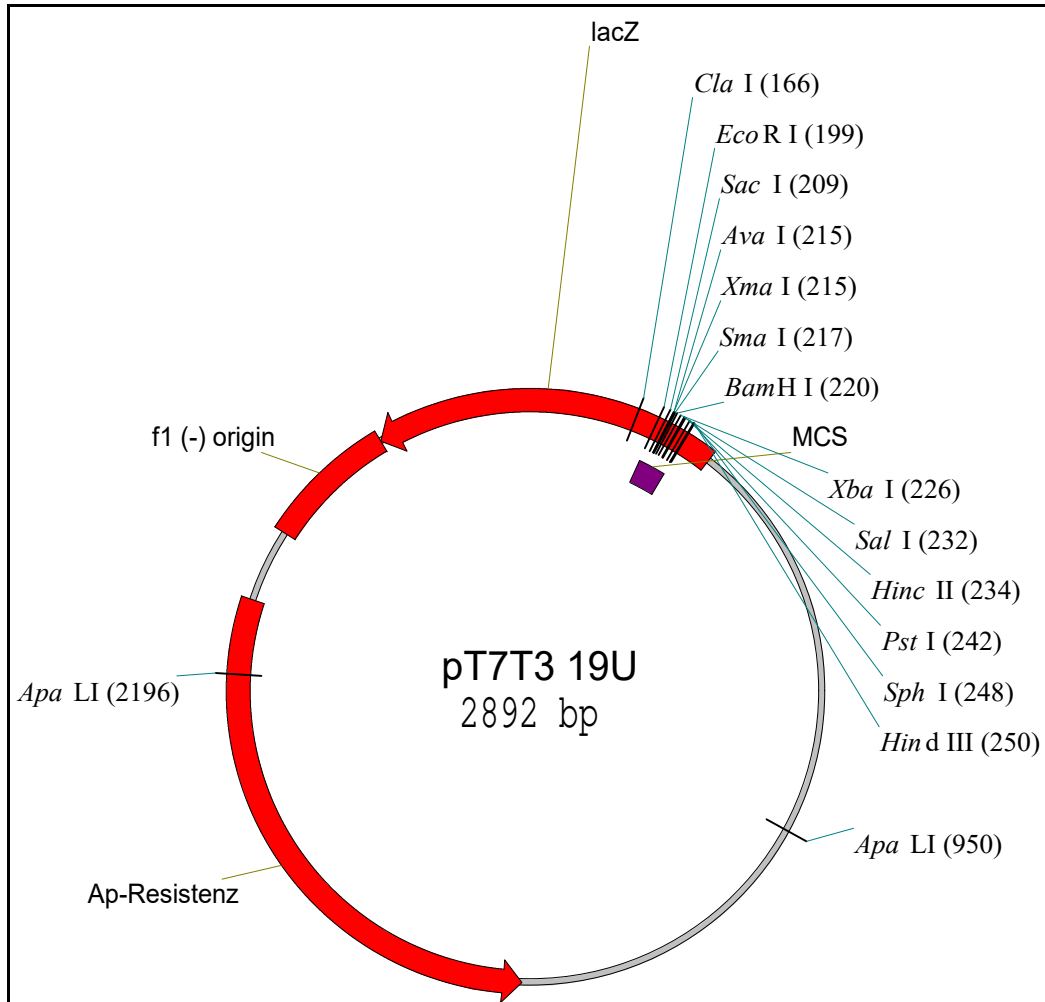
Alle Plasmide lagen als Plasmidlösungen in TE/10/0,1 (pH 8,0) oder als Klone in Form von Bakteriendauerkulturen (siehe) vor.

Klonierungsvektoren ausgestattet mit einem *E. coli* Replikationsursprung (ColE1):

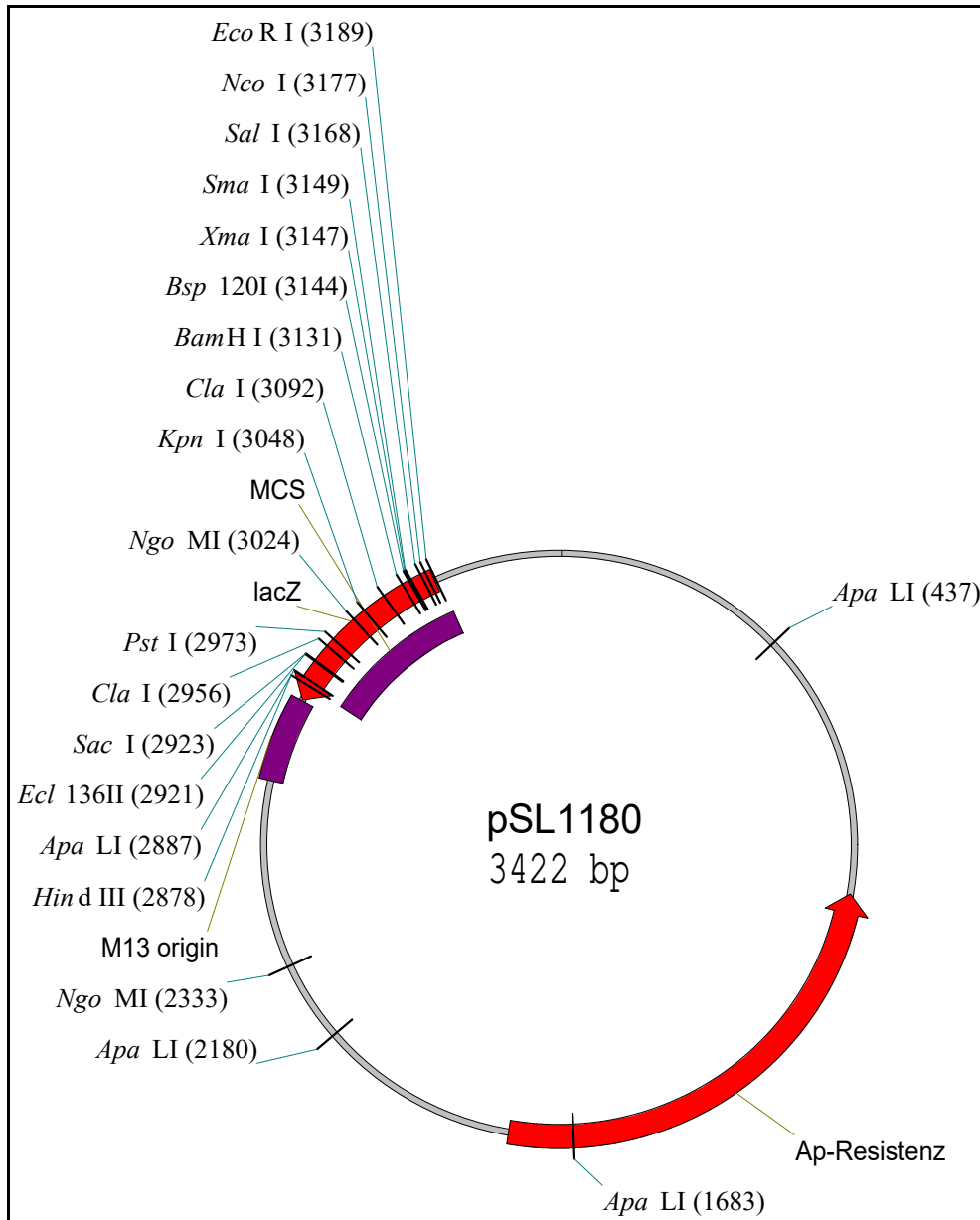
pGEM5ZFP (Promega)



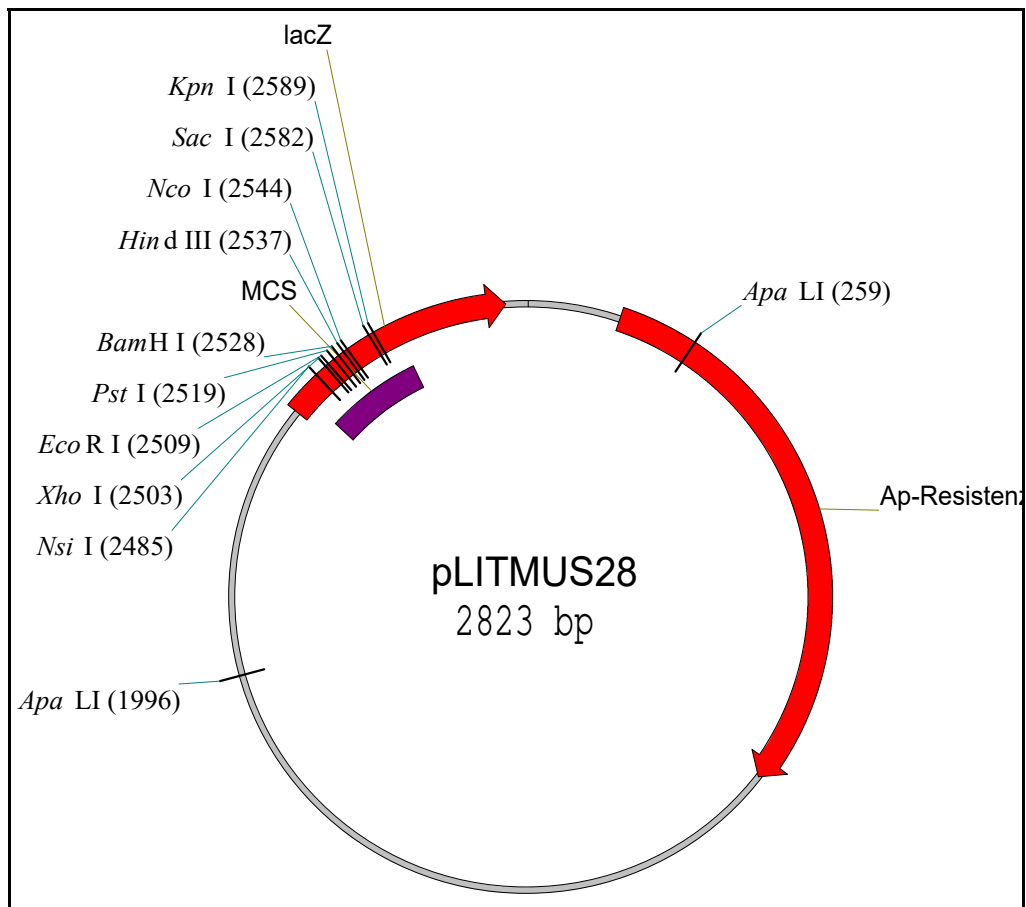
pT7T319U (Pharmacia)



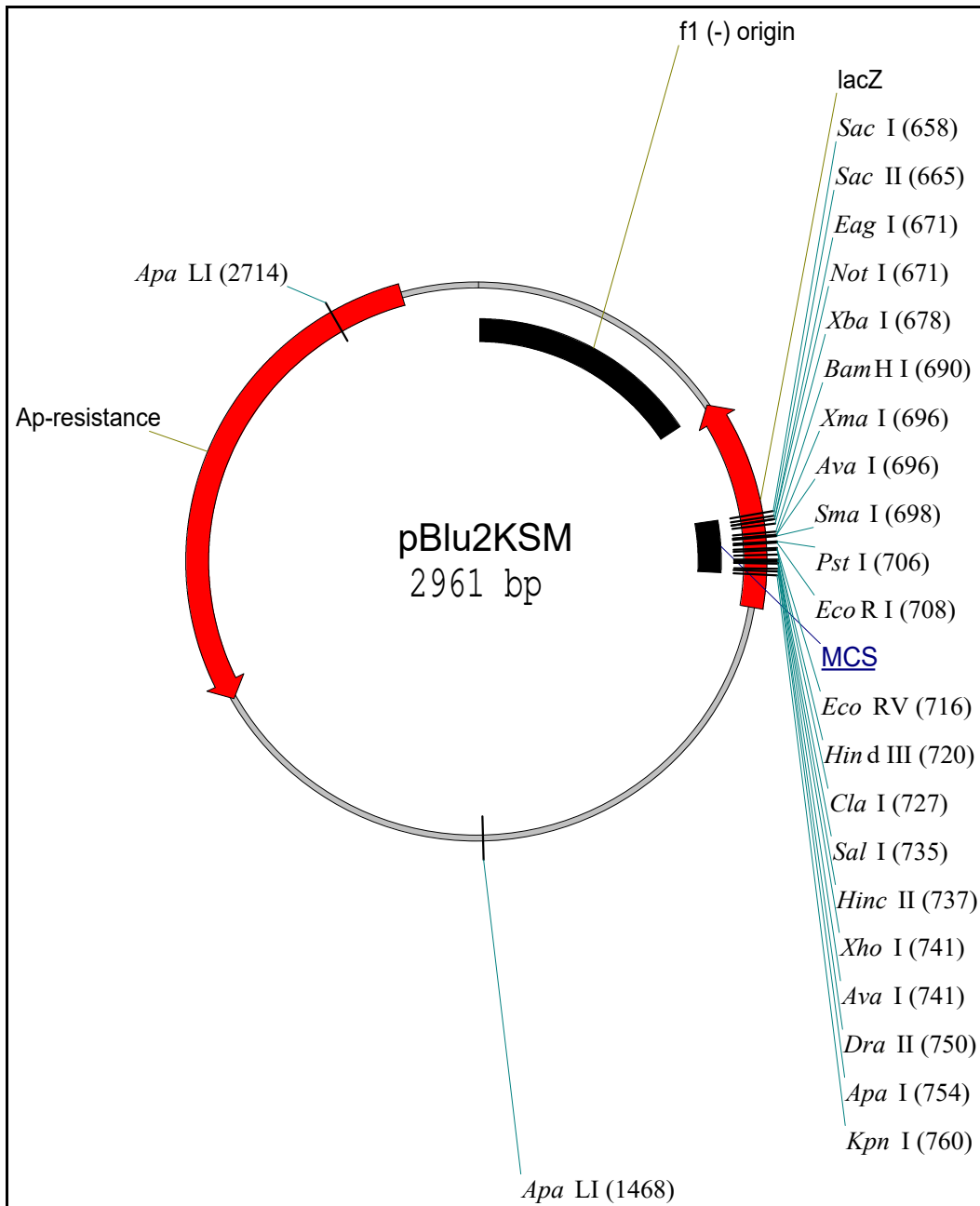
pSL1180 (Pharmacia)



pLITMUS28 (NEB)

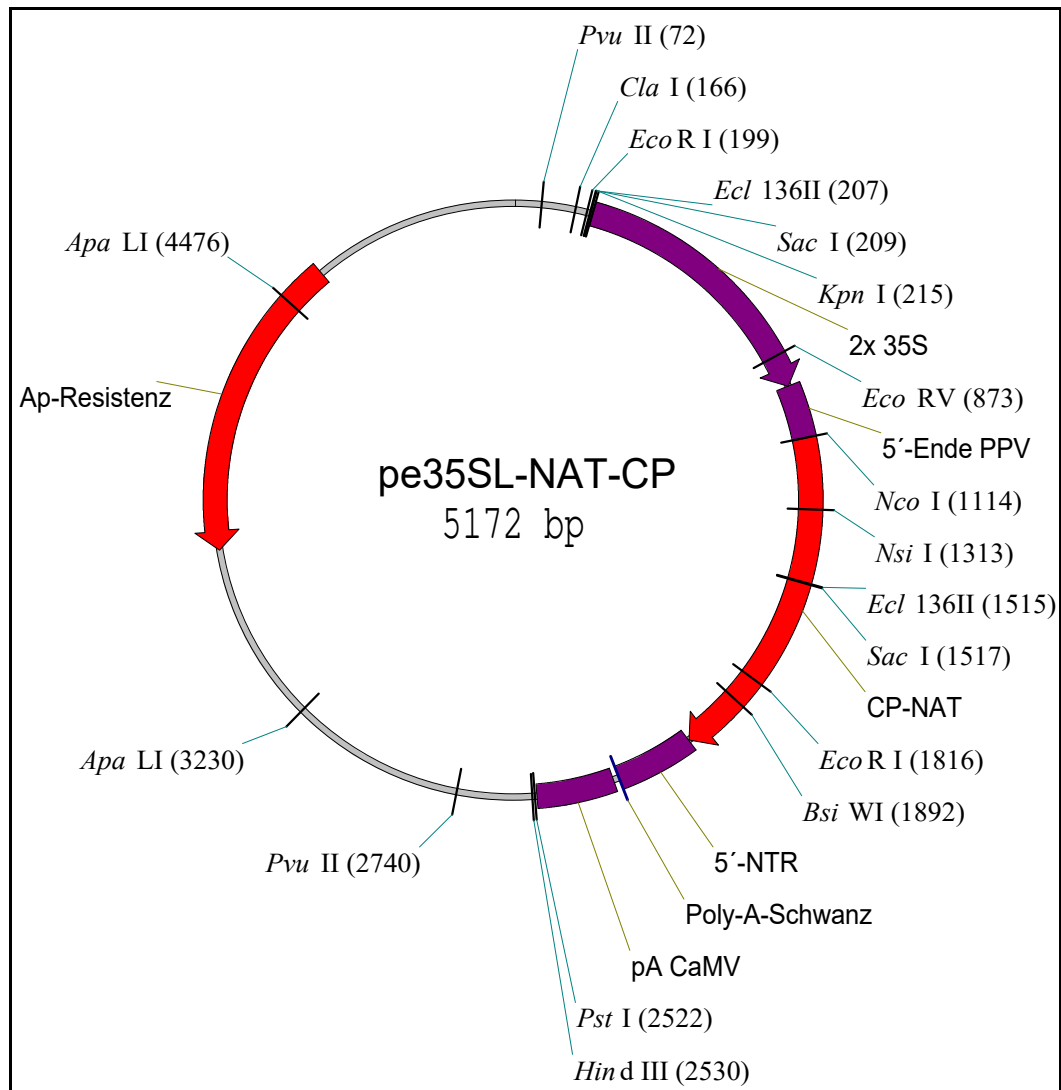


pBluescriptII SKM (pBIISKM, Stratagene) und pBCIISKM (Cam-statt Ap-Resistenz)

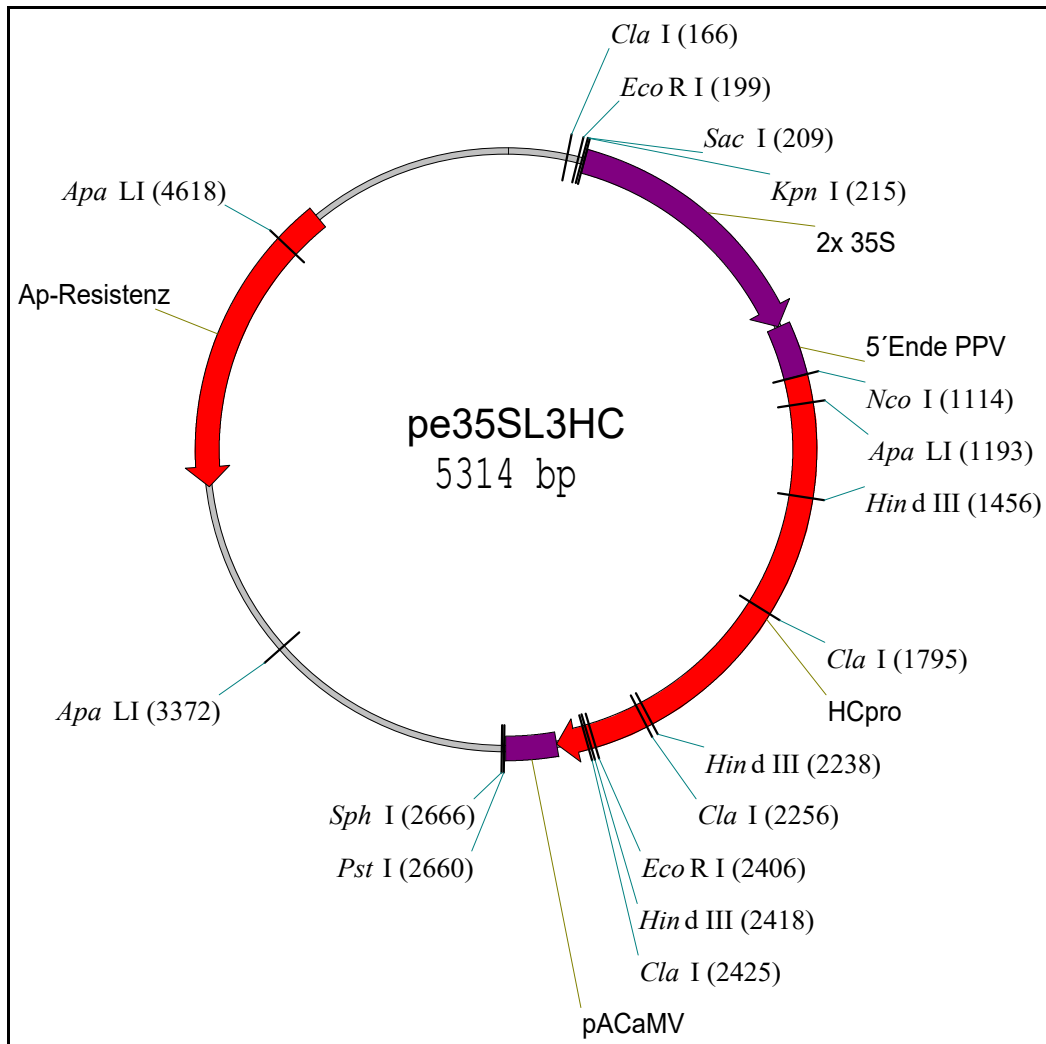


E. coli Klonierungsvektoren für die Herstellung von pflanzlichen Expressionskassetten:

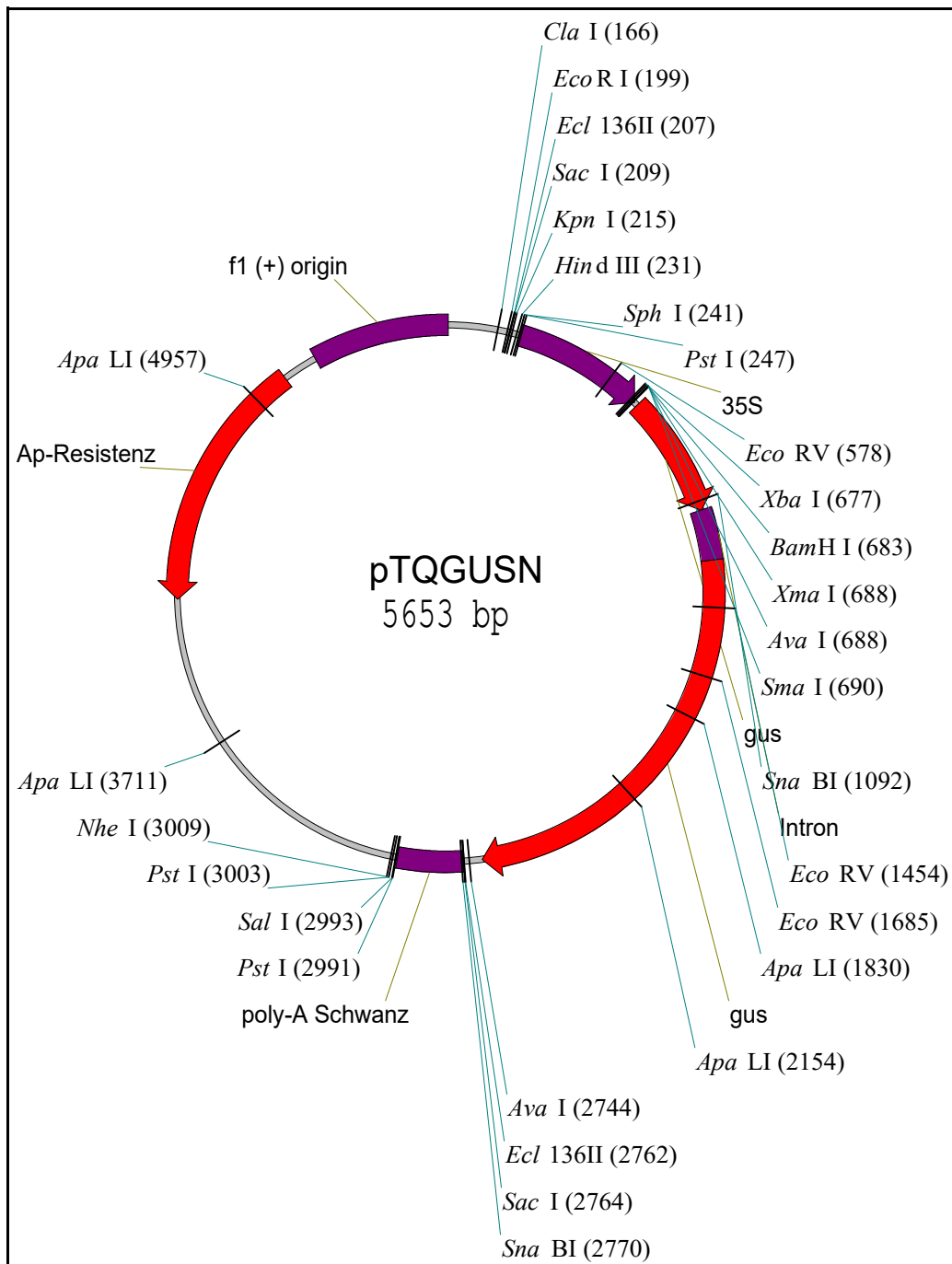
pe35SL-NAT-CP (Prof. Dr. E. Maiß)



pe35SL3HC (Prof. Dr. E. Maiß)

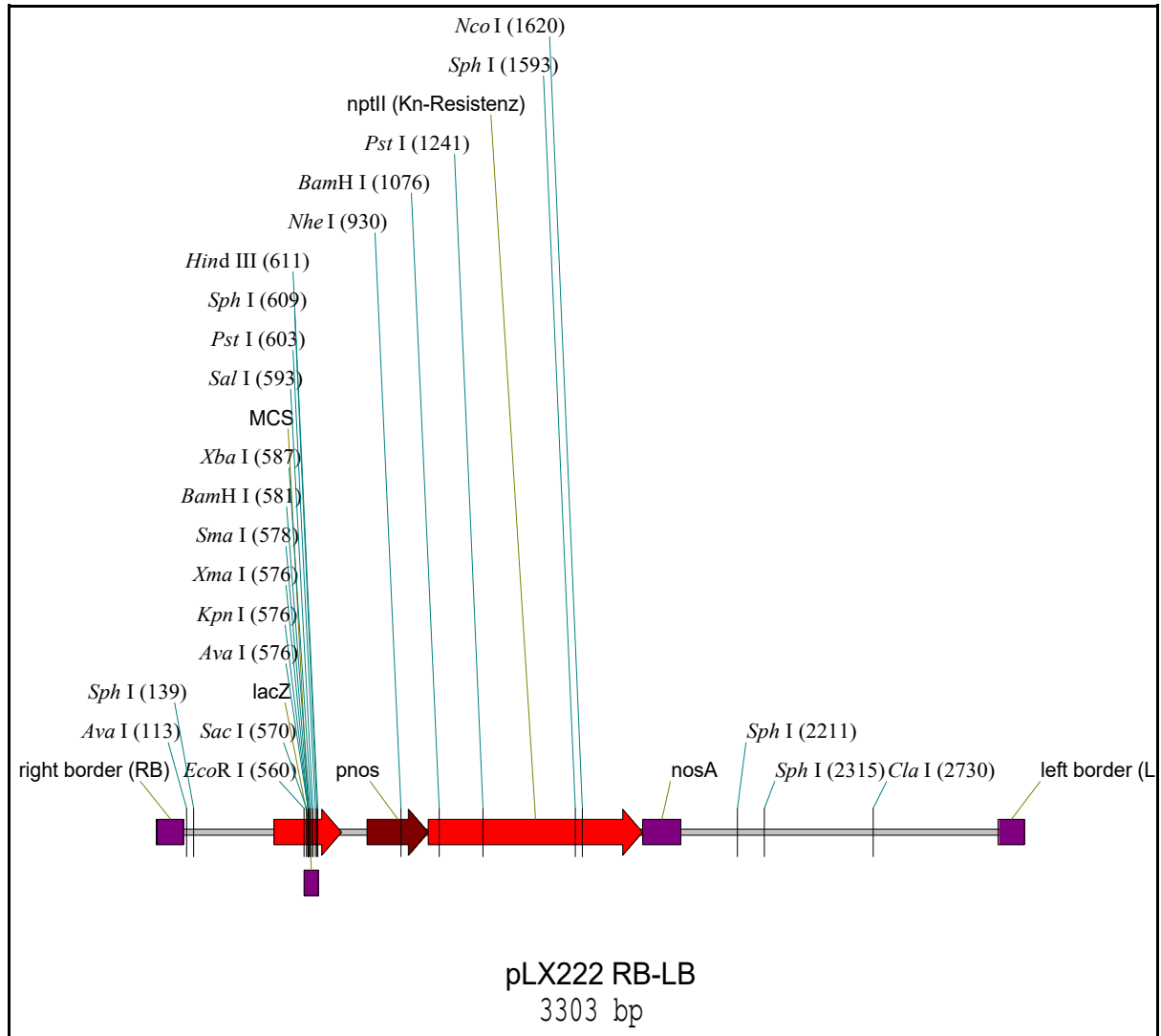


pTQGUSN (Prof. Dr. E. Maiß)



Binärer Vektor zur Replikation in *A. tumefaciens* und *E.coli*:

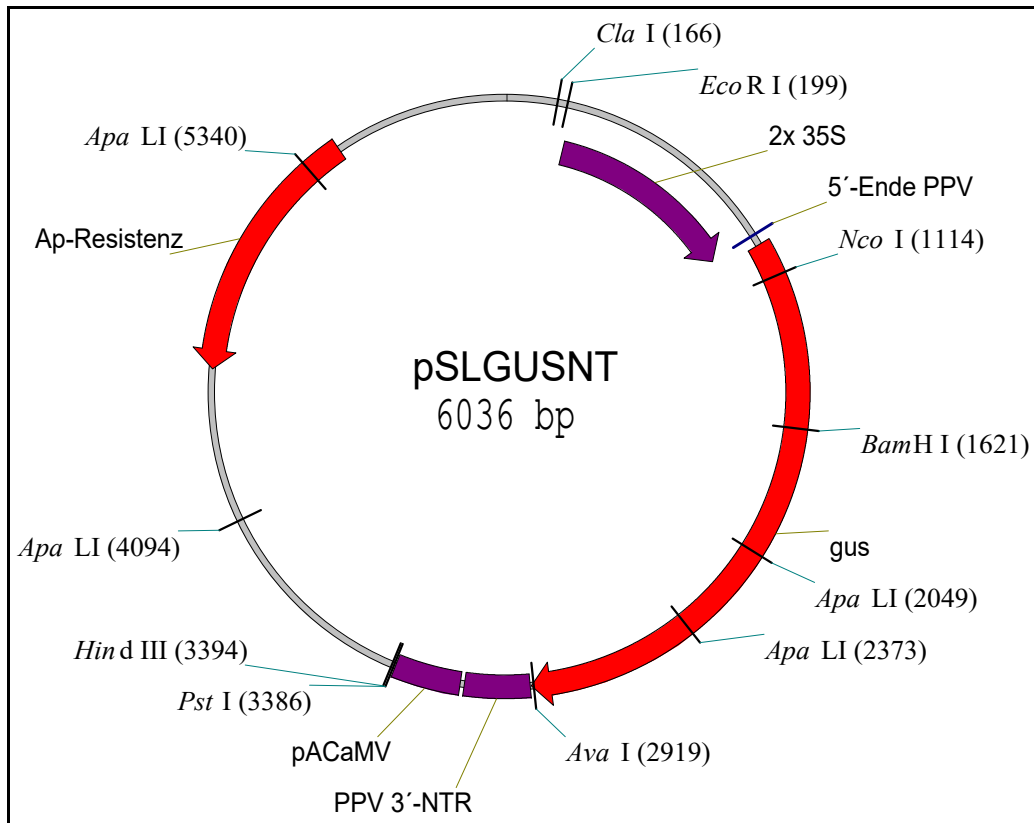
pLX222 (RB-LB), (Dr. Landsmann)



- Hier nur linearisiert zwischen Integrationsgrenzen (RB, LB) angegeben, da die vollständige Sequenz nicht bekannt ist. Nicht gezeigt sind Tc-Resistenzgen, ColEI und Replikationsursprung für *A. tumefaciens*

Vektor zur transienten *gus*-Expression in Pflanzen:

pSLGUSNT (Prof. Dr. E. Maiß)



8.3 Medien und Zusätze

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym
Agarose pure (Hybridisierung)	Gibco BRL (540-5510UB)
LM-Agarose (low melting)	Biozym
Select Yeast Extract	Gibco BRL
Select Agar	Gibco BRL
Select Peptone 140	Gibco BRL

LB (Lauria Bertoni)-Medium(modifiziert nach SAMBROOK et al. 1989):

- 15 g Agar
- 10 g Select Peptone 140
- 5 g Yeast Extract
- 10 g NaCl
- Mit A. dest. ad 1000 ml Lösung auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren und bei 4 °C lagern.

LB-AP Medium:

- 150 mg Ampicillin/ml H₂O
- Ampicillin zu 1000 ml ca. 50 °C warmen, autoklaviertem LB-Medium geben.

LB-Tc Medium:

- wie LB-AP nur mit 4 mg (*A. tumefaciens*) 25 mg (*E. coli*)/ml EtOH

LB-Str Medium:

- wie LB-AP nur mit 25 mg (*A. tumefaciens*)/ml EtOH

LB-Kn Medium:

- wie LB-AP nur mit 25 mg (*A. tumefaciens*) 50 mg (*E. coli*)/ml EtOH

LB-AIX Medium:

- 150 mg Ampicillin/ml H₂O
- 40 mg X-Gal/ml DMF (Dimethylformamid)
- 46 mg IPTG/ml H₂O
- Zugabe zu 1000 ml ca. 50 °C warmen autoklaviertem LB-Medium.

SOB Medium:

autoklavieren.

- 10 g Bacto Peptone 140
- 5 g Yeast Extract
- 0,584 NaCl (Endkonz. 10 mM)
- 0,186 g KCl (Endkonz. 2,5 mM)
- A. dest. ad 1000 ml pH 6,0-7,0

SOC Medium:

- 1 ml 2 M Glucose
- 1 ml 2 M MgCl₂
- Mit SOB-Medium auf 100 ml auffüllen.

8.4 Antibiotika

Produkt	Hersteller
Kanamycin	Serva
Ampicillin	Serva
Streptomycin	Serva
Tetracyclin	Serva
Claforan	Duchefa

8.5 Phytohormone

Produkt	Hersteller
IAA (Auxin)	Duchefa
BA (Cytokinin)	Duchefa

8.6 Chemikalien**8.6.1 Chemikalien fest**

Produkt	Hersteller
Amberlite	Serva
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumpersulfat	Serva
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	Merck
Cellite	Merck
D (+)-Glucose	Sigma
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
DTT (Dithiotreithol)	ICN-Biomedicals
EDTA (TitrplexIII)	Merck
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma
Harnstoff	Merck
HEPES	Roth
Kaliumacetat	Merck
Hexamincobalt(III)chlorid	Sigma

Produkt	Hersteller
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Lithiumchlorid	Roth
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Manganchlorid	Merck
MES (Morpholinethansulfonsäure)	Roth
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumchlorid	Merck/Roth
Natriumhydroxid	Merck
Natriumdiethyldithiocarbamat (NaDiECA)	Merck
p-Nitrophenylphosphat	Boehringer
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Rubidiumchlorid	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth
Uranylacetat	Merck

8.6.2 Chemikalien flüssig

Produkt	Hersteller
Acrylamidlösung	Appligene
Bind silane	Pharmacia Biotech
Chloroform	Merck
Diethanolamin	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dimethylformamid	Serva
Essigsäure 99,8 %	Roth
Ethanol 99 % abs.	Roth
Glycerin 99,5 %	Roth
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
2-Mercaptoethanol	Roth
Phenol	Roth
Repel Silane <small>(Dimethyldichlorsilane 2 % (w/v) in 1,1,1 Trichlorethan)</small>	Pharmacia Biotech
Polyethylen Glykol PEG 6.000	Merck
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	Serva
Tween 80 <small>(Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)</small>	Merck
Salzsäure rauchend 37 %	Roth

8.7 Geräte

Gerät	Hersteller / Typ
Sterilwerkbank	Heraeus Lamin Air HA2448GS
Drucker	Mitsubishi Video copy processor
Elektronenmikroskop (TEM)	EM 109 (Fa. Zeiss)
Elektroporator	Invitrogen
ELISA-Platten (96 Vertiefungen)	Fa. Greiner
Hybridisierungssofen	Fa. Biometra
Kamera	Intas
Kühlzentrifuge	B. Braun Biotech International, Sigma 4K10
Kühlzentrifuge	RC5B Sorvall
Lichtthermostat	Fa. RUMED (Rubarth Apparatebau)
Partikelkanone	PDS1000 Fa. Biorad
PCR-Thermocycler	MJ Research, Peltier Thermal Cycler
Photometer für ELISA-Platten	Dynatec, ELISA-Reader
Pipetten	Gilson Pipetman
Rotor RC5B	SS34 Festwinkel 30 ml Röhrchen
Rotor RC5B	SLA1500 Festwinkel 250 ml Becher
Schüttler mit Thermostat	B. Braun Biotech Certomat R und Certomat H
Sequenzelektrophoresekammer	Pharmacia
Spannungsquelle	Consort Microcomputer Electrophoresis Power Supply
Spannungsquelle	LKB Bromma 2297 Macrodrive 5 Constant Power Supply
Spektralphotometer	Perkin-Elmer UV/VIS
Thermoblock	Eppendorf, Thermostat 5320
Tischzentrifuge	B. Braun Biotech International, Sigma 113
Tischzentrifuge	Heraeus Sepatech, Biofuge 13
Ultraschallbad	Sonorex RK255S 100W/35kHz
UV-crosslinker (302 nm)	Eigenbau
UV-Tisch	Spectroline Transilluminator (312 nm)
Vakuumtrockner	Heto, Hetovac VR-1

Gerät	Hersteller / Typ
Vertikale Elektrophoresekammer	Hoefer Mighty Small II (Fa. Pharmacia)
Vortexer	IKA Minishaker MS1
Waage	Satorius
Wasserbad	Haake

8.8 Methoden

8.8.1 Plasmidpräparation aus *A. tumefaciens*

Lösung A (*E. coli* Plasmid-Minipräparation):

- Zugabe von 4 mg/ml Lysozym jeweils frisch.

Lösung B (*E. coli* Plasmid-Minipräparation) Phenol equilibriert:

- Roti-Phenol/TE 2-3 x mit gleichem Volumen Lösung B vorsichtig ausschütteln absetzen lassen und Überstand abnehmen, bei 4 °C aufbewahren.

NaOAc 3 M (pH 4,8)

NaOAc 0,3M (pH 7,0)

RNase-TE/10/0,1 (pH 8,0):

- siehe Lösung *E. coli* Plasmidminipräparation

8.8.2 Blattscheibentransformation

MS-Medium:

- fertiges Pulver 4,705 g/l (Duchefa)
- Zugabe von Saccharose 20 g/l
- pH 5,9 (KOH)
- Zugabe von Plant Agar 8 g/l bei Festmedienherstellung
- Autoklavieren 15' bei 1,2 bar und 121 °C
- Zugabe von entsprechenden Phytohormonen und Antibiotika nach dem Autoklavieren zu dem auf ca. 50 °C abgekühltem Medium.

MS-Medium:

- MS-Medium ohne Phytohormone

Auxin-Stock:

- 1 mg IAA/ml EtOH_{70%} bei 4 °C aufbewahren (100 µl/l bzw. 10 µl/l MS)

Cytokinin-Stock:

- 10 mg BAP/ml EtOH_{70%}, bei 4 °C aufbewahren (10 µl/l MS)

Claforan-Stock:

- 0,5 g/ml A. bidest, bei 4 °C aufbewahren (1 ml/l bzw. 0,5 ml/l MS)

Kn-Stock:

- 100 mg/ml EtOH_{70%}, bei 4 °C aufbewahren (1 ml/l MS)

T1-Medium:

- MS-Medium + 1 mg/l BAP, 100 µg/l IAA, 500 mg/l Claforan und 100 mg/l Kn.

T2-Medium:

- MS-Medium + 100 µg BA und 250 mg Claforan

8.8.3 β -Glucuronidase Selektion (*gus*-Test)

Farbstofflösung:

- 100 mM Na/KH₂PO₄ (pH 7,0)
- 10 mM EDTA
- 3 mM K₃[Fe(CN)₆]
- Autoklavieren, Lagerung bei 4 °C
- Zugabe von 0,05 % Tween-80
- Zugabe von 5 µl/ml DMF
- Zugabe von 0,52 mg/ml X-gluc, lösen

8.8.4 Präparation von DNA aus Pflanzenmaterial

Gesamt-DNA Präparationskit (ISO-Quick, Eurogentec):

8.8.5 Southern-Transfer von Pflanzen DNA zur Hybridisierung

Aufbau eines Standardkapillarblots von unten nach oben:

- Kunststoffärbeschale
- Glasplatte
- 3 Lagen Whatman 3M als Docht
- Gel
- Nylonmembran (positiv geladen)
- 20 Lagen Whatman 3M Gelgröße
- 5 cm dicke Filterpapierlagen
- Glasplatte mit ca. 500 g Gewicht (Glasflasche)

8.8.6 SondenherstellungDIG-11-dUTP markierte pBR328-DNA:

- Kontroll DNA ca. 1 ng/μl (Boehringer Mannheim)

DIG-11-dUPT:

- Alkali labil (Boehringer Mannheim)

PCR-Reaktionsansatz zur Sondenherstellung:

- 0,4 μl 25 mM dATP, dCTP, dGTP (je 1 μl 10 mM)
- 0,3 μl 25 mM dTTP (0,8 μl 10 mM)
- 2 μl 1 mM DIG-11-dUTP (ca. 100 pg)
- 1 μl T7-primer (10 μM)
- 1 μl T3-primer (10 μM)
- 5 μl 10x PCR-Puffer (MBI)
- 5 μl MgCl₂ (25 mM)
- 1 μl Taq-Polymerase (MBI 1U/μl)
- 1 μl (DNA-Minipräp. des Sondenklones) 1/100 verdünnt
- ad 50 μl mit A. bidest

PCR-Programm Sondenherstellung:

Nr.	Programmschritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95 °C	2 '
2	Denaturierung	95 °C	30 "
3	Anlagerung	56 °C	30 "
4	Synthese	72 °C	1 ' 30 "
5	Zykluszahl: 35 (Nr. 2-4)		
6	Synthese	72 °C	10 '

8.8.7 HybridisierungDenaturierungslösung:

- 1,5 M NaCl
- 0,5 N NaOH
- autoklaviert

20x SSC:

- 3 M NaCl
- 300 mM Natriumcitrat (pH 7,0)
- autoklaviert

Neutralisationslösung:

- 1 M Tris-HCl
- 3 M NaCl (pH 5,5)
- autoklaviert

DIG-Easy-Hybridisierungslösung:

- Pulver oder fertige Lösung (Boehringer Mannheim)
- bis zu 8x wiederverwendbar (Lagerung bei 4 °C oder mit Sonde -20 °C)

8.8.8 Sondennachweis (Chemoluminescent detection)

Maleinsäurepuffer:

- 0,1 M Maleinsäure
- 0,15 M NaCl
- 0,3 % Tween-80
- mit NaOH Plätzchen auf pH 7,5 einstellen

“blocking”-Lösung:

- fertiges Pulver (Boehringer Mannheim)
- 10 % w/v in Maleinsäurepuffer 1h bei 65 °C rühren
- autoklavieren und bei 4 °C lagern

“detection”-Puffer:

- 100 mM Tris-HCl
- 100 mM NaCl, (pH 9,5)

CDP-Star:

- fertiges Reagenz (Boehringer Mannheim)
- 1/100 in “detection”-Puffer (sofort benutzen)

NBT-Lösung:

- Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
- 50 mg/ml StammLösung (Promega)

BCIP-Lösung:

- 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
- 50 mg/ml (Promega)

Röntgenfilm:

- Agfa-Curix

8.8.9 Gesamt-RNA Extraktion

RNA-Extraktionspuffer:

- 0,1 M LiCl
- 100 mM Tris
- 10 mM EDTA (Tritriplex)
- 1 % SDS
- einstellen auf pH 8,0 und autoklavieren

RNase freies Wasser:

- 2 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat)
- A. bideest. ad. 1000 ml
- Ü.N. rühren und autoklavieren.

LiCl-Lösung (4 M)

8.8.10 Gesamtnukleinsäure Präparation [“total nucleic acid” (TNA)]

TNA-Extraktions Puffer:

- 50 mM Tris-HCl (pH 7,6)
- 100 mM NaCl
- 1mM EDTA
- 0,5 % SDS
- 0,3 % 2-Mercaptoethanol

8.8.11 Phenol-Chloroform Extraktion

TE/Phenol (Roti-Phenol der Fa. Roth):

- redestilliert und äquilibriert mit 10 mM Tris und 1 mM EDTA

8 ANHANG

8.8.12 Primer

Name	Zweck (s): sense (as): antisense	Sequenz (5'-3')	Restriktionsschnittstelle
T3	Sequenzierung	5'-ATT AAC CCT CAC TAA AG-3'	-
T7	Sequenzierung	5'-AAT ACG ACT CAC TAT AG-3'	-
SP6	Sequenzierung	5'-GTA TTC TAT AGT GTC ACC TAA AT-3'	-
CP-MUT-N	N-Terminusverk. (s)	5'-AGA GAC AGG GAT GTC <u>GCC ATG GGA</u> TCA ACT GGA ACT TTT A-3'	<i>NcoI</i>
CP-PCRI	CD-RQ Mutation (as)	5'-AGT <u>TCT GCA GAT GAC GTC</u> AAA AGT GGG TTT CGC ATG A-3'	<i>AatII, PstI</i>
CP-MUT1	CP-RQ Mutation (s)	5'-ATG CGA AAC CCA CTT <u>TTG ACG TCA</u> TTA TGG CAC ATT TCA G-3'	<i>AatII</i>
CP-PCRII	CP-D Mutation (as)	5'-AAG <u>TCT GCA GGT AGA TCT</u> TAA AGG CAT ATC TGG CGA GG-3'	<i>BglII, PstI</i>
CP-MUT2	CP-D Mutation (s)	5'-GCC AGA TAT GCC TTT <u>AAG ATC TAC</u> GAA ATG ACT TCA-3'	<i>BglII</i>
HC-PCR1	HC-KITC Mutation (as)	5'-TTG <u>CCT GCA GGT GAA TTC</u> TCC GCA AGG GAT TAT CGC-3'	<i>EcoRI, PstI</i>
HC-MUT1	HC-KITC Mutation (s)	5'-ATA ATC CCT TGC GGA <u>GAA TTC</u> ACG TGT CTG CAA TGT-3'	<i>EcoRI</i>
HC-PCR2	HC-PTK Mutation (as)	5'-CTA <u>ACT GCA GCT CCG CGG</u> GAC TTA TTA TTT CAG ACT-3'	<i>SacII, PstI</i>
HC-MUT2	HC-PTK Mutation (s)	5'-TGA AAT AAT AAG <u>TCC CGC GGA</u> GAA TCA TTT AGT TG-3'	<i>SacII</i>
PVX-UP	Nachweis Rek. (s)	5'-GCT GCC GTT TTG CTA CTG-3'	-
PVX-LOW	Nachweis Rek. (as)	5'-TGT GGG CAC CTT CAT GTC-3'	-
Uni-Poty	Klon.Potyvirus-CP (s)	5'- <u>GGA ATT CCC GCG GAA</u> AAG CCC CGT ACA TTG C	<i>EcoRI, KspI</i>

8 ANHANG

Name	Zweck (s): sense (as): antisense	Sequenz (5'-3')	Restriktionsschnittstelle
Uni-Poly-T	Klon. Potyvirus-CP (as)	5'-CGG <u>GGA TCC TCG AGA AGC TTT</u> TTT TTT TTT TTT TT-3'	<i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I, <i>Hind</i> III
ZYMV-1	CP-core-Bereich (as)	5'- <u>CGG ATC CGT ACG</u> GGA GTT TTA GAA TTG ACT-3'	<i>Spl</i> I, <i>Bam</i> HI
ZYMV-2	CP-core-Bereich (s)	5'-ACA <u>CGA GCT CCT</u> CAT CAG CAG TTC GCC TC-3'	<i>Sac</i> I
PVY-up	CP-core-Bereich (s)	5'- <u>AGA GCT CCT</u> CAA TCA CAG TTT G-3'	<i>Sac</i> I
PVY-low	CP-core-Bereich (as)	5'- <u>CCG TAC GGG</u> TGT TCG TGA TG-3'	<i>Spl</i> I
TVMV-up	CP-core-Bereich (s)	5'- <u>AGA GCT CCA</u> CAC TCT CAG TTT A-3'	<i>Sac</i> I
TVMV-low	CP-core-Bereich (as)	5'- <u>CCG TAC GGG</u> TGT TGC CCC ATT A-3'	<i>Spl</i> I
BrSMV-up	CP-core-Bereich (s)	5'- <u>AGA GCT CCA</u> ACA CAG CAA GAG C-3'	<i>Sac</i> I
BrSMV-low	CP-core-Bereich (as)	5'- <u>CCG TAC GGG</u> CGT GGC TGT GTC-3'	<i>Spl</i> I
PPV-REK	CP-core PPV (as)	5'-AAA AGC TTG TGT CGT TGA AGT CAT TTC G-3'	-

8.8.13 Proteinase K VerdauProteinase K-Puffer:

- 0,2 M Tris-HCl (pH 7,0)
- 0,025 M EDTA
- 0,3 M NaCl
- 2 % SDS

Beschichtungspuffer:

- 2,93 g/l NaHCO₃
- 1,59 g/l Na₂CO₃
- einstellen auf pH 9,6

8.8.14 ReverseTranskriptase/PCR (RT/PCR)RT/PCR Reaktionsmix:

- RNA-Template
- 1 µl Upper-primer (10 µM)
- 1 µl Lower Primer (10 µM)
- 0,5 µl *Taq*-Polymerase (1U/µl)
- 5 µl 10x *Taq*-Puffer
- 5 µl MgCl₂-Lösung (25 mM)
- 0,05 µl AMV-RT (10 U/µl)
- 0,5 µl dNTP-Lösung (25 mM)
- ad. 50 µl A. bidest

10x *Taq*-Puffer:

- 100 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 25 °C
- 500 mM NaCl
- 0,8 % Nonidet P40

MgCl₂-Lösung:

- 25 mM MgCl₂

dNTP-Lösung:

- 25 mM je (dGTP, dATP, dTTP und dCTP) (Boehringer/Mannheim)

RT-PCR-Programm (RNA-RT):

Nr.	Programmschritt	Temperatur	Zeit
1	cDNA-Synthese	42 °C	45 ‘
2	Denaturierung	95 °C	4 ‘ 30 “
3	Denaturierung	95 °C	30 “
4	Anlagerung	37 °C	30 “
5	Synthese	72 °C	2 ‘
6	Zykluszahl: 3 (Nr. 3-5)		
7	Denaturierung	95 °C	30 “
8	Anlagerung	55 °C	30 “
9	Synthese	72 °C	1 ‘ 30 “
10	Zykluszahl: 32 (Nr. 7-9)		
11	Synthese	72 °C	5 ‘

8.8.14 Immunocapture-RT/PCR (IC-RT/PCR)PBS-Tween (Waschpuffer):

- 8,0 g/l NaCl
- 0,2 g/l KH_2PO_4
- 0,2 g/l KCl
- 1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,5 g/l Tween-80 (0,05 %)

PBS-TP (Probenpuffer):

- 2 % Polyvinylpyrrolidon
- 0,05 % Tween-80
- 1x PBS

8.8.15 PCR-MutagenesePCR-Mutagenese Reaktionsmix:

- 2 μl Plasmidminipräp. 1/100
- 1 μl Upper-Primer (10 μM)
- 1 μl Lower Primer (10 μM)
- 0,5 μl *Taq*-Polymerase (1U/ μl)
- 5 μl 10x *Taq*-Puffer
- 5 μl MgCl_2 -Lösung (25 mM)
- 0,5 μl dNTP-Lösung (25 mM)
- ad. 50 μl A. bidest.

PCR-Mutagenese-Programm:

Nr.	Programmschritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95 °C	4 ' 30 "
2	Denaturierung	95 °C	30 "
3	Anlagerung	55 °C	30 "
4	Synthese	72 °C	1 ' 30 "
5	Zykluszahl: 30 (Nr. 2-4)		
6	Synthese	72 °C	10 '

8.8.16 Präzipitation von Nukleinsäuren (Natriumacetat/Ethanol-fällung)3 M Natriumacetat-LösungTE 10/0,1:

- 10 mM Tris
- 0,1 mM EDTA
- einstellen auf pH 8,0 und autoklavieren

8.8.17 Agarose Gelelektrophorese analytisch und präparativGelbeladungspuffer (Glycerin-Stopplösung):

- 3,44 ml Glycerin_{100%}
- 6,54 ml A. bidest.
- Spatelspitze Bromphenolblau

50 x TAE-Elektrophorese-Puffer:

- 242 g Tris-base
- 57,1 ml Eisessig
- 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
- A. dest. ad. 1000 ml.

ë-Pstl-Marker:

- 140 µl ë-DNA (0,4 mg/ml)
- 8 µl *Pstl* (10U/µl)
- 30 µl 10x Restriktionspuffer (MBI rot)
- A. bidest. ad. 300 µl.
- Inkub. 3 h bei 37 °C und 10' bei 70 °C
- Zugabe von 100 µl Glycerin
-Stopplösung

Ethidiumbromid-Lösung:

- 7,5 mg/ml A. bidest.

Fragmentlängen der *Pstl* verdauten ë-DNA:

Fragment Nr.			Größe in Bp		
1	11	21	11501	805	164
2	12	22	5080	516	150
3	13	23	4505	467	94
4	14	24	2840	448	87
5	15	25	2454	339	72
6	16		2139	264	
7	17		1986	247	
8	18		1700	216	
9	19		1159	211	
10	20		1093	200	

8.8.18 Präparation von Nukleinsäuren aus Agarosegelen (QIAex)QIAexII Gel Extraction Kit (QIAgen):

- QX1-Puffer
- Glasmilch
- PE-Puffer

8.8.19 Säulenreinigung von PCR-Produkten (QIAquick)PB1-Puffer:

- (Fa. QIAgen)

Eluierungspuffer:

- TE 10/0,1 (pH 8,0)

PE-Waschpuffer:

- (Fa. QIAgen)

QIAquickspin-Säulen:

- (Fa. QIAgen)

8.8.20 CIP-Behandlung von Vektoren (Dephosphorylierung)10x CIP-Puffer:

- 0,5 M Tris-HCl
- 1 mM EDTA
- (pH 8,0)

Alkalische Phosphatase (AP) (Boehringer/Mannheim):

- Konzentration 1U/µl

8.8.21 Ligation von Klonierungsvektor und DNA-Fragment

10 x Ligationspuffer:

- 400 mM Tris-HCl
- 100 mM MgCl₂
- 100 mM DTT
- 5 mM ATP
- (pH 7,8)

8.8.22 Transformation von *Escherichia coli* (NM522, JM109) Herstellung kompetenter Zellen

2 M Mg²⁺-Lösung:

- 1 M MgCl₂ x 6 H₂O
- 1 M MgSO₄ x 7 H₂O

DND (10 ml):

- 1,53 g DTT (Dithiothreitol)
- 9 ml DMSO (Dimethylsulfoxid)
- 100 µl 1 M KAc (pH 7,5)

TFB- Transformationspuffer:

- 10 mM K-MES pH 6,2 (1 M MES mit 10 M KOH auf pH 6,3 einstellen)
- 100 mM RbCl
- 45 mM MnCl₂ x H₂O
- 10 mM CaCl x 2H₂O
- 3 mM HAcCoCl₃ (Hexaminkobaltchlorid)

8.8.23 Transformation von *Escherichia coli* (NM522)

Glucose Lösung:

- 2 M Glucose
- 15' autoklavieren

SOC Medium:

- 1 ml 2 M Glucose
- 1 ml 2 M MgCl₂
- SOB ad. 100 ml, sofort benutzen

8.8.24 Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA

Lösung A:

- 15 mM Tris HCl, (pH 8,0)
- 10 mM EDTA
- 50 mM Glucose

Lösung D:

- 0,1 M NaAc, (pH 7,0)
- 0,05 M Tris HCl, (pH 8,0)

Lösung B:

- 0,2 M NaOH
- 1 % SDS

RNase- Lösung:

- 10 µg RNase/ml TE 10/0,1 (pH 8,0)

Lösung C:

- 3 M NAc, (pH 4,8)

8.8.25 Plasmidpräparation und ReinigungPuffer P1:

- 50 mM Tris/HCl, (pH 8,0)
- 10 mM EDTA
- RNase A (100 µg/ml)

Puffer P2:

- 200 mM NaOH
- 1 % SDS

Puffer QF:

- 1,25 M NaCl
- 50 mM MOPS
- 15 % EtOH
- (pH 8,2)

Puffer QBT:

- 750 mM NaCl
- 50 mM MOPS
- 15 % EtOH
- 0,15 % Triton X-100
- (pH 7,0)

Puffer QC:

- 1,0 M NaCl
- 50 mM MOPS
- 15 % EtOH
- (pH 7,0)

Puffer P3:

- 2,55 M KOAc, (pH 4,8)

8.8.26 Herstellung von einzelsträngiger DNA (ss DNA)TES:

- 20 mM Tris, pH 7,5
- 10 mM NaCl
- 0,1 mM EDTA
-

TE 10/1:

- 10 mM Tris, pH 7,5
- 0,1 mM EDTA

PEG/NaCl:

- 20 % PEG-6000 (Polyethylenglykol)
- 1,7 M NaCl

8.8.27 Sequenzierung von ss DNA nach dem KettenabbruchverfahrenNucleotidlabelling-Mix dATP (Fa. Pharmacia):

- 1,375 µM dCTP, dGTP, dTTP
- 333,5 mM NaCl

Sequenzierungskit T7:

- (Fa. Pharmacia)

“chain-termination bases”:

- 840 µM der jeweils fehlenden ungelabelten dNTP
- 40 mM Tris-HCl, (pH 7,6)
- 50 mM NaCl

Annealing-Puffer:

- 1 M Tris-HCl, (pH 7,6)
- 100 mM MgCl₂
- 160 mM DTT

10 x TBE:

- 108 g Tris-base
- 55 g Borsäure
- 40 ml 0,5 M EDTA, (pH 8,0)
- A. dest. ad. 1000 ml

APS-Lösung (10 %):

- 0,1 g Ammoniumpersulfat/ml H₂O

Stopplösung "gel loading buffer":

- 0,3 % Bromphenolblau
- 0,3 % Xylencyanol FF
- 10 mM EDTA, (pH 7,5)
- 97,5 % deionisiertes Formamid

Acrylamidstammlösung (40 %):

- 380 g Acrylamidlösung
- 20 g N,N'-Methylenbisacrylamid

8.8.28 Konstruktion einer Partikelkanone

Bauteil	Hersteller
Magnetventil	Bürkert, Nr. 121297M
Spritzenfilter	Gelman Sciences Produkt Nr. 4317
Timer	Fa. Zander Aachen, Modell Nr. 445020, 0,1 s-10'. Ser. No. F100837
Vakuumkammer	Nalgene

8.8.29 Präparation von Plasmid DNA zum PartikelbombardmentWolframpartikel (M17 Particles , BioRad):Spermidin (0,1 M)(freie Base Fa. Sigma)CaCl₂ (2,5 M)Ca(NO₃)₂ (1,25 M):

- einstellen auf pH 8,0

8.8.30 Immunglobulinreinigung aus AntiserumBinding-Puffer:

- 10 mM Tris (pH 7,5)

Tris-Puffer:

- 1 M (pH 7,5)

Elution-Puffer:

- 0,1 M Glycin (pH 2,6)

PBS 1x:

- (siehe 8.8.32) + 1 Spatelspitze Na-Azid/l

8.8.31 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)PBS (1x) (phosphate buffered saline):

- 8,0 g/l NaCl
- 0,2 g/l KH₂PO₄
- 0,2 g/l KCl
- 1,44 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O
- 0,2 g/l NaN₃

PBS-TPO:

- PBS-T
- 2 % Polyvinylpyrrolidon
- 0,2 % Ovalbumin

Waschpuffer PBS-T:

- PBS + 0,05 % Tween-80

Substratlösung:

- 10 % Diethanolamin (pH 9,8)
- p-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml)

PBS-NaDiECA:

- 1x PBS + 0,01M NaDiECA
(Natriumdiethyldithiocarbamat)

8.8.32 Gesamtproteinextraktion aus PflanzenmaterialProbenpuffer:

- 750 mM Tris-HCl (pH 8,8)
- 4 % (w/v) SDS
- 4 % (w/v) 2-Mercaptoethanol
- 40 % (w/v) Saccharose

8.8.33 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese zur Trennung von ProteinenAcrylamidstammlösung:

- 30,0 % Acrylamid
- 2,7 % Bisacrylamid
- 10 % Saccharose
- 1 h mit 1 g Amberlite (Sigma) rühren und filtrieren
- Lagerung bei 4 EC

4x Trenngelbuffer (TGP):

- 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
- 0,4 % SDS

4x Sammelpuffer (SGP):

- 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
- 0,4 % SDS

2x Elektrophoresebuffer:

- 0,05 M Tris-HCl (pH 8,3)
- 0,384 M Glycin
- 0,2 % SDS

TEMED:

- N,N,N',N'-tetra-methylethylendiamin

8.8.34 Proteinfärbung in PAA-Gelen mit CoomassieFärbelösung:

- 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant blue R250
- 50 % (v/v) A. bidest
- 40 % (v/v) Eisessig
- 10 % (v/v) Methanol
- unter Rühren auf 60 EC erhitzen, abkühlen lassen und filtrieren.

Entfärbelösung:

- 25 % (v/v) Methanol
- 7,5 % (v/v) Eisessig
- 67,5 % (v/v) A. bidest

8.8.35 Proteinmolekulargewichtsmarker

Mid-Range (Fa. Promega):

- 97,4; 66,0; 55,0; 42,7; 40,0; 31,0; 21,5; 14,3 kDa

8.8.36 Proteinelektroblot (Westernblot)“blotting”-Puffer:

- 25 mM Tris-HCl, (pH 8,0)
- 192 mM Glycin
- 20 % (v/v) Methanol

Pyronin:

- 2 % (w/v) Pyronin
- 1 % (w/v) SDS
- 10 % Glycerin

8.8.37 Immunfärbung von Proteinen (Immunoassay)Tris-Buffer-Saline (1x TBS):

- 20 mM Tris-HCl, (pH 7,4)
- 500 mM NaCl

TTBS:

- 0,05 % (v/v) Tween-80 in 1x TBS

TTBS 2 %:

- 2 % (v/v) Tween-80 in 1x TBS

Naphtol AS-MX Phosphat (Fa. Sigma):

- 6 mg/15 ml A. bidest

Fast-Red (Fa. Sigma):

- 90 mg in 15 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,0),
2 mM MgCl₂

“detection”-Puffer:

- 100 mM Tris-HCl (pH 9,5)
- 100 mM NaCl

NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid):

- 50 mg/ml 100 % DMF oder fertige Lösung (Promega)

BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat):

- 50 mg/ml 70 % DMF oder fertige Lösung (Promega)

8.8.38 ElektronenmikroskopiePhosphatpuffer (0,1M):

- 38,8 ml Stock 0,5 M KH₂PO₄
- 61,2 ml Stock 0,5 M Na₂HPO₄
- Verdünnung 1/5, (pH 7,0),
autoklavieren

Uranylacetat (1 %):

- 1 % in A. bidest

8.8.39 Herstellung von ObjektträgernPioloform (Plano):

- 1,5 % in Chloroform
- Erst 24 h nach dem Ansetzen verwenden.

8.8.40 Alignment der CP-Kernbereiche von PPV, ZYMV, PVY, TVMV und BrSMV

ClustalX-alignment der Aminosäuresequenzen der CP-Kernbereiche (":": ähnliche As, ".": konserviert, "*" : perfekt konserviert)

- a. PPV
- b. PVY
- c. ZYMV
- d. TVMV
- e. BrSMV

```
a. -QSCFQTWYEGVKRDYDVTDD-MSIILNGLMVWC-ENGTSPNIN--GMWVMM-----G
b. -QSQFDTWYEAVQLAYDIGETE-MPTVMNGLMVWCIENGTSPNIN--GVWVMM-----G
c. -HQQFASWFNQVKTEYDLNEQQ-MGVVMNGFMVWCIENGTSSDIN--GVWVMM-----G
d. -HSQFKAWHTNVMAELELNEEQ-MKIVLNGFMIWCIENGTSPNIS--GVWTMM-----G
e. -TQQELNDWIKASADGLGQTEEFIDNILPGWIVHCIVNTTSSENRKAGSWRCVTNAGTAD
  :. : * : : : : * : : * * * : : * * :
```

```
a. ETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKRNYE-KAYMPRYGIQRNLTDYSLA
b. DEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDAEAYIEMRNKK-EPYMPRYGLVRNLRDGSLSA
c. NEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNAE-APYMPRYGLLRNLRDRSLA
d. DEQVEYPIEPMVKHANPSLRQIMKHF'SNLAEAYIRMRNSE-QVYIPRYGLQRGLVDRNLSA
e. EEQVLYDIEPMYSAANPTMRAIMRHF'SDLARLVIAESFKQGRPLIPKGYIKAGVLDASSA
  : ** * : : : . * : : : * * * : * . * : : * : : * . *
```

```
a. RYAFDFYEMTSTTPV-
b. RYAFDFYEVTSRT---
c. RYAFDFYEVNSKT---
d. PFAFDFFEVNGAT---
e. AAACDFVARDRHDAT
  * **
```

8.8.41 Alignment von CP-NAT, CP-SoC, und sequenziertem Bereich der CP-SoC Rekombinante

1. ClustalX-alignment der Nukleotidsequenzen (*: perfekt konserviert, □: möglicher Bereich der Rekombination, ⊃: Nukleotidaustausch in der rekombinanten Sequenz)

- a. CP-RQ-D

- b. CP-SoC

- c. CP-SoC-Rekombinante

```
a. -----GCTGACGAA
b. GCCAAGGAGGGAAATGATGACGACGTAAGTCTAGTGGATGCAGGCAAGTCAACTGTCACC
c. -----
```

```
a. AGAGAAG-----ACGA--GGAGGAAGTTGATGCACTTCAACCACCTCCAGTCATACAGCC
b. ACAGCAGCTTCCACGCCTGCAGTAACAAGCT-CACAATTTCCACCTCCAC-CATTC--CC
c. -----
```

```
a. TGCACCCCGGACTACGGCGCCAATGCTCAACCCCATTTTCACGCCAGCAACAACCTCAACC
b. AAATCTGCAGAGCGCGCACCAATGTTTGTATCCCATATTTCACTCCAGCAACAACCCAGCC
c. -----
```

```
a. AGCAACAAAACAGTTTTCACAGGTGTCAGGACCTCAACTGCAAATTTTGGAACATATAG
b. AAATGTGAGACCGATTGCACCAGTAGTGACAAGTCCATTCT---CGTATGGGGTAATTGG
c. -----
```

```
a. TCATGAGGATGCATCACCTAGCAACTCAAACGCGCTAGTCAACACAAACAGAGACAGGGA
b. GAACCAGAACGTGACACCTTCTCCTCAAATGCACTAGTCAACACGAGGAAGGATCGAGA
c. -----
```

```
a. TGTCGATGCAGGATCAACTGGAACTTTTACAGTGCCACGTTTGAAGGCAATGACTTCGAA
b. TGTAGATGCAGGAACGATTGGGACCTTCTCAGTACCTCGACTTAAGTCTATGACTTCGAA
c. -----
```


a. TCTGTTATTGTGCAACACAGGCCCTTGTATCTGATGTAGCGAGTGTTTCACTCCATTCGG
 b. TCTGTTATTGTGCAACACAGGCCCTTGTATCTGATGTAGCGAGTGTTTCACTCCATTCGG
 c. TCTGTTATTGTGCAACACAGGCCCTTGTATCTGATGTAGCGAGTGTTTCACTCCATTCGG

a. GTTATAGTTCTTGTGCAAGAGACAAAAAAAAA
 b. GTTATAGTTCTTGTGCAAGAGACAAAAAAAAA
 c. GTTATAGTTCTTGTGCAAGAGACAAAAAAAAA

2. ClustalX-alignment der Aminosäuresequenzen der CP-core-Bereiche (" ": ähnliche As, " . ": konserviert, " * " : perfekt konserviert, " ⊃ ": Aminosäureaustausch im rekombinanten Protein)

- a. CP-RQ-D
 b. CP-SoC
 c. CP-SoC-Rekombinante

a. ADEREDE-----EEVDALQPPPVIQAPAPRTTAPMLNPIFTPATTQPA
 b. AKEGNDDDDVTLVDAGKSTVTTAASTPAVTSSQFPFPPFNLQSAAPMFDP IFTPATTQPN
 c. -----

a. TKPVSQVSGPQLQTFGTYSHEDASPSNSNALVNTNRDRDVDAGSTGTFVPRLKAMTSKL
 b. VRPIAPVVTSPFSTYGVIGNQNVTPSSSNALVNTRKDRDVDAGTIGTFVPRLKSMTSKL
 c. -----

a. SLPKVKGKAIMNLNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQSCFQTWYEGVKRDYDVTDDEMS I I LNG
 b. SLPKVRGKAIMNLSHLAHYNPAQTDLSNTRAPQSCFQTWYEGVKRDYDVSDDEMS I I LNG
 c. -----KAIMNLNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQSCFQTWYEGVKRDYDVTDDEMS I I LNG
 ***** . ***** . * * * . ***** : *****
 RQ-DV

a. LMVWCIENGTSPNINGMWVMMDGETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKR
 b. LMVWCIENGTSPNINGMWVMMDGETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKR
 c. LMVWCIENGTSPNINGMWVMMDGETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKR
 ***** *****

⊃ DF-KI
 a. NYEKAYMPRYGIQRNLTDYSLARYAFKIYEMTSTTPVRAREAHIQMKAALRNQNRFLG
 b. NYEKAYMPRYGIQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSTTPVRAREAHIQMKAALRDVQNRFLG
 c. NYEKAYMPRYGIQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSTTPVRAREAHIQMKAALRNQNRFLG
 ***** ***** . : ***** : *****

a. LDGNVGTQEEDTERHTAGDVNRNMHNLLGMRGV
 b. LDGNVGTQEEDTERHTAGDVNRNMHNLLGVRGV
 c. LDGNVGTQEEDTERHTAGDVNRNMHNLLGMRGV
 ***** : * * *

VERÖFFENTLICHUNGEN

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht oder befinden sich in Vorbereitung zur Veröffentlichung:

Varrelmann, M. & Maiss, E., (1996). Herstellung und Überprüfung von Mutationen in viralen Genen zur Etablierung und sicheren Nutzung von Pathogen-vermittelter Resistenz in transgenen Pflanzen. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* **321**, 136.

Varrelmann, M. & Maiss, E., (1997). Replikation des Scharka-Virus (*Plum pox potyvirus*, PPV) mit chimärem Hüllprotein in transgenen und nichttransgenen *Nicotiana benthamiana* Pflanzen. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* **357**, 288.

Maiss, E., Varrelmann, M., DiFonzo, C. & Raccach, B., (1997). Risk assessment of transgenic plants expressing the coat protein gene of *Plum pox potyvirus*. In: Balácz, E. and Tepfer, M., (Editors), (1997). *Virus resistant transgenic plants: potential ecological impact*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.

Varrelmann, M. & Maiss, E., (1997). Rekombination von Viren in transgenen Pflanzen. 34. Gartenbauwissenschaftliche Tagung, Hannover.

Varrelmann, M. & Maiss, E., (1998). Aminoacid mutations in the helper component protease of plum pox virus (PPV) alter symptom expression and virus replication in *Nicotiana benthamiana* plants. Abstract 1.11.62. VIIth International Congress of Plant Pathology, Birmingham.

Varrelmann, M. & Maiss, E., (1998). N-terminal deletion and mutations in the *Plum pox potyvirus* (PPV) coat protein gene abolish particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants. Vth International Symposium on the biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms. Braunschweig, Germany (in press).

Varrelmann, M. & Maiss, M., (1999). Assembly-mutants and coat protein chimeras of *Plum pox virus* (PPV-NAT) are restored by recombination with transgenic coat protein gene in *Nicotiana benthamiana*. XIth International Congress of Virology, Sydney.

Varrelmann, M. & Maiss, E., (1999). Untersuchungen zur biologischen Sicherheit von transgenen virusresistenten Pflanzen. Abstract 3V7. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Bremen.

Varrelmann, M. & Maiss, M. Mutations in the coat protein gene of *Plum pox virus* coat suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology* in press.

Ich bedanke mich bei

Prof. Dr. Edgar Maiß für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Gartenbau der Universität Hannover und für die Übernahme der Referates. Weiterhin möchte ich mich für die ausgezeichnete Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft sowie den nahezu unerschöpflichen Rat bedanken.

Prof. Dr. G. Adam für die Übernahme des Koreferates und seine Gesprächsbereitschaft.

Prof. Dr. H.-M. Poehling für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und den gewährten Freiraum bei der Durchführung der Arbeit.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Phytopathologie für die außerordentlich gute Zusammenarbeit und die maximale Toleranz (in alphabetischer Reihenfolge):

Dipl.-Ing. agr. Jill Engelmann
Dr. Reinhard Götz
Dipl. Biol. Antje Vortmüller
Jutta Zimmermann

Dr. Laszlo Palkovics for his excellent teamwork during his stay in Hannover.

Dr. Anne Korte für die Überlassung von transgenem Pflanzenmaterial, ohne das kaum Rekombinante erzeugt worden wären.

Dr. Christian Borgemeister für die kompetente Beratung und Hilfe bei der Erstellung englischsprachiger Manuskripte.

Dr. J. Landsmann für die Möglichkeit das Plasmid pLX222. zu benutzen.

Dr. D.-E. Lesemann für die gute und freundliche Beratung in allen Fragen der Elektronenmikroskopie.

Prof. Dr. D.C. Baulcombe for kindly providing the plasmid pPVX201.

Frau C. Breier für die tatkräftige Unterstützung und Kompetenz in allen Institutsaufgaben.

Kristin Meinken für Ihre Hilfe und Toleranz.

meinen Eltern, ohne deren Einsatz diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.