

Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz
Naturwissenschaftliche Fakultät
Universität Hannover

**Untersuchungen zur Korrelation zwischen einer
RNA vermittelten Virusresistenz und der
DNA Methylierung PVY - abgeleiteter Hüllproteinsequenzen
in transgenen *Nicotiana benthamiana* - Pflanzen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover zur Erlangung
des Grades einer Doktorin der Gartenbauwissenschaften
- Dr. rer. hort. -

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Ing. agr. Jill Engelmann

geboren am 21.08.1971 in Berlin

Hannover, Dezember 2005

Referent Prof. Dr. Edgar Maiß

Koreferent Prof. Dr. Günter Adam

Tag der Promotion 17.02.2006

Für Eva und Hans Deutsch

"Genetics proposes, but epigenetics disposes."

Vanyushin (2004)

ZUSAMMENFASSUNG

In Pflanzen kann durch *post transcriptional gene silencing* (PTGS) eine RNA vermittelte Virusresistenz etabliert werden, bei der teilweise eine DNA Methylierung homologer Sequenzen beobachtet wird. Die Korrelation der RNA vermittelten Resistenz und der DNA Methylierung wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Zur Etablierung der RNA vermittelten Virusresistenz wurden *Nicotiana benthamiana* Pflanzen mittels *Agrobacterium* vermitteltem Gentransfer mit unterschiedlichen nicht translatierbaren Konstrukten transformiert. Es wurden Einzelstrangkonstrukte hergestellt, die 109 - 842 bp lange Hüllproteinsequenzen des *Potato virus Y^{NTN}* (PVY) enthielten. Nach PVY Inokulation zeigten nur transgene T₁ Pflanzen, die ≥ 592 bp der viralen Sequenz aufwiesen, eine *recovery* Resistenz oder Immunität, die in einigen Fällen nach vier bis sechs Monaten gebrochen wurde. Die Kombination der 109 - 382 bp langen Hüllproteinsequenzen mit Hüllproteinsegmenten des *Potato leafroll virus* (269 bp) und *Potato virus X* (290 bp) in Einzelstrangkonstrukten erzielte weder Resistenz gegen PVY noch gegen PLRV oder PVX. Eine Anordnung der viralen Sequenzen als *inverted repeat* vermittelte in transgenen Pflanzen eine Resistenz ausschließlich gegen PVY. Die Korrelation der RNA vermittelten Resistenz und der DNA Methylierung wurde untersucht, indem synthetische CG Sequenzen, durch die die DNA Methylierung künstlich erhöht werden sollte, in die 109 - 842 bp langen Hüllproteinfragmente der Konstrukte eingefügt wurde. Dadurch wurde die Resistenz negativ beeinflusst, da nach Addition der CG Sequenzen an ≤ 614 bp lange CP Sequenzen keine PVY - Resistenz in Pflanzen erreicht wurde. Das Anfügen von CG Sequenzen ans 3' -terminale Ende des 842 bp langen PVY Hüllproteinfragments resultierte in Resistenz, wobei die Cytosin - Methylierung der transgenen DNA, die mittels Bisulfit - Modifikation bestimmt wurde, im homologen Bereich nicht zunahm. Obwohl die Methylierung der CG Sequenzen nicht ermittelt werden konnte, scheint die Methylierung keine Voraussetzung für eine RNA vermittelte PVY Resistenz zu sein. Aus weiteren Untersuchungen der Methylierung viraler Sequenzen in transgenen resistenten und anfälligen Pflanzen konnte ebenfalls nicht abgeleitet werden, dass eine Korrelation zwischen der RNA vermittelten Resistenz und der DNA Methylierung besteht.

Stichworte: PVY, RNA vermittelte Resistenz, DNA Methylierung

ABSTRACT

By posttranscriptional gene silencing RNA mediated virus resistance can be established in plants and this phenomenon is sometimes accompanied by DNA methylation of homologous sequences. The correlation of RNA mediated resistance and DNA methylation was examined in this study. For establishment of RNA mediated virus resistance, *Nicotiana benthamiana* plants were transformed by *Agrobacterium* mediated gene transfer with different non translatable constructs. Some single stranded constructs were produced, which contained 109 - 842 bp long coat protein derived sequences of *Potato virus Y^{NTN}* (PVY). After PVY inoculation only transgenic T₁ plants, which contained ≥ 592 bp of the coat protein gene sequence, showed recovery resistance or immunity, which was broken in several cases after four to six months. The combination of 109 - 382 bp long coat protein gene sequences with coat protein segments of *Potato leafroll virus* (269 bp) and *Potato virus X* (290 bp) in single stranded constructs revealed no resistance in plants neither to PVY nor PLRV and PVX. The arrangement of viral derived sequences as inverted repeat, established a resistance in plants only to PVY. To investigate the correlation between RNA mediated resistance and DNA methylation synthetic CG sequences were inserted into 109 - 842 bp PVY CP sequence containing constructs, to increase DNA methylation artificially. The resistance was hereby negatively affected, since after adding CG sequences to 109 - 614 bp long PVY coat protein gene sequences resistance was not established. By addition of CG sequences to 842 bp PVY coat protein sequences a resistance in plants was mediated, but cytosine methylation of transgene DNA, which was determined by means of bisulfite modification, was not increase in homologous sequences. Although methylation of CG sequences could not be determined, methylation does not seem to be a precondition for establishment of RNA mediated PVY resistance. In further investigations of methylation of viral derived sequences in transgenic resistant and susceptible plants, a correlation between RNA mediated resistance and DNA methylation could also not be detected.

Keywords: PVY, RNA mediated resistance, DNA methylation

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Material	25
2.1	Biologisches Material	25
2.1.1	Pflanzenmaterial	25
2.1.2	Viren	25
2.1.3	Viraler Vollängen - Klon.....	25
2.1.4	Antiseren.....	26
2.1.5	Bakterienstämme	26
2.1.6	Vektoren und Expressionsplasmide	27
2.1.7	Enzyme	27
2.1.7.1	Restriktionsendonukleasen	28
2.1.7.2	Nukleinsäure - modifizierende Enzyme	29
2.1.7.3	Polymerasen	29
2.1.7.4	Protein - modifizierende Enzyme.....	30
2.2	Chemikalien	30
2.2.1	Chemikalien (fest)	30
2.2.2	Chemikalien (flüssig)	32
2.3	Synthetische Oligonukleotide	33
2.4	"Kits"	35
2.5	Verbrauchsmaterialien	35
2.6	Sonstige Materialien.....	36
2.7	Geräte.....	36
2.8	Software.....	38
3	Methoden.....	39
3.1	Biologische Methoden	39
3.1.1	Anzucht von <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen	39
3.1.2	Kultivierung von <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen.....	40
3.1.3	Virusübertragung auf <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen	40
3.1.3.1	Mechanische Virusübertragung.....	40
3.1.3.2	Virenübertragung mittels Agrobakterien - Infiltration	41
3.1.4	Durchführung der Resistenztests	42
3.2	Molekularbiologische Methoden	43
3.2.1	Standardmethoden.....	43
3.2.1.1	Phenol - Chloroform Reinigung	43
3.2.1.2	Natriumacetat / Ethanol - Fällung von Nukleinsäuren	43
3.2.1.3	Proteinase K - Verdau	44
3.2.2	Agarosegel - Elektrophorese nach McDONELL <i>et al.</i> (1977).....	44
3.2.2.1	Herstellung eines Größenstandards für die Agarosegel - Elektrophorese.....	45
3.2.2.2	Agarosegel - Elektrophorese und Dokumentation	46
3.2.2.3	Extraktion der DNA aus einem Agarosegel mit dem Qiaex II® Gel Extraction Kit	47

3.2.3	Polyacrylamidgel - Elektrophorese	47
3.2.3.1	Diskontinuierliche Polyacrylamid - Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970).....	48
3.2.3.2	Gelelektrophorese im Tris - Tricin - Puffersystem nach SCHÄGGER UND VON JAGOW (1987).....	50
3.2.3.3	Coomassie - Blau Färbung der Proteine im Polyacrylamidgel	51
3.2.3.4	Bestimmung des Molekulargewichtes	51
3.2.4	Nukleinsäure - Extraktion aus <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen	52
3.2.4.1	Gesamtnukleinsäure Extraktion nach EDWARDS <i>et al.</i> (1991)	52
3.2.4.2	DNA Extraktion aus <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen mittels DNeasy® - Kit von Qiagen	53
3.2.4.3	RNA - Extraktion nach VERWOOD <i>et al.</i> (1989) mit heißem Phenol.....	53
3.2.5	Amplifikation von Nukleinsäure.....	54
3.2.5.1	<i>Polymerase chain reaction</i> (PCR) nach MULLIS (1987).....	54
3.2.5.2	Reverse Transkription (RT) - PCR nach CHELLY <i>et al.</i> (1988).....	56
3.2.5.3	Hybridisierung synthetisch hergestellter einzelsträngiger Oligonukleotide	58
3.2.6	Aufreinigung von PCR - Produkten mit dem QIAquick® PCR Purification KIT.....	59
3.2.7	Modifikation von DNA.....	59
3.2.7.1	DNA - Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	59
3.2.7.2	<i>In vitro</i> DNA Neusynthese mit dem Klenow Fragment nach CLARK <i>et al.</i> (1987)	60
3.2.7.3	DNA Dephosphorylierung in Anlehnung an SAMBROOK <i>et al.</i> (1989).....	61
3.2.7.4	Ligation	62
3.2.8	Transformation von Bakterien	62
3.2.8.1	Transformation von <i>E. coli</i>	62
3.2.8.2	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	70
3.2.9	Transformation von <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen nach HORSCH <i>et al.</i> (1985).....	74
3.2.9.1	<i>In vitro</i> Anzucht von <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen	76
3.2.9.2	Transformation.....	77
3.2.9.3	Samenernte.....	79
3.2.9.4	Bestimmung der Anzahl der Integrationsorte.....	80
3.2.9.5	Serologischer Nachweis viraler Proteine in <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen.....	80
3.2.9.6	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA) nach CLARK UND ADAMS (1977)	81
3.2.9.7	Western - Blotting nach TOWBIN (1979)	83
3.2.9.8	Tissue - Print - Immuno - Assay (TPIA) nach LIN <i>et al.</i> (1990).....	86
3.2.10	Nachweis der DNA Methylierung mittels differentieller Modifikation mit Bisulfit.....	87
3.2.10.1	Modifikation.....	88
3.2.10.2	Desulfonierung und Aufreinigung	89
3.2.10.3	Parameter für die Primer zur Amplifikation der DNA nach der Bisulfit Modifikation.....	90

3.2.10.4	Kontrolle der Modifikationseffizienz nach FROMMER <i>et al.</i> (1992)	91
3.2.10.5	Amplifikation der modifizierten DNA	92
3.2.10.6	Ligation in den pGEM® - T Easy Vektor	92
3.2.10.7	Effiziente Durchmusterung von Bakterienkolonien	93
3.2.10.8	Aufreinigung der rekombinanten Plasmide für die Sequenzierung	94
3.2.11	Expression und Aufreinigung der DNA - abhängigen <i>Taq</i> DNA Polymerase	94
3.2.11.1	Expression rekombinanter Plasmide nach dem Expressionssystem nach CROWE (1992)	95
3.2.11.2	Reinigung der DNA - abhängigen <i>Taq</i> DNA Polymerase nach PLUTHERO (1993)	95
3.2.11.3	Dialyse	96
3.2.12	Bestimmung der Reinheit der isolierten <i>Taq</i> DNA Polymerase	97
3.2.13	Aktivitätsbestimmung der isolierten <i>Taq</i> DNA Polymerase	98
3.2.14	Vergleich unterschiedlicher <i>Taq</i> DNA Polymerasen zur Amplifikation transgener modifizierter DNA	99
4	Ergebnisse	100
4.1	Transformation von <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen zur Etablierung einer RNA vermittelten Virus Resistenz	100
4.1.1	Die Klonierungsstrategien	100
4.1.2	Klonierung der Konstrukte in <i>E. coli</i> NM 522	102
4.1.2.1	Hybridisierung und vorbereitende Klonierung der synthetischen (CG) ₁₀	102
4.1.2.2	Vorbereitung der Vektoren	103
4.1.2.3	Klonierung der Konstrukte mit unterschiedlich langen Hüllprotein abgeleiteten Sequenzen des PVY	104
4.1.2.4	Klonierung der Hüllproteinabgeleiteten Sequenzen des PLRV und PVX zur Verlängerung der PVY Konstrukte	106
4.1.3	Elektroporation von <i>A. tumefaciens</i> LBA4404	108
4.1.4	Transformation von <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen	109
4.2	PVY - Resistenztest	112
4.3	Transformation von <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen zur Etablierung einer multiplen RNA vermittelten Virusresistenz mit <i>inverted repeat</i> Konstrukten	114
4.3.1	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die <i>inverted repeat</i> Konstrukte	114
4.3.2	Amplifikation und Klonierung der <i>inverted repeat</i> Konstrukte	115
4.3.3	Transformation von <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 und <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen	116
4.4	Untersuchung einer multiplen Virusresistenz durch Verwendung von <i>inverted repeat</i> Konstrukten	117
4.4.1	PVY Resistenztest	117
4.4.2	PLRV Resistenztest	118
4.4.3	PVX Resistenztest	120

4.5	Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> - Pflanzen zur Etablierung einer RNA vermittelten PVY - Resistenz mit längeren PVY CP Fragmenten	121
4.5.1	Klonierungsstrategie der Konstrukte, die längere Sequenzen der PVY CP kodierenden Region beinhalten	121
4.5.2	Amplifikation und Klonierung der viralen PVY CP Sequenzen	122
4.5.3	Transformation von <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 und <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen	123
4.6	PVY - Resistenztest	124
4.7	Molekulare Untersuchungen der PVY resistenten Linien	127
4.7.1	Nachweis viraler Proteine im Western - Blot	127
4.7.2	Bestimmung der Anzahl der Integrationsorte des Transgens in das <i>N. benthamiana</i> - Genom PVY resistenter T1 - Linien	128
4.8	Untersuchung der Methylierung transgener DNA aus <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen	129
4.8.1	Wiederholung des PVY - Resistenztests mit ausgewählten Linien	129
4.8.2	Entwicklung der Primer und weitere vorbereitende Arbeiten für die Modifikation transgener DNA mit Bisulfit	137
4.8.2.1	Kontrolle der Bisulfit Modifikation mit Hilfe von pBluescriptII - DNA	140
4.8.2.2	Adaption der Methode der Bisulfit Modifikation nach RAIZIS an <i>N. benthamiana</i> - DNA	142
4.8.2.3	Methode zur Bestimmung der Effizienz der Bisulfit Modifikation genomischer <i>N. benthamiana</i> - DNA	143
4.8.2.4	Entwicklung neuer Primerpaare für die Reamplifikation der viral - abgeleiteten Sequenzen der Konstrukte PVY und PVYCG	145
4.8.3	Modifikation der transgenen DNA der ausgewählten <i>N. benthamiana</i> - Testpflanzen	147
4.8.4	Auswertung der Bisulfit Modifikation	147
4.8.4.1	Bestimmung der unterschiedlichen Modifikations - Effizienzen mit Hilfe des Kontrollplasmides	148
4.8.4.2	Bestimmung des Methylierungsgrades der viral - abgeleiteten Sequenzen der transgenen <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen	148
4.8.4.3	Graphische Auswertung	150
4.8.4.4	Analyse der Verteilung der ^m C innerhalb der viral - abgeleitenden Sequenzen	160
4.8.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Ermittlung einer Korrelation zwischen der DNA Methylierung und einer PVY - Resistenz	163
5	Diskussion	165
6	Literaturverzeichnis	185
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	211

8	Anhang	218
8.1	Plasmidkarten	218
8.2	Sequenzabschnitte wichtiger Plasmide mit Angaben der relevanten Erkennungsschnittstellen	220
8.3	Vorbereitung der Vektoren	222
8.4	Klonierungen.....	222
8.5	Schematische Darstellung der Lage der Primer zur Amplifikation der transgenen Sequenz und Angaben der Größe der resultierenden PCR Fragmente.....	225
8.6	Analyse auf Spleiß - Stellen der <i>inverted repeat</i> Konstrukte.....	226
8.7	ELISA Daten und Auswertungen.....	227
8.8	PCR zum Nachweis modifizierte pBlueskriptII DNA	229
8.9	Alignments	229
	Wissenschaftliche Veröffentlichungen von Teilen dieser Arbeit	240
	Danksagung	241
	Lebenslauf	242
	Erklärung	243

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Auf eine Auflistung international anerkannter Abkürzungen von Maßeinheiten und Chemikalien, sowie im deutschen Sprachgebrauch allgemein üblichen Abkürzungen wurde hier verzichtet.

A	Adenin
A. bidest	bidestilliertes Wasser (<i>Aqua bidestiliert</i>)
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
abRNA	aberrante Ribonukleinsäure
abs	absolut
Amp	Ampicillin
<i>amp^r</i>	Ampicillin Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
aC	Cytosine in asymmetrischem Kontext (CNN)
aq	in A. bidest gelöst
ATP	Adenosin -Triphosphat
BGBL	Bundesgesetzblatt
C	Cytosin
^m C	5 - Methyl - Cytosin
Camp	Chloramphenicol
cDNA	komplementärer Desoxyribonukleinsäure - Strang
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CP	Hüllprotein (<i>coat protein</i>)
cRdRp	zelluläre RNA abhängige RNA Polymerase
C - terminal	Carboxyterminales Ende von Proteinen
DAS-ELISA	<i>Double - Antibody - Sandwich</i> ELISA
dATP	Desoxyadenosin -Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin -Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin -Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid -Triphosphat
dpi	Tage nach Inokulation (<i>days post inoculation</i>)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dsRNA	doppelsträngige RNA
dTTP	Desoxythymidin -Triphosphat
ea	<i>of each protein</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme - linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	et alii
G	Guanin
GFP	<i>green - fluorescent - protein</i>
H	Nukleotide A, C, T
VI	

HC - Pro	Helferkomponente Proteinase
ICTV	<i>International Committee of Taxonomy of Viruses</i>
IgG	Immun Globulin G
iR	instabile Resistenz
irR	instabile <i>recovery</i> Resistenz
Kan	Kanamycin
L.	Carl von Linné
LM	<i>Low melting</i>
Mill.	Phillip Miller
MBI	MBI fermentas
MCS	Polylinker (<i>multiple cloning site</i>)
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
N	alle Nukleotide (A, G, T, C)
N - terminal	Amino terminales Ende von Proteinen
n. d.	nicht durchgeführt
NC	Nitrocellulose
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> der Vereinigten Staaten von Amerika
NEB	<i>New England Biolabs</i>
Nla	Kerneinschlusskörper a (<i>nuclear inclusion body a</i>)
Nlb	Kerneinschlusskörper b (<i>nuclear inclusion body b</i>)
nos	Nopalin Synthetase
npt II	Neomycin Phototransferase II
nt	Nukleotid
ntr	nicht translatierbarer Bereich (<i>non translated region</i>)
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ori	Replikationsursprung (<i>Origin of replication</i>)
PAGE	Polyacrylamid - Gelelektrophorese
PAZ	Bereich von 110 AS, die in Proteinen der Piwi -, Argonaut- und Zwillie - Familien vorhanden sind
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDR	Pathogen abgeleitete Resistenz (<i>Pathogen derived resistance</i>)
PTA	<i>Plate trapped antigene</i>
PTGS	<i>post transcriptional gene silencing</i>
RAM	<i>Rabbit anti mouse</i>
RdRp	RNA abhängige RNA Polymerase
RE	Restriktionsendonuklease
rgs - CaM	<i>regulator of gene silencing calmodulin-like protein</i>
RISC	RNA-induzierter <i>Silencing</i> Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rR	<i>recovery</i> Resistenz
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
sC	Cytosine in symmetrischem Kontext (CG, CHG)

sg	subgenomisch
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
sU	sulfoniertes Uracil
Sulz.	Johann Heinrich Sulzer
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	Transfer DNA
Tet	Tetracyclin
Ti -Plasmid	Tumor induzierendes Plasmid
TPIA	<i>Tissue print immuno assay</i>
U	Uracil
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin -Triphosphat
UV	ultraviolett
<i>vir</i> - Gene	Virulenzgene
VLK	Vollängen Klon
VPg	viral kodiertes Genom-assoziiertes Protein

Pflanzennamen

<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>P. floridana</i>	<i>Physalis floridana</i>

Aminosäuren und Motive

Die in der Arbeit beschriebenen Proteinmotive sind aus den einbuchstabigen Abkürzungen der einzelnen Aminosäuren zusammengesetzt.

Ala	Alanin	A
Asp	Asparaginsäure	D
Gln	Glutamin	Q
Glu	Glutaminsäure	E
Gly	Glycin	G
Ile	Isoleucin	I
Lys	Lysin	K
Phe	Phenylalanin	F
Pro	Prolin	P
Ser	Serin	S
Thr	Threonin	T
Val	Valin	V

Virusabkürzungen

ACMV	<i>African cassava mosaic virus</i>
AMV	<i>Avian myeloblastis virus</i>
BLRV	<i>Bean leafroll virus</i>
BNYVV	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
BSMV	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
BWYV	<i>Beet western yellows virus</i>
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i>
BYV	<i>Beet yellows virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CpMV	<i>Cowpea mosaic virus</i>
FHV	<i>Flock house virus</i>
GRSV	<i>Groundnut ringspot virus</i>
MMuLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
PCV	<i>Peanut clump virus</i>
PLRV	<i>Potato leafroll virus</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>
PSTVd	<i>Potato spindle tuber viroid</i>
PVA	<i>Potato virus A</i>
PVM	<i>Potato virus M</i>
PVS	<i>Potato virus S</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
RHBV	<i>Rice hoja blanca virus</i>
RYMV	<i>Rice yellow mottle virus</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TCSV	<i>Tomato chlorotic spot</i>
TCV	<i>Turnip crinkle virus</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
ToMV	<i>Tomato mosaic virus</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
TVMV	<i>Tobacco vein mottling virus</i>
WMV2	<i>Watermelon virus 2</i>
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>

1 EINLEITUNG

Viruserkrankungen verursachen bei Kulturpflanzen weltweit Verluste von ca. 2 Milliarden US Dollar, wobei die Einbußen allein im Kartoffelanbau auf etwa 30 Millionen US Dollar geschätzt werden (SCHUCHERT *et al.*, 1996). Von ca. 180 Viren, die in der Lage sind Kartoffelpflanzen zu infizieren, führen etwa 35 zu erheblichen Ertragsminderungen. Die Möglichkeiten der klassischen Züchtungen zur Erzeugung resistenter Pflanzen sind begrenzt, da sie sich aufgrund der Autotetraploidie und der Heterozygotität der Kartoffelpflanzen als sehr schwierig erweisen. Heute stehen deswegen nur sehr wenige resistente Sorten zur Verfügung, obwohl mehrere, aus nah verwandten Arten identifizierte Resistenzgene gegen wirtschaftlich wichtige Viren bekannt sind (FOXE, 1992). Weil weitere herkömmliche Kontrollmaßnahmen, wie z.B. die Bekämpfung der Vektoren, begrenzt und teuer sind und infizierte Pflanzen nur durch sehr aufwändige Verfahren virusfrei gemacht werden können, wird heute der Einsatz von zertifiziertem Saatgut oder resistenten Sorten als am ökonomisch und ökologisch sinnvollsten erachtet (SOLOMON - BLACKBURN UND BARKER, 2001; SALAZAR, 2003).

1985 schlugen SANFORD UND JOHNSTON vor, Kulturpflanzen mit Pathogen abgeleiteten Sequenzen gentechnisch zu verändern und auf diesem Weg Virusresistenzen (*pathogen derived resistance*; PDR) zu erzeugen. 1986 zeigten POWELL-ABEL *et al.*, dass es durch die Expression des Hüllproteins (*coat protein*; CP) des *Tobacco mosaic virus* (TMV) möglich war, eine Resistenz gegen TMV in Tabakpflanzen zu etablieren. Da die Viren für diese Form der Resistenzausprägung selbst die notwendigen Sequenzinformationen liefern, besteht theoretisch die Möglichkeit, eine Resistenz gegen jedes Virus in Pflanzen zu etablieren, für die geeignete Transformationsprotokolle zur Verfügung stehen. So wurden seit 1986 durch PDR resistente Pflanzen gegen Viren aus 13 verschiedenen taxonomischen Gruppen hergestellt (GRUMET, 1995; LOMONOSSOFF, 1995). Während anfänglich postuliert wurde, dass die Expression des transgen - kodierten Proteins für die Ausprägung der Resistenz notwendig sei, wurde später entdeckt, dass allein das Vorliegen der mRNA des Transgens ausreicht, um eine Virusresistenz in Pflanzen zu etablieren (GOLEMBOSKI *et al.*, 1990; BRAUN UND HEMENWAY, 1992; DE HAAN *et al.*, 1992;

LINDBO UND DOUGHERTY, 1992). Die Grundlagen für diese sogenannte RNA vermittelte Resistenz sind seitdem Gegenstand intensiver Forschung. Heute ist bekannt, dass diese Resistenz sowohl durch sense als auch antisense Transgene induzierbar ist (FARINELLI UND MALNOE, 1993; SMITH *et al.*, 1994). Entscheidend ist das Vorkommen doppelsträngiger RNA (dsRNA), die als Auslöser des Mechanismus gilt und zu Degradation homologer viraler RNA und mRNA im Zytoplasma führt (WATERHOUSE *et al.*, 2001; VOINNET, 2001; VAUCHERET *et al.*, 2001; MATZKE *et al.*, 2001) und somit eine Virusresistenz bewirkt (LINDBO *et al.*, 1993; DOUGHERTY *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 1994; ENGLISH *et al.*, 1996; SIJEN *et al.*, 1996). Die meisten Pflanzenviren weisen während ihrer Replikation doppelsträngige Zwischenstadien auf und sind damit zugleich Auslöser und Ziel dieses pflanzlichen Degradationsmechanismus (MARATHE *et al.*, 2000; LI UND DING, 2001; VOINNET, 2001). Dieser ist durch eine hohe Transkriptionsrate des Transgens und einen geringen *steady state* Level gekennzeichnet und wird deswegen auch als *Post transcriptional gene silencing* (PTGS) bezeichnet (BAULCOMBE, 1996; DEPICKER UND MONTAGU, 1996; WASSENEGGER UND PELISSIER, 1998).

Genetische und biochemische Studien zeigen, dass das PTGS einen adaptiven Abwehrmechanismus der Pflanzen gegen Viren und parasitische Nukleinsäuren in Form von z.B. Transposons darstellt (BECLIN *et al.*, 1998; MOURRAIN *et al.*, 2000). Unterstützt wird diese Aussage dadurch, dass die Pflanze in Folge der PTGS - Aktivierung ein mobiles Signal produziert (FAGARD UND VAUCHERET, 2000), was sich durch Plasmodesmata und das vaskuläre System, und damit auf demselben Weg wie die Viren, in den Pflanzen ausbreitet. Des Weiteren sind für Viren aus nahezu allen Virusfamilien Suppressorproteine identifiziert worden, mit denen die Viren in der Lage sind, das PTGS aktiv zu unterdrücken. Repräsentativ für die jeweiligen Genera sind in Tab. 1.1 Viren mit den dazugehörigen Suppressoren aufgelistet.

Tab. 1.1 Auflistung der ersten identifizierten Suppressor Proteine von Viren unterschiedlicher Genera

Virus	Genus	Protein	Referenz
<i>African cassava mosaic virus</i> (ACMV)	Begomovirus	AC2	VOINNET <i>et al.</i> , 1999
<i>Barley stripe mosaic virus</i> (BSMV)	Hordeivirus	gb	YELINA <i>et al.</i> , 2002
<i>Beet necrotic yellow vein virus</i> (BNYYV)	Furovirus	P14	DUNOYER <i>et al.</i> , 2002
<i>Beet western yellows virus</i> (BWYV)	Polerovirus	P0	PFEFFER <i>et al.</i> , 2002
<i>Beet yellows virus</i> (BYV)	Closterovirus	P21	REED <i>et al.</i> , 2003
<i>Cowpea mosaic virus</i> (CPMV)	Comovirus	small CP	VOINNET <i>et al.</i> , 1999 LIU <i>et al.</i> , 2004
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Cucumovirus	2b	BRIGNETI <i>et al.</i> , 1998
<i>Flock house virus</i> (FHV)	Nodavirus	B2	LI <i>et al.</i> , 2002
<i>Peanut clump virus</i> (PCV)	Pecluvirus	P15	DUNOYER <i>et al.</i> , 2002
<i>Potato virus X</i> (PVX)	Potexvirus	P25	VOINNET <i>et al.</i> , 2000
<i>Potato virus Y</i> (PVY)	Potyvirus	HC-Pro	BRIGNETI <i>et al.</i> , 1998
<i>Rice hoja blanca virus</i> (RHBV)	Tenuivirus	NS3	BUCHER <i>et al.</i> , 2003
<i>Rice dwarf virus</i>	Reovirus	Pns10	CAO <i>et al.</i> , 2005
<i>Rice yellow mottle virus</i> (RYMV)	Sobemovirus	P1	VOINNET <i>et al.</i> , 1999
<i>Tomato bushy stunt virus</i> (TBSV)	Tombusvirus	P19	VOINNET <i>et al.</i> , 1999
<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i> (SPTSV)	Crinivirus	P22	KREUZE <i>et al.</i> , 2005
<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)	Tobamovirus	P30	KUBOTA <i>et al.</i> , 2003
<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	Tospovirus	NSs	BUCHER <i>et al.</i> , 2003
<i>Turnip crinkle virus</i> (TCV)	Carmovirus	P38	THOMAS <i>et al.</i> , 2003; QU <i>et al.</i> , 2003
<i>Turnip yellow mosaic virus</i> (TYMV)	Tymovirus	P69	CHEN <i>et al.</i> , 2004

Es wird davon ausgegangen, dass es den Viren nur durch die Unterdrückung des pflanzeigenen Abwehrsystems mit Hilfe dieser Suppressoren möglich ist, die jeweiligen Wirtspflanzen erfolgreich zu infizieren.

Grundlagen des PTGS und derzeitige Erkenntnisse zur RNA vermittelten, transgenen Virusresistenz

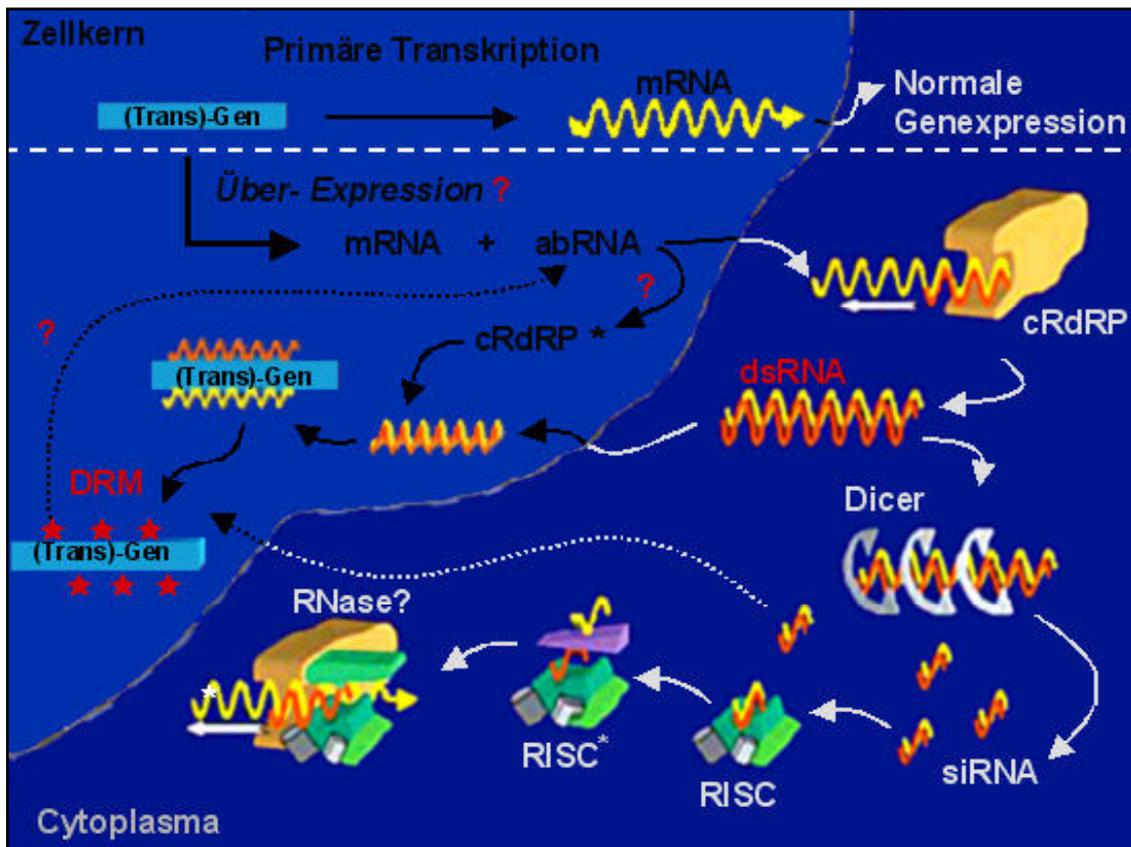


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des PTGS in höheren Pflanzen (verändert nach WASSENEGGER, 2002; Erklärung siehe Text)

Im Normalfall werden die transgenen Sequenzen, genau wie die pflanzeigener Gene, im Zellkern transkribiert und nach dem Transport der messenger RNA (mRNA) im Zytoplasma exprimiert. Das Schwellenwertmodell (SMITH *et al.*, 1994; DOUGHERTY UND PARKS, 1995) beschreibt, dass erst durch das Überschreiten einer bestimmten, aber noch unbekanntem Transkriptkonzentration, neben der normalen mRNA auch fehlerhafte, sogenannte aberrante RNA (abRNA) gebildet wird. Diese abRNA wird wahrscheinlich im Zellkern und/oder im Zytoplasma von einer zellulären RdRp (cRdRp) erkannt und amplifiziert. Proteine der Argonaut Familie, die einer Gruppe eng verwandter und während der Evolution hoch konservierter Proteine angehören, erkennen vermutlich die resultierende dsRNA und transportieren sie zu einer Endo - Ribonuklease (RNase III der Klasse II, NICHOLSON, 1999), die als *Dicer* bezeichnet wird (ZAMORE *et al.*, 2000; BERNSTEIN *et al.*, 2001; TABARA *et al.*, 2002). Dieser evolutionär konservierte *Dicer* weist zwei RNaseIII Motive, eine carboxyterminal gelegene Bindungsstelle für dsRNA, einen aminoterminalen

Helikase - Bereich, sowie eine Domäne von 110 Aminosäuren, die in Proteinen wie Piwi, Argonaut und Zwiile/Pinhead (PAZ: Piwi/Argonaut/Zwiile; PROVOST *et al.*, 2002; AGRAWAL *et al.*, 2003) vorhanden sind, auf und prozessiert die dsRNA ATP - abhängig (TUSCHL *et al.*, 1999; NYKÄNEN *et al.*, 2001) in kurze doppelsträngige *short interfering* RNAs (siRNAs; HAMILTON UND BAULCOMBE, 1999). Durch eine Veränderung der *Dicer* Struktur (HALL *et al.*, 2002) kann der Abstand zwischen den aktiven endonukleolytischen Bereichen modifiziert werden, so dass in Pflanzen zwei Klassen von siRNAs mit definierten Längen von 21 und 24/25 Nukleotiden entstehen (HAMMILTON UND BAULCOMBE, 1999; TANG *et al.*, 2003). Diese siRNAs werden in einen Multiprotein - Komplex eingebunden, der als *RNA-induced silencing complex* (RISC) bezeichnet wird (HAMMOND *et al.*, 2000). Er weist eine sequenzspezifische Nukleaseaktivität (HAMMOND *et al.*, 2000), zwei RNA Bindungsstellen (CAUDY *et al.*, 2002), sowie ein Protein der Argonaut Familie auf, das Homologien zu einer Helikase aus *Drosophila* zeigt (ISHIZUKA *et al.*, 2002). Letzteres enthält neben einem Polyglutamin Rest eine PAZ - und eine PIWI - Domäne (PPD), durch deren Interaktion mit der PAZ - Domäne des *Dicers* wahrscheinlich die Inkorporation der siRNAs in den RISC katalysiert wird (BAULCOMBE, 2001; HAMMOND *et al.*, 2001). In einem ATP - abhängigen Schritt (NYKÄNEN *et al.*, 2001) wird die inkorporierte siRNA vermutlich durch die Helikase denaturiert, ein Einzelstrang der siRNA sowie die Helikase abgetrennt und dadurch der RISC aktiviert (RISC★). Der im RISC★ verbleibende siRNA Einzelstrang hybridisiert im Zytoplasma mit komplementärer RNA, wodurch deren Degradation durch endonukleolytischen Verdau (ELBASHIR *et al.*, 2001) mittels einer bisher noch nicht identifizierten RNase (RNase?) eingeleitet wird. Die gebundene komplementäre RNA wird etwa in der Mitte der siRNA Sequenz geschnitten (CAPLEN *et al.*, 2001) und anschließend durch eine mutmaßliche Exoribonuklease abgebaut (HAMMOND *et al.*, 2000). Vor der Dissoziation des RISC★/RNA Komplexes transkribiert eine cRdRp, die nicht mit der, die die abRNA amplifiziert identisch sein muss, die komplementäre RNA, indem sie den siRNA Einzelstrang als Primer benutzt. Dadurch wird der Pool an langen dsRNAs und folglich an siRNAs erhöht und die Degradation verstärkt (WASSENEGGER, 2002).

In unterschiedlichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das PTGS mit einer *de novo* DNA Methylierung der transgenen Sequenz assoziiert ist (ASSAAD *et al.*, 1993; WASSENEGGER *et al.*, 1994; INGELBRECHT *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 1994; ENGLISH *et al.*, 1996; SIJEN *et al.*, 1996; VAN HOUDT *et al.*, 1997; STAM *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 1998, 1999; ELMAYAN *et al.*, 1998; PELLISSIER *et al.*, 1999), die vermutlich aus einer Interaktion der dsRNA oder siRNA mit homologen DNA Sequenzen im Zellkern resultiert. Dabei werden nicht nur die Cytosine (C), die in einem symmetrischen Kontext (CG oder CHG; mit H = A, C, T) stehen und als klassische Ziele der Methylierung gelten (GRUENBAUM, 1981), sondern nahezu alle C der homologen Sequenz, auch die, die in dem asymmetrischen Kontext CHH vorliegen, methyliert (PELLISSIER UND WASSENEGGER, 2000; WANG *et al.*, 2001). Diese Methylierung bewirkt wahrscheinlich einen vorzeitigen Abbruch der primären Transkription, wodurch verkürzte mRNAs entstehen, die von LITIERE *et al.* (1999), WANG UND WATERHOUSE (2000) und WANG *et al.* (2001) gezeigt wurden. Unter der Voraussetzung, dass die abRNA, deren Konzentration somit ansteigen würde, als Template für die cRDRP dient, könnte auf diese Weise das einmal initiierte PTGS aufrecht erhalten und verstärkt werden (WASSENEGGER, 2002).

In anderen Arbeiten wurde der Zusammenhang zwischen der DNA Methylierung und dem PTGS hingegen nicht beobachtet (SCHEID *et al.*, 1991; GOODWIN *et al.*, 1996; STAM *et al.*, 1998), so dass bis heute nicht eindeutig abgeleitet werden konnte, ob die Methylierung eine aktive Rolle im Auslösen oder Aufrechterhalten des PTGS spielt, oder als eine indirekte Konsequenz resultiert.

Kartoffelinfizierende Viren

Die wirtschaftlich bedeutendsten Schäden im Kartoffelanbau verursachen die Viren *Potato virus Y* (PVY), *Potato leafroll virus* (PLRV), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus A* (PVA), *Potato virus M* (PVM) und *Potato virus S* (PVS), durch deren Befall es zu Ertragsminderungen von mehr als 90% kommen kann. Besonders wenn Kombinationen der Viren in einer Pflanze vorkommen, kann die Ausprägung der Symptome und somit der Ertragsverlust durch synergistische Effekte noch ansteigen (LANDSMANN, 2000).

Die Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), die zur Familie der *Solanaceae* gehört wird global auf ca. 20 Millionen Hektar angebaut. Da sie allen anderen

Kulturpflanzen in der Produktion von Proteinen pro Zeiteinheit und Fläche überlegen ist, steht sie hinter Weizen, Reis und Mais auf der Liste der weltweit produzierten Nahrungspflanzen auf Platz vier. Die wirtschaftliche Bedeutung in Deutschland wird dadurch repräsentiert, dass es im Vergleich der 60 kartoffelanbauenden Länder mit einer Erntemenge von 13 Millionen Tonnen Platz 6 belegt (GRAF, 2001).

Weil Kartoffeln im wesentlichen vegetativ vermehrt werden, stellen die Viren, die zum Großteil in den Knollen überdauern, eine große Gefahr für den Anbau dar, zumal die Primärinfektionen aufgrund ihrer schwachen Symptomausprägung oder eines latenten Befalls oft nicht erkannt werden, dadurch aber im Folgejahr meist schwerere Sekundärinfektionen resultieren (SALAMAN, 1970).

Potato virus Y (PVY)

PVY bildet den Typstamm des Genus *Potyvirus*, der zur Familie der *Potyviridae* gehört (PRINGLE, 1999), die mit 70 definitiven und 140 möglichen Mitgliedern (BARNETT, 1992) die größte und ökonomisch wichtigste Gruppe der Pflanzenviren darstellt (SHUKLA *et al.*, 1994). Rund 40% aller durch Pflanzenviren hervorgerufenen Ertragsminderungen werden heute allein auf PVY zurückgeführt (RIECHMANN *et al.*, 1992). Weltweit betragen die durch PVY verursachten Ernteauffälle in den Anbaugebieten, abhängig von der Kartoffelsorte, dem infizierenden Virus Stamm und dem Infektionszeitpunkt bis zu 80% (DE BOKX UND HUTTINGA, 1981). In Deutschland wird PVY nach der Pflanzkartoffelverordnung als schweres Virus eingestuft (BGBI. Teil I, Nr. 61, 2004).

Genomstruktur des PVY

Die Partikel des PVY liegen in Form flexibler filamentöser Fäden vor, die eine Länge von 730 nm und eine Breite von 11 nm aufweisen. Sie sind in der Epidermis, dem Zytoplasma und den Vakuolen lokalisiert und bilden charakteristische Einschlusskörper, die als amorphe Kristalle im Kern oder in Form von "*pinwheels*" - wie die Partikel selbst - im epidermalen Gewebe und im Zytoplasma auftreten (CHRISTIE UND EDWARDSON, 1977).

Das einzelsträngige Sinnstrang RNA Genom weist eine Größe von 9.7 kb auf und wird von ungefähr 2000 Untereinheiten einzelner Hüllproteine verpackt, die

in helikaler Struktur angeordnet sind (SHUKLA *et al.*, 1994). Das RNA Genom kodiert für ein Polyprotein mit einer Größe von ca. 340 kDa, das durch co- und posttranslationale proteolytische Spaltung der drei viruskodierten Proteinasen in neun multifunktionelle Proteine prozessiert wird (RIECHMANN *et al.*, 1992). In der N - terminalen Region des Polyproteins sind dabei die Proteine angeordnet, die für die Ausbreitung des Virus eine Rolle spielen, während im C - terminalen Bereich die Proteine lokalisiert sind, die zum Replikationskomplex gehören (URCUQUI-INCHIMA *et al.*, 2001). Der offene Leseraster (*open reading frame*; ORF) wird sowohl am 5' als auch am 3' - Ende von zwei nicht translatierbaren Bereichen flankiert. Daneben ist am 5' - Ende kovalent ein virales Protein (*genome-linked viral protein*, VPg; SIAW *et al.*, 1985; MURPHY *et al.*, 1991) an die RNA gebunden und am 3' - Ende ein poly(A) - Schwanz lokalisiert (HARI *et al.*, 1979; URCUQUI-INCHIMA *et al.*, 2001; s. Abb. 1.2).

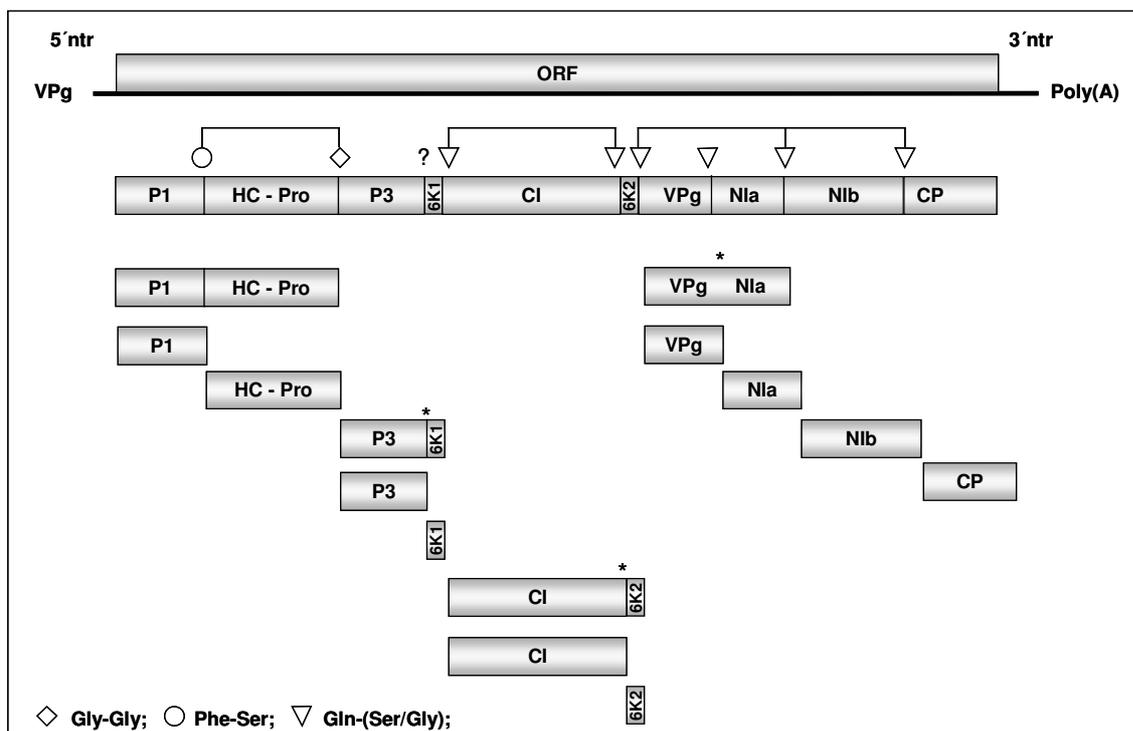


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Genomstruktur des einzelsträngigen (+) RNA Genoms des PVY mit Kennzeichnung der Proteinase - Schnittstellen und Angabe der kodierten Proteine

nr: nicht translatierbare Regionen; VPg: Virales genomgebundenes Protein; ORF: offenes Leseraster; P1: P1 Protein, HC-Pro: Helferkomponente Proteinase, P3: Protein 3, CI: Zylindrischer Einschlusskörper, 6K1 und 6K2: 6K Proteine, NIa: Kerneinschlusskörper a, NIb: Kerneinschlusskörper b, CP: Coat protein; (RIECHMANN *et al.*, 1992; REVERS *et al.*, 1999; RAJAMÄKI UND VALKONEN, 1999)

Funktion der einzelnen Proteine des PVY

Das Protein P1 am N - terminalen Ende des offenen Leserasters kodiert für eine Trypsin ähnliche Serin - Proteinase, die autoproteolytisch am C - terminalen Ende des P1 das Dipeptid Phe/Ser (VERCHOT *et al.*, 1991; MAVANKAL UND RHOADS, 1991) schneidet. Es weist eine unspezifische RNA Bindungsaktivität auf (BRANTLEY UND HUNT, 1993; SOUMOUNOU UND LALIBERTE, 1994; MERITS *et al.*, 1998) und stimuliert die Genomamplifikation in *trans* (VERCHOT UND CARRINGTON, 1995a, b). Des Weiteren verstärkt es die Aktivität der Helferkomponente Proteinase (HC-Pro; PRUSS *et al.*, 1997).

Das C - terminale Ende der HC-Pro stellt eine *cis* - aktive Proteinase des Cystein Typs dar und schneidet autoproteolytisch das Gly/Gly Motiv zwischen der HC-Pro und dem P3 (CARRINGTON *et al.*, 1989a, b; MAIA *et al.*, 1996).

HC-Pro war der erste identifizierte Suppressor des RNA Silencings (ANANDALAKSHMI *et al.*, 1998; KASSCHAU AND CARRINGTON, 1998; BRIGNETI *et al.*, 1998) und ist als dieser in der Lage, sowohl Transgen-, als auch Virus-induziertes Silencing in Tabak zu revertieren (PRUSS *et al.*, 1997; KASSCHAU UND CARRINGTON, 1998; RUIZ *et al.*, 1998), was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass die Akkumulation der siRNAs durch HC-Pro unterbunden wird (LLAVE *et al.*, 2000; MALLORY *et al.*, 2002; KASSCHAU *et al.*, 2003).

In Pflanzen werden durch HC-Pro Calmodulin verwandte Proteine (rgs - CaM) aktiviert, die wiederum einen endogenen Mechanismus der Pflanze anschalten, der die Silencing Aktivität negativ reguliert (SNEDDEN UND FROMM, 1998; ANANDALAKSHMI *et al.*, 2000). Dies führt in einzelnen Zellen u.U. zu einer verbesserten systemischen Ausbreitung und einer verstärkten und länger andauernden Virusreplikation (KLEIN *et al.*, 1994; CRONIN *et al.*, 1995; KASSCHAU *et al.*, 1997).

Die Ausbildung synergistischer Symptome, die in Mischinfektionen von Poty - und z.B. Potexviren (VANCE *et al.*, 1995; SHI *et al.*, 1997) vorkommen kann, wird ebenfalls auf die Suppressor Wirkung von HC-Pro zurückgeführt, da angenommen wird, dass durch die Unterdrückung des pflanzlichen Abwehrmechanismus (CARRINGTON UND WHITHAM *et al.*, 1998a), den heterologen Viren die Ausbreitung erleichtert wird.

Das N - terminale KITC - Motiv (REVERS *et al.*, 1999) und das im C - terminalen Bereich lokalisierte PTK Motiv der HC-Pro (GRANIER *et al.*, 1993) sind für die

Blattlausübertragung entscheidend (THORNBURY *et al.*, 1985), da sie für die Bindung an bisher nicht identifizierten Rezeptoren im Nahrungskanal von Blattläusen verantwortlich sind (BLANC *et al.*, 1998; RACCAH *et al.*, 2001).

P3 ist an der Replikation (KLEIN *et al.*, 1994), sowie der Symptomausprägung (RIECHMANN *et al.*, 1992; CHU *et al.*, 1997; SAENZ *et al.*, 2000; JENNER *et al.*, 2003) beteiligt.

Im C - Terminus des Polyproteins P3/6K1 sind beim *Plum pox virus* (PPV) die Pathogenitätsdeterminanten lokalisiert (SAENZ *et al.*, 2000). Weil es bei einer vollständigen Unterbindung der Prozessierung des Fusionsproteins nur zu einer latenten PPV Infektion kommt, wird eine Beteiligung des 6K1 an der Symptomausprägung angenommen (RIECHMANN *et al.*, 1995).

CI bildet die für Potyviren charakteristischen Einschlusskörper (LESEMANN, 1988) und ist an der Zell - zu - Zell Ausbreitung des RNA - Protein Komplexes beteiligt (CARRINGTON *et al.*, 1998b).

6K2 spielt eine Rolle für den intra- und interzellulären Transport der Potyviren (RAJAMÄKI UND VALKONEN, 1999; SPETZ UND VALKONEN, 2004), wobei eine proteolytische Separation eine Voraussetzung für die Replikation und Ausbreitung des PVA ist (MERITS *et al.*, 2002).

Der 3' - gelegene Sequenzbereich des Kerneinschlusskörpers a (NIa) kodiert für eine Proteinase (NIaPro; DOUGHERTHY UND PARKS, 1991; GARCIA *et al.*, 1992), die die Dipeptide Gln/Ser, Gln/Ala, Gln/Gly und in einigen Fällen Gln/Val sowie Glu/Ala, das intern zwischen der VPg- und der Proteinase- Domäne liegt, als Schnittstellen erkennt und für die restlichen in *cis* und in *trans* Prozessierungen verantwortlich ist (CARRINGTON AND DOUGHERTY 1987a, b ; CARRINGTON *et al.*, 1988; GARCIA *et al.*, 1990; DOUGHERTY UND PARKS, 1991; RIECHMANN *et al.*, 1992; ADAMS, 2005). Die Dipeptidsequenzen zwischen P3 und 6K1, CI und 6K2 sowie die internen NIa Schnittstellen werden dabei langsamer prozessiert als das NIb und CP (MERTIS *et al.*, 2002), so dass teilweise Fusionsproteine vorliegen, die andere Funktion als die Einzelproteine haben können (URCUQUI-INCHIMA *et al.*, 2001).

Das am N - terminalen Bereich des NIa lokalisierte VPg (NIaVPg; SHAHABUDDIN *et al.*, 1988; MURPHY *et al.*, 1990) des *Turnip Mosaic Virus* (TuMV) und *Lettuce Mosaic Virus* (LMV) interagiert spezifisch mit dem eukaryotischen

Initiationsfaktor eIF(iso)4E (WITTMANN *et al.*, 1997; DUPRAT *et al.*, 2002). Des Weiteren dient das VPg wahrscheinlich als eine Art Primer für die RNA Synthese des antisense Stranges (MURPHY *et al.*, 1990, 1996; RIECHMANN *et al.*, 1992; SCHAAD *et al.*, 1996; PUUSTINEN UND MÄKINEN, 2004). Neben dieser Rolle bei der Virusreplikation ist NIaVPg am Langstreckentransport des PVA beteiligt (RAJAMÄKI UND VALKONEN, 1999) und vermutlich durch Interaktion mit Wirtsfaktoren für die Wirtsspezifität ausschlaggebend (SCHAAD *et al.*, 1997).

Das unter den Potyviren am höchsten konservierte Protein ist das NIb, dem eine zentrale Rolle bei der Virusreplikation zukommt. Neben einer Bindungsstelle für RNA, weist die Sequenz ein GDD Motiv auf. Dieses ist charakteristisch für eine RNA abhängige RNA Polymerase (RdRp), deren Aktivität von HONG UND HUNT (1996) für TVMV gezeigt wurde.

CP ist das einzige Strukturprotein der Potyviren und dient im Wesentlichen der Enkapsidierung der viralen RNA. Es weist im zentralen Bereich hochkonservierte Regionen auf, die an der Ausbildung der Viruspartikel beteiligt sind (DOLJA *et al.*, 1995; VARRELMANN UND MAISS, 2000). Die relativ variablen N- und C-terminalen Enden sind an der Oberfläche der assemblierten Partikel lokalisiert. Der N-Terminus, in dem die virusspezifischen Epitope lokalisiert sind, ist sowohl entscheidend für eine systemische Ausbreitung des Virus (DOLJA *et al.*, 1994), als auch für eine effiziente Blattlausübertragung durch Interaktion des konservierten DAG - Motivs mit dem PTK - Motiv der HC-Pro (ATREYA *et al.*, 1991). Durch Interaktion mit dem GDD Motiv des NIb (TVMV; HONG *et al.*, 1995) wirkt das CP vermutlich replikationsregulierend (MAHAJAN *et al.*, 1996).

Auch für die nichttranslatierbaren Regionen am 5'- und 3'- Ende der viralen RNA konnte für TEV eine Beteiligung an der Replikation gezeigt werden (CARRINGTON UND FREED, 1990; LEVIS UND ASTIER-MANIFACIER, 1993; ORUETXEBARRIA UND VALKONEN, 2001; HALDEMAN-CAHILL *et al.*, 1998).

Wirtskreis, Übertragung und Bekämpfung des PVY

Neben der Kartoffel werden besonders in wärmeren Klimaten Pflanzenarten aus der Familie der *Solanaceae*, wie Tabak (*Nicotiana tabacum* L.), Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) und Paprika (*Capsicum* spp. L.) infiziert (EDWARDSON, 1974; DE BOKX UND HUTTINGA, 1981), aber auch einige

Pflanzenarten der Familien *Chenopodiaceae* und *Leguminosae* (THORNBERRY, 1966).

Auf der Basis lokaler und systemischer Symptomausprägungen in unterschiedlichen Kartoffelsorten und Indikatorpflanzen, wie *N. tabacum* "White Burley" und *N. tabacum* "Samsun NN", sowie *Physalis floridana* und anhand serologischer und molekularer Merkmale werden im Wesentlichen drei PVY - Stämme unterschieden (BEEMSTER UND DE BOKX, 1987):

- PVY^O ("*ordinary strain*") bezeichnet den "gewöhnlichen" Stamm, der erstmalig 1931 von SMITH beschrieben wurde und die so genannte Strichelkrankheit hervorruft. Er ist weltweit in allen Kartoffel - Anbaugebieten vertreten und verursacht in anfälligen Sorten als Primärinfektion ein leichtes bis schweres Mosaik, eine schwere systemische Kräuselung der Blätter sowie Blatteinsenkungen. Der Begriff Strichelkrankheit leitet sich aus den primären Symptomen auf der Blattunterseite ab, die in Form von "Tintenspritzern" erscheinen, aus denen sich im Verlauf Nekrosen entwickeln, so dass letztendlich die Blätter abfallen. Pflanzen mit Sekundärinfektionen sind meist gestaucht und zeigen ein schweres Mosaik und starke Kräuselung der Blätter, sowie Blatt- und Stammnekrosen.

In *P. floridana* werden nach einer PVY^O - Infektion systemische Nekrosen ausgebildet, in Tabak ein systemisches Mosaik.

- PVY^C ("*stipple streak strain*") ist in Europa, Indien, Neuseeland, Australien, Nord- und Südamerika verbreitet. Die Pflanzen der meisten Kartoffelsorten reagieren mit einer hypersensitiven Reaktion auf eine Infektion (DE BOKX UND HUTTINGA, 1981; JONES, 1990; VALKONEN *et al.*, 1996). Anfällige Sorten, *P. floridana* und Tabak zeigen hingegen ein ähnliches Mosaik wie Pflanzen, die mit dem PVY^O Stamm infiziert sind.
- PVY^N ("*veinal necrosis strain*") wird seit 1950 in Europa, Nord- und Südamerika, Neuseeland sowie Teilen von Afrika detektiert. Kartoffelpflanzen werden latent befallen oder reagieren auf eine Infektion mit einem leichten bis schweren Mosaik. Auf *P. floridana* entwickelt sich ein schweres systemisches Mosaik und in Tabakpflanzen kommt es zur Ausbildung schwerer Adernekrosen, die zu einem Absterben der Blätter führen. PVY^N wird als Erreger der schweren Epidemien in den 50er und

70er Jahren angesehen, wodurch seine große wirtschaftliche Bedeutung eindrucksvoll verdeutlicht wird.

In den letzten Jahren sind neue Varianten des PVY^N Stammes aufgetreten. 1984 wurde in Polen PVY^{NW} entdeckt, was als virulenter und aggressiver beschrieben wird als die älteren PVY^N - Isolate (CHRZANOWSKA, 1991). Durch serologische Untersuchungen wurde gezeigt, dass PVY^{NW} mit PVY^O verwandt ist (CHRZANOWSKA, 1994), wobei GLAIS *et al.* (2002) aufgrund der phylogenetisch engen Verwandtschaft postulieren, dass PVY^{NW} durch Rekombinationsereignisse der Stämme PVY^O und PVY^N entstanden sein muss. Zwei weitere westeuropäische Isolate, PVY^Z und PVY^{ZE} (KERLAN *et al.*, 1999), werden ebenfalls als Pathotypen der Stämme PVY^N und PVY^O beschrieben (BLANCO-URGOITI *et al.*, 1998; GLAIS *et al.*, 2002).

1984 wurde aus Ungarn zum ersten Mal von BECZNER *et al.* von einem Isolat berichtet, das als PVY^{NTN} bezeichnet wird und sich in den letzten zehn Jahren über ganz Europa ausgebreitet hat (KUS, 1995; SINGH *et al.*, 1998; BLANCO-URGOITI *et al.*, 1998; KERLAN *et al.*, 1999). Da es serologisch nicht von dem N - Stamm unterschieden werden kann, wurde es als dessen Pathotyp angesehen (VAN DEN HEUVEL *et al.*, 1994a; BLANCO-URGOITI *et al.*, 1998). GLAIS *et al.* (2002) nehmen allerdings für dieses europäische NTN - Isolat an, dass es aus einer Rekombination der Stämme N und O resultiert. Ein weiteres NTN - Isolat hingegen, welches sich in Kanada ausbreitet (MCDONALD UND SINGH, 1996; SINGH *et al.*, 1998), soll aus einer Genommutation des PVY^N Stammes resultieren (NIE UND SINGH, 2003).

Heute wird PVY^{NTN} neben PVY^O, PVY^C und PVY^N als vierte Stammgruppe bezeichnet (LANDSMANN, 2000). Während an Tabak die gleichen Symptome wie durch eine PVY^N Infektion hervorgerufen werden, verursacht PVY^{NTN} im Gegensatz zu den Stämmen N und O in Kartoffelpflanzen starke Nekrosen an den Knollen (s. Abb. 1.3; LE ROMANCER UND NEDELLEC, 1994).



Abb. 1.3 Symptome des PVY^{NTN} an der Kartoffelknolle (SCHUCHERT *et al.*, 1996)

Aufgrund dieser Symptome spricht man von der nekrotischen Ringflecken - Krankheit der Kartoffelknollen (potato tuber necrotic ringspot disease = PTNRD; VAN DEN BOVENKAMP, 1992). Die Nekrosen entwickeln sich vor allem während der Lagerung (LE ROMANCER UND NEDELLEC, 1994) und ein Befall von nur 20% der Knollen macht diese unverkäuflich (SCHUCHERT *et al.*, 1996). Da gegen den N - Stamm resistente Sorten auf eine Infektion mit dem NTN - Stamm anfällig reagieren können (COMMITTEE FOR TRADE, INDUSTRY AND ENTERPRISE DEVELOPMENT, 2004), stellt der NTN - Stamm eine besondere Gefahr für die Anbauer dar.

PVY wird nicht persistent von ca. 25 Aphiden - Arten übertragen, wobei die Grüne Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae* Sulz.) nach VAN HOOF (1980) den effektivsten Überträger darstellt. Die Viruspartikel haften schon nach kurzen Saugzeiten (optimal 30 sec bis 5 min; BRADLEY UND RIDEOUT, 1953; EASTON *et al.*, 1958) in der Blattepidermis (PIRONE UND HARRIS, 1977) an den Mundwerkzeugen der Aphiden. Da auch die Inokulation bei Saugtätigkeiten innerhalb von 30 - 60 sec stattfinden kann (BRADLEY UND RIDEOUT, 1953), ist die Bekämpfung der Überträger mit systemischen oder Kontakt - Insektiziden sowie Mineralöl unwirksam, da diese nicht schnell genug wirken (TIILIKKALA, 1987; WEIDEMANN, 1988). Zusätzlich führen die Aphiden, durch die Spritzungen angeregt, meist mehrere Probestiche aus, wodurch es zu einer vermehrten Virusaufnahme und -Inokulation und somit durch die Spritzung eher zu einer verstärkten Ausbreitung von PVY im Bestand kommt (SCHEPERS *et al.*, 1984). Darum stehen zur Bekämpfung der Vektoren nur vorbeugende Maßnahmen zur Verfügung, wie z.B. die Bepflanzung des Ackerrandstreifens mit Nicht - Wirtspflanzen, wie Weizen oder Soja. Durch diese kann die PVY Übertragung durch einfliegende Aphiden um bis zu 60% verringert werden, da die Aphiden auf diesen Pflanzen ihre Mundwerkzeuge von dem nicht persistenten PVY reinigen können. Daneben wird der Anbau von zertifizierten virusfreien Pflanzkartoffeln bzw. resistenten Sorten empfohlen.

Beispiele, bei denen mit PVY abgeleiteten Sequenzen eine RNA vermittelte Virusresistenz in Pflanzen etabliert werden konnte, sind in Tab. 1.2 zusammengefasst.

Tab. 1.2 Übersicht der RNA vermittelten Resistenzen gegen PVY

PVY - Protein	Pflanze	Länge der kodierenden Sequenz	Referenz
CP	Tabak	gesamt	VAN DER VLUGT <i>et al.</i> , 1992
		gesamt	HAN <i>et al.</i> , 1999
		gesamt	GUO <i>et al.</i> , 2003
		605 bp vom 3' Ende als IR*	MISSIOU <i>et al.</i> , 2004
		202-603 bp	ZHU <i>et al.</i> , 2004
	gesamt	SMITH <i>et al.</i> , 1994	
	Kartoffel	gesamt	HASSAIRI <i>et al.</i> , 1998
gesamt		SCHUBERT <i>et al.</i> , 2004	
P1	Kartoffel	gesamt	PEHU, 1995
		gesamt	MAEKI-VALKAMA <i>et al.</i> , 2000
Nla	Tabak	NlaPro (700 bp als IR*)	SMITH <i>et al.</i> , 2000
		Nla (735 bp als IR*)	MITTER <i>et al.</i> , 2001

* IR = *inverted repeat*

Potato leafroll virus (PLRV)

PLRV gehört zur Familie der *Luteoviridae* (D'ARCY *et al.*, 2000) und stellt den Typstamm des Genus *Polevirus* dar. Es wurde 1916 erstmals von QUANJIER *et al.* in *Solanum tuberosum ssp. tuberosum* beschrieben. Weltweit verursacht es in den Kartoffelanbaugebieten schwere Schäden (ROBERT UND LUMAIRE, 1999), die zu Ertragseinbußen bis zu 80 - 90% führen (LANDSMANN, 2000), die in Mischinfektionen mit PVX oder PVY zu einem Totalausfall der Kartoffelernte führen können (MATTHEWS 1982). Nach der Pflanzkartoffelverordnung wird es ebenso wie PVY als schweres Virus eingestuft (BGBL. Teil I, Nr. 61, 2004).

Genomstruktur des PLRV

Die isometrischen Partikel des PLRV haben einen Durchmesser von 24 nm (PETERS, 1967; TAKANAMI UND KUBO, 1979) und kommen ausschließlich in den Siebröhren und den Geleitzellen der Pflanzen vor. Im Zytoplasma des Phloemparenchyms und der Geleitzellen kommt es zur Zusammenlagerung der Virionen in unstrukturierten Aggregaten, während in den Zellvakuolen kristalline Zusammenschlüsse auftreten (ARAI *et al.*, 1969; KOJIMA *et al.*, 1969).

Das Genom wird von einer einzelsträngigen Sinnstrang RNA gebildet, die 5882 Nukleotide umfasst und an beiden Enden von nicht translatierbaren Bereichen

flankiert wird. Am 5' Ende ist ein VPg kovalent an die RNA gebunden (MAYO *et al.*, 1989), während am 3'- Ende ein poly(A) - Schwanz fehlt (MAYO *et al.*, 1982). Die RNA kodiert vermutlich für acht offene Leserahmen (s. Abb. 1.4; ASHOUB *et al.*, 1998), die durch eine kleine intergenische Region in zwei Gruppen geteilt werden, von denen die im 5' - Bereich gruppierten ORF0 - ORF2, im Gegensatz zu den am 3' - Ende lokalisierten ORF3 - ORF5, eine relativ hohe Sequenzvariabilität in den einzelnen Isolaten der Viren des Genus *Polerovirus* aufweisen. Die konserviertesten Bereiche liegen im ORF3 und 4 (GUYADER UND DUCRAY, 2002)

Die drei ORFs 0, 1 und 2 werden von der genomischen RNA translatiert. Die ersten neun Nukleotide der 5' gelegenen nicht translatierbaren *Leader* Sequenz dieser genomischen RNA entsprechen denen der polyzistronischen subgenomischen RNA1 (sgRNA1; s. Abb. 1.4; TACKE *et al.*, 1990; MILLER *et al.*, 1995; MAYO UND ZIEGLER-GRAFF, 1996; MAYO UND MILLER, 1999), nach deren Transkription die ORF3, ORF3/5 und ORF 4 exprimiert werden können (BARKER *et al.*, 1992). Die ORF 6 und 7 werden an der subgenomischen bizistronischen RNA2 translatiert (ASHOUB *et al.*, 1998).

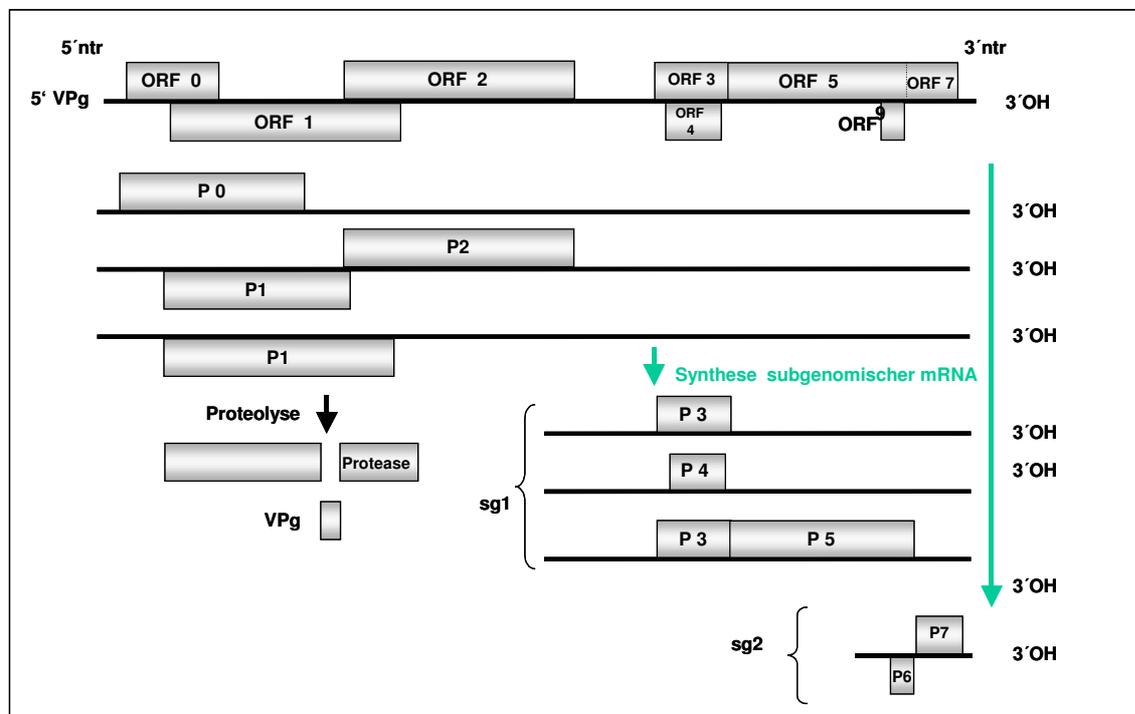


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der Genomstruktur des einzelsträngigen (+) RNA Genoms des PLRV mit Darstellung der subgenomischen RNAs und Angabe der einzelnen Proteine

VPg: Virales genomgebundenes Protein; ORF: offenes Leseraster; P: Bezeichnung für Protein; sg: subgenomische RNA (nach TALIANSKY *et al.*, 2003)

Funktionen der Proteine des PLRV

P0, das Translationsprodukt des ORF0, welches in Pflanzen aufgrund eines suboptimalen Kontextes des Translationstartkodons kaum akkumuliert (BWYV), wirkt als Suppressor des *gene silencings* (PFEFFER *et al.*, 2002). Es ist an der Symptomausprägung beteiligt (VAN DER WILK *et al.*, 1997) und für die Akkumulation und Replikation des PLRV notwendig (SADOWY *et al.*, 2001a).

Der ORF1 kodiert ein Polyprotein (P1), dessen zwei funktionelle Proteine Proteinase und VPg (MAYO UND ZIEGLER - GRAFF, 1996), durch proteolytische Spaltung prozessiert werden (s. Abb. 1.4; VAN DER WILK *et al.*, 1997; PRÜFER *et al.*, 1999; SADOWY *et al.*, 2001b). Des Weiteren kodiert der ORF1 das für die Replikation des PLRV essentielle 5 kDa Protein (*replication associated protein; Rap1*), dessen Translation durch eine interne ribosomale Bindungsstelle (*internal ribosomal entry site; IRES*) reguliert wird. Durch ein sogenanntes *leaky scanning* übergeht der Translationskomplex das erste AUG Startkodon (AUG) und beginnt die Synthese erst am Translationsstart dieses *Rap1* Proteins (KOZAK, 1989).

Durch einen seltenen, ribosomalen (-1) Leserasterwechsel im 582 Nukleotide überlappenden Bereich von ORF1 and ORF2 erfolgt die Translation des P2 (PRÜFER *et al.*, 1992; KUJAWA *et al.*, 1993), das mit dem P1 einen Teil des Replikationskomplexes darstellt und das für die RdRp charakteristische GDD Motiv aufweist (HABILI UND SYMONS, 1989).

Das 23 kDa große P3 stellt die Hauptform des CP dar, wobei durch "Überlesen" des UAG - Stoppkodons ("*read through*") das Fusionsprotein P3/P5 mit einer Größe von 80 kDa gebildet wird, welches die Nebenform des CP darstellt (TACKE *et al.*, 1990; BAHNER *et al.*, 1990).

P5 spielt eine entscheidende Rolle bei der Blattlausübertragung (BRAULT *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1995; TALIANSKY *et al.*, 2003), da es *in vitro* mit Symbionin assoziiert ist, das von dem endosymbiontischen Bakterium (*Buchnera* sp.) des Vektors *M. persicae* produziert wird. Das Symbionin bindet vermutlich an einen *loop*, der durch bestimmte Aminosäurereste auf der Oberfläche des P5 ausgebildet wird (LEE *et al.*, 2002), wodurch die PLRV Partikel vor einer Proteolyse in der Hämolymphe der Aphiden geschützt werden (VAN DEN HEUVEL

et al., 1994b, HOGENHOUT *et al.*, 1998). Des Weiteren ist P5 an der systemischen Ausbreitung in der Pflanze (NURKIYANOVA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2002) beteiligt. Innerhalb des ORF3 liegt in einem anderen Leseraster ein Startkodon (AUG) vor, das den Translationsstart für das virale Movement Protein P4 darstellt (TACKE *et al.*, 1990, 1993; SCHMITZ *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2002), das zumindest beim *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) für eine wirtsspezifische Ausbreitung verantwortlich ist (ZIEGLER - GRAFF *et al.*, 1996).

Über die Funktionen des P6 und des P7 ist bislang wenig bekannt, wobei im P7 eine Nukleinsäure bindende Domäne nachgewiesen wurde und eine Transkriptions - regulierende Funktion angenommen wird (ASHOUB *et al.*, 1998).

Wirtskreis, Übertragung und Bekämpfung des PLRV

Neben ca. 20 Pflanzenarten aus der Familie der *Solanaceae* können auch einige Arten aus den Familien *Amaranthaceae*, *Nolanaceae* (NATTI *et al.*, 1953), *Cruciferae* (HELSON UND NORRIS, 1943) und *Portulacaceae* (TAMADA *et al.*, 1984) mit PLRV infiziert werden.

Eine Infektion mit PLRV führt in Kartoffelpflanzen zu einer Vergilbung der Interkostalflächen, einem Rollen der Blätter und einem reduzierten Wachstum. Da der Assimilattransport im Phloem durch Nekrotisierung limitiert wird, kommt es zur Anreicherung von Stärke in den Blättern, die dadurch verhärten und brüchig werden (LANDSMANN, 2000). Wie beim PVY werden die schwachen Symptome der Primärinfektion, in Form von Blässe und Rötung der Blattspitzen leicht übersehen. Durch die Überdauerung von PLRV in den Knollen resultieren dann im Folgejahr schwerere Sekundärinfektionen, die in Form starker Stauchungen und einem Aufwärtsrollen der Blätter sichtbar werden.

Das nicht mechanisch übertragbare PLRV wird im Bestand von mehr als zehn Aphiden Arten (KENNEDY *et al.*, 1962) in persistenter, nicht propagativer Weise übertragen. Dabei gilt *M. persicae* Sulz., wie für PVY, als effektivster Überträger (HARRISON, 1984). Die Übertragung gliedert sich in eine ca. einstündige Aquisitionszeit, die die Laus benötigt, um die Phloemzellen zu penetrieren und die dort lokalisierten Viruspartikel aufzunehmen und eine ca. zwölfstündige Latenzphase (ROCHOW, 1963; ELNAGAR UND MURANT, 1978; DUFFUS *et al.*, 1997). In dieser gelangen die Viruspartikel, durch das Darmepithel in die Hämolymphe und von dort in die Speicheldrüse der Laus (GARRET *et al.*, 1993).

Bei erneuter Saugtätigkeit der Laus können die Viruspartikel dann mit dem Speichelfluss übertragen werden (GILDOW *et al.*, 2000). Die gesamte Dauer der Aquisitions- und Latenzzeit bis zur erneuten Übertragung beträgt zwischen 12 und 24 h (SUGAWARA *et al.*, 1974), in denen effektiv Insektizide zur Bekämpfung der Vektoren eingesetzt werden können. Weitere Möglichkeiten der PLRV Kontrolle bestehen in der Verwendung von zertifizierten Pflanzkartoffeln oder resistenten Sorten.

Eine RNA vermittelte PLRV Resistenz wurde in Kartoffelpflanzen sowohl durch die Verwendung der gesamten kodierenden Sequenz des ORF2 (Replikase) (EHRENFELD *et al.*, 2004; VAZQUEZ-ROVERE *et al.*, 2001; THOMAS *et al.*, 2000), als auch durch den Einsatz Hüllprotein abgeleiteter Sequenzen etabliert (PAŁUCHA *et al.*, 1998).

Potato virus X (PVX)

PVX gehört zur Familie der *Flexiviridae* und stellt den Typstamm des Genus *Potexvirus* dar. Es wurde erstmals 1931 von SMITH in *Solanum tuberosum* beschrieben und verursacht weltweit in den Kartoffelanbaugebieten Ernteauffälle von 10 - 20 % (BODE UND KLOINKOWSKI, 1968).

Genomstruktur des PVX

PVX - Partikel liegen in Form flexibler filamentöser Fäden mit einer Länge von 515 nm und einem Durchmesser von 13 nm vor (BRANDES, 1964). Das Capsid ist aus ca. 1270 identischen Proteinunterheiten zusammengesetzt und weist eine helikale Symmetrie auf.

Die Partikel, die vermehrt im Mesophyllgewebe und weniger in der Epidermis infizierter Pflanzen auftreten, sind meist zu großen Aggregaten zusammengelagert. Liegen die flexiblen Fäden in einer parallelen Anordnung vor, erscheinen diese in faserförmiger Struktur (LESEMANN, 1988), während die Aggregate bandartig erscheinen, wenn die Partikel hintereinander angeordnet sind (APPIANO UND PENNAZIO, 1972; CHRISTIE UND EDWARDSON, 1977).

Die einzelsträngige Sinnstrang RNA hat eine Länge von 6435 Nukleotiden und kodiert für fünf ORF (HUISMAN *et al.*, 1988; SKRYABIN *et al.*, 1988a). Neben nicht translatierbaren Bereichen an beiden Enden befindet sich am 5' - Ende ein m⁷GpppG - *cap* (SONENBERG *et al.*, 1978) und am 3' - Ende ein poly(A) - Schwanz (MOROZOV *et al.*, 1981).

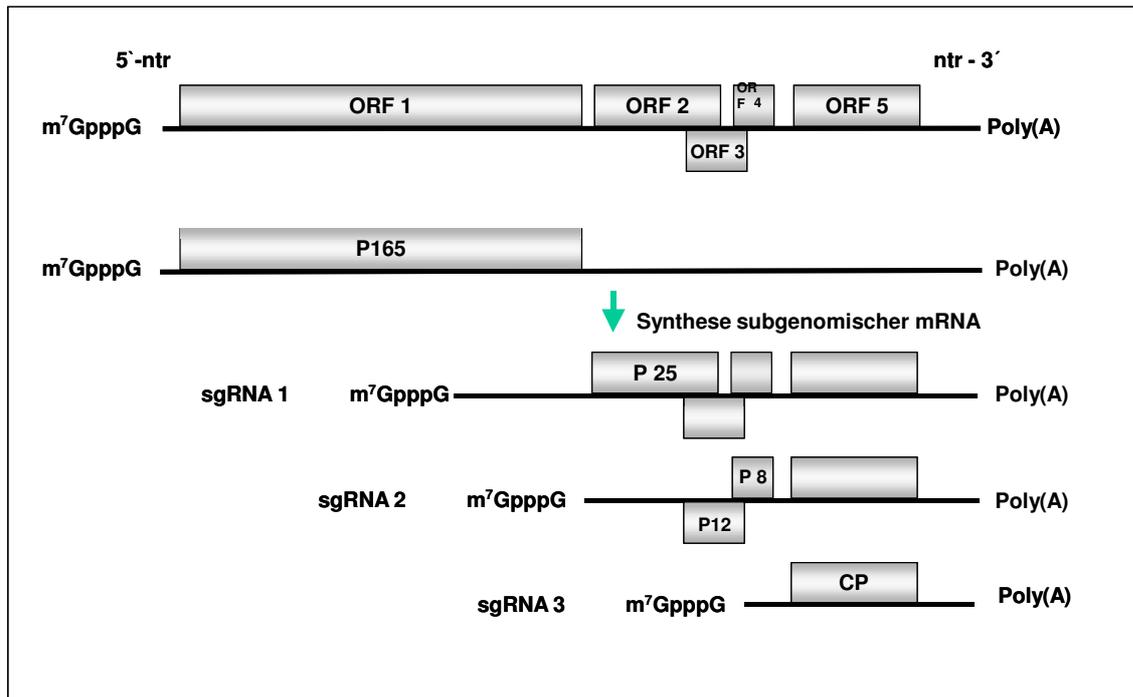


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Genomstruktur des einzelsträngigen (+) RNA Genoms des PVX mit Darstellung der subgenomischen RNAs und Angabe der einzelnen Proteine

sgRNA: subgenomische RNA; m⁷GpppG: cap - Struktur

Funktion der einzelnen Proteine des PVX

Das nichttranslatierbare 5' - Ende des Genoms beeinflusst die Akkumulation der genomischen und subgenomischen RNAs (KIM UND HEMENWAY, 1996; MILLER *et al.*, 1998) durch eine acht Nukleotide umfassende Sequenz, die an fünf Stellen mit der RNA in *cis* interagieren kann (KIM UND HEMENWAY, 1999).

Der ORF1 wird direkt von genomischer RNA translatiert, zeigt das für die RdRp typische GDD - Motiv, sowie ein GKS - Motiv, das wahrscheinlich für die Bindung der RNA und somit den Start der Replikation entscheidend ist (DAVENPORT UND BAULCOMBE, 1997).

Der ORF2, ORF3 und ORF4 bilden den *triple gene block* (TGB), dessen Proteine 25K, 12K und 8K an der Zell-zu-Zell Ausbreitung beteiligt sind (BECK *et al.*, 1991; ANGELL *et al.*, 1996). Die Expression dieser Proteine erfolgt an zwei unterschiedlichen sgRNAs (s. Abb. 1.5), die unterschiedlich stark transkribiert werden (MOROZOV *et al.*, 1991; VERCHOT *et al.*, 1998).

Das 25K (ORF2) akkumuliert stark im Innern der Plasmodesmata infizierter Zellen (DAVIES *et al.*, 1993) und induziert dadurch eine Vergrößerung ihrer Ausschlussgrenze (*size exclusion limit*; SEL; Angell *et al.*, 1996). Des Weiteren

verhindert 25K als Suppressor des *Silencings* die Akkumulation oder den Transport des systemischen Signals (VOINNET *et al.*, 2000).

Die Transportproteine 12K (ORF3) und 8K (ORF4) (SKRYABIN *et al.*, 1988b), verankern sich vermutlich über ein Transmembran - Segment (MOROZOV *et al.*, 1987, 1991; SEPÄNNEN *et al.*, 1997) und ermöglichen durch eine mutmaßliche Interaktion mit dem 25K und dem CP den Transport der viralen RNA in benachbarte Zellen (MOROZOV *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2000).

Das Translationsprodukt des ORF 5, das CP, dient der Enkapsidierung und ist an der Ausbreitung des Virus (CHAPMAN *et al.*, 1992; OPARKA *et al.*, 1996) beteiligt. Dabei steuert das CP vermutlich die Bildung des Transportkomplexes aus RNA, 25K und CP (CRUZ *et al.*, 1998; LOUGH *et al.*, 1998, 2000; ATABEKOV *et al.*, 2000).

Die 3' gelegene nichttranslatierbare Sequenz umfasst ein acht Nukleotid langes Uracil - reiches Motiv, das an der Replikation beteiligt ist, wobei der Bindung von Wirtsproteinen scheinbar eine entscheidende Rolle zukommt (SRISKANDA *et al.*, 1996).

Wirkreis, Übertragung und Bekämpfung des PVX

PVX kann mehr als 240 Arten aus 16 Familien infizieren, wobei hauptsächlich Arten der Familie der *Solanaceae* befallen werden (PURCIFULL UND EDWARDSON, 1981).

Die durch PVX Infektionen hervorgerufenen Symptome variieren sehr stark. Am häufigsten wird in Kartoffelpflanzen ein mildes Mosaik auf den Blättern beobachtet, allerdings werden einige Kartoffelsorten auch nur latent infiziert, während anderen Sorten mit der Ausbildung nekrotischer Strichel reagieren.

In Tabak verursacht PVX Scheckungen oder nekrotische Flecken. Tomatenpflanzen zeigen ein Mosaiksymptom und sind leicht gestaucht. In allen drei Wirten nimmt die Ausprägung der Symptome zu, wenn Mischinfektionen mit z.B. Potyviren vorliegen (BODE UND KLINKOWSKI, 1968; KLINKOWSKI UND USCHDRAWIT, 1968). GONZALES-JARA *et al.* (2004) haben durch Mischinfektionen in *N. tabacum* und *N. benthamiana* gezeigt, dass die Symptome in beiden Pflanzen nach PVX und PVY Koinfektion verstärkt werden. Während die Akkumulation von PVX in den *N. benthamiana* genauso hoch war wie in den ausschließlich mit PVX infizierten Kontrollpflanzen, nahm der PVX

Gehalt in den *N. tabacum* Pflanzen drastisch zu, woraus die Autoren schließen, dass der synergistische Effekt bei einer PVX/PVY Mischinfektion abhängig von der Wirtspflanze ist.

PVX wird hauptsächlich mechanisch übertragen, aber auch der Bodenpilz *Synchytrium endobioticum* (NIENHAUS UND STILLE, 1965) und die Grashüpfer *Melanopus differentialis* (WALTERS, 1952) und *Tettigonia viridissima* (SCHMUTTERER, 1960) sind als Vektoren beschrieben worden.

Zur Kontrolle von PVX Infektionen stehen resistente Kartoffelsorten zur Verfügung, die mit Hilfe von dominanten Resistenzgenen erzeugt werden. Im Gegensatz zu den *Nx* und *Nb* - Genen, die eine hypersensitive Reaktion auslösen und durch Ausbildung von Nekrosen das infizierende Virus nur in einem lokal begrenzten Bereich replizieren kann, verleihen die Gene *RX_{adg}* und *RX_{acl}* eine extremere Resistenz, bei der keine Replikation des Virus in der Pflanze nachweisbar ist. Letztere wirkt gegen alle vier Gruppen, in die die PVX Isolate aufgrund ihrer Reaktion auf die Resistenzgene eingeordnet werden (COCKERHAM, 1955, 1970). Die unterschiedlichen Resistenzen in verschiedenen Kartoffelsorten, werden weltweit effektiv zur Kontrolle von PVX eingesetzt und konnten bisher nur von einem südamerikanischen Isolat (PVX^{HB}) gebrochen werden (MOREIRA *et al.*, 1980).

Da aufgrund der Komplexität des Kartoffelgenoms die Züchtung relativ langwierig und schwierig ist, wird heute versucht resistente Pflanzen nach dem Modell der Pathogen abgeleiteten Resistenz (PDR) herzustellen. So demonstrierten BRAUN UND HEMENWAY (1992), dass Tabakpflanzen, die mit einem ca. 2100 bp großen Fragment aus dem 5' gelegenen Bereich des ORF1 transformiert wurden, resistent gegen eine PVX Infektion waren. Auch LONGSTAFF *et al.* (1993) und MUELLER *et al.* (1995) konnten durch Verwendung der gesamten RdRp kodierenden Sequenz eine RNA vermittelte PVX Resistenz in Tabakpflanzen etablieren. Durch die Verwendung Hüllprotein abgeleiteter Sequenzen wurde bislang noch keine PVX resistente Pflanze erzeugt.

Charakteristika Virusresistenz vermittelnder Konstrukte

Heute gibt es etliche Beispiele, wie mit verschiedensten Protein - kodierenden Sequenzen von Viren unterschiedlicher Genera eine RNA vermittelte Resistenz in Pflanzen etabliert werden konnte. Neben den Beispielen für die in dieser Arbeit verwendeten Kartoffelviren, wurden die Ergebnisse der folgenden

Untersuchungen in die Erstellung für das Design Resistenz vermittelnder Konstrukte mit einbezogen.

PANG *et al.* (1997) zeigten, dass es mit viral abgeleiteten N - Gen kodierenden Sequenzen des *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in *N. benthamiana* möglich war, eine RNA vermittelte Resistenz zu etablieren, wenn das Fragment länger als 378 bp war. Kleinere Fragmente (92 bp - 235 bp) führten nur zu einer Resistenz, wenn sie transkriptionell an ein Markergen (*green fluorescent protein*; GFP), das als sogenannte *silencer* DNA agiert, fusioniert worden waren.

Durch die Einführung mehrerer translatierbarer N - Gen kodierender Sequenzen unterschiedlicher Tospoviren konnten PRINS *et al.* (1995) eine Immunität gegen diese Tospoviren in Pflanzen etablieren.

Aus diesen Untersuchungen wurden folgende Anforderungen für den Aufbau Resistenz vermittelnder Konstrukte abgeleitet:

- Mit den gesamten CP kodierenden Sequenzen des PVY und PLRV war es möglich, eine RNA vermittelte Virusresistenz in Pflanzen zu etablieren
- Mit der Replikase kodierenden Sequenz des PVX konnte eine Resistenz erreicht werden, wodurch für dieses Virus gezeigt wurde, dass es grundsätzlich möglich ist, eine RNA vermittelte Virusresistenz in Pflanzen zu etablieren
- Die minimale Länge viral abgeleiteter Sequenzen, die in einzelsträngigen Sinnstrang Konstrukten zu einer RNA vermittelten Resistenz führt, liegt bei Tospoviren zwischen 235 und 387 bp
- Durch Fusion an eine *silencer* DNA kann auch mit kürzeren Proteinkodierenden Sequenzfragmenten (92 - 235 bp) eine RNA vermittelte Virusresistenz in Pflanzen etabliert werden
- Durch Expression von N - Gensegmenten unterschiedlicher Tospoviren kann eine multiple Virusresistenz in Pflanzen etabliert werden.

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden weitere Erkenntnisse über die Erstellung effektiver Konstrukte gewonnen, die Einfluss auf die praktische Umsetzung genommen haben. Z. B. zeigten SMITH *et al.* (2000), dass durch die Anordnung von 700 bp langen NIaPro abgeleiteten Sequenzen in Form eines *inverted repeats* (IR), der durch ein selbstspleißendes Intron getrennt war, in 100% der getesteten Pflanzen eine Resistenz etabliert werden konnte.

ZIELSETZUNG

In Rahmen dieser Arbeit sollten unterschiedliche Aspekte einer RNA vermittelten Resistenz gegen kartoffelinfizierende Viren in transgenen Pflanzen untersucht werden.

Das Hauptziel bestand in der Analyse der Korrelation zwischen der DNA Methylierung einer Virus - abgeleiteten, transgenen Sequenz und der Resistenz in *N. benthamiana* Pflanzen. Dazu musste zunächst die Voraussetzung in Form resistenter *N. benthamiana* Pflanzen geschaffen werden. Diese sollte durch die Expression nicht translatierbarer Sequenzen aus der Zentralregion des CP wirtschaftlich bedeutender Kartoffelviren in Form RNA vermittelter Resistenz etabliert werden. Da dafür unterschiedliche Ansätze verfolgt werden sollten, galt es die Antworten auf folgende Fragen hinsichtlich des Resistenzphänomens experimentell zu erarbeiten:

1. Wird durch die Länge integrierter Pathogensequenzen in einzelsträngigen Sinnstrang Konstrukten die Resistenzausprägung beeinflusst?
2. Kann durch das Einfügen zehn synthetischer CG Nukleotide an unterschiedlichen Positionen der transgenen Sequenz der Grad der DNA Methylierung beeinflusst werden und ändert sich dadurch das Resistenzverhalten der Pflanzen?
3. Wird durch die Verlängerung von PVY CP Fragmenten mit Hüllprotein abgeleiteten Sequenzen von Viren aus anderen Familien die Ausprägung der pflanzlichen Resistenz verändert?
4. Kann mit einem Transformationskonstrukt eine multiple Virusresistenz durch die Integration von Hüllproteinsequenzen unterschiedlicher Viren in *N. benthamiana* Pflanzen erzeugt werden?
5. Korreliert der Grad der DNA Methylierung der transgenen Sequenz mit einer RNA vermittelten Virusresistenz?

2 MATERIAL

In diesem Abschnitt werden die verwendeten Geräte, Pflanzen, Produkte und Plasmide, die bei den durchgeführten Verfahren eingesetzt wurden, aufgeführt.

2.1 BIOLOGISCHES MATERIAL

2.1.1 Pflanzenmaterial

Nicotiana benthamiana L. 17.27.1

Alle Arbeiten und Transformationen wurden mit der Linie 17.27.1 durchgeführt. Diese Linie hat die Gewebekultur, Pflanzentransformation und Regeneration durchlaufen, ist aber nicht transgen (TIMPE *et al.*, 1992).

2.1.2 Viren

Tab. 2.1 Auflistung der verwendeten Viren, der Erhaltungswirte, der verwendeten Abkürzungen und Angaben zu ihrer Herkunft

Name	Erhaltungswirt	Abkürzung	Herkunft
<i>Potato leafroll virus</i>	<i>N. benthamiana</i>	PLRV	COMMANDEUR UND MARTIN, 1993
<i>Potato virus X</i>	<i>N. benthamiana</i>	PVX	DSMZ: PV-0014 und PV-0018
<i>Potato virus Y</i> , Stamm NTN	<i>N. benthamiana</i> <i>N. tabacum</i> cv. <i>Xanthi</i> <i>nc.</i>	PVY	DSMZ: PV-0403

2.1.3 Viraler Vollängen - Klon

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *A. tumefaciens* - Stamm ATHV verwendet, der mit einem rekombinanten binären Plasmid (p388 s. Tab. 2.4) transformiert worden ist. Auf diesem Plasmid steht die gesamte Länge der PLRV kodierenden Sequenz (Volle Längen Klon, VLK) unter Kontrolle des verdoppelten 35S Promotors des *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) und dessen Polyadenylierungssignals (beschrieben bei COMMANDEUR UND MARTIN, 1993; schematische Darstellung s. 8.1 im Anhang).

2.1.4 Antiseren

Tab. 2.2 Auflistung und Beschreibung der verwendeten Antiseren mit Angabe der Bezugsquellen

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
Anti - Digoxigenin AP - Konjugat	Fab Fragment	Roche Diagnostics
Anti rabbit IgG AP Konjugat	polyklonale Antiseren ex rabbit	Sigma
MAk5G4 (BLRV)	monoklonales Antiserum ex mouse	DSMZ (KATUL,1992)
PLRV für ELISA	polyklonale Antiseren ex rabbit, DAS - ELISA Set	LOEWE Biochimica
PVX - IgG / PVX - IgG - AP	polyklonale Antiseren ex rabbit, DAS - ELISA Set	LOEWE Biochemica
PVY - IgG / PVY - IgG - AP	polyklonale Antiseren ex rabbit, DAS - ELISA Set	LOEWE Biochemica
RAM - AP	polyklonales Antiserum Rabbit anti - mouse	DSMZ

AP: gekoppelt mit alkalischer Phosphatase

2.1.5 Bakterienstämme

Tab. 2.3 Auflistung der verwendeten Bakterienstämme, mit Angaben ihrer Charakteristika und Bezugsquellen

Art, Gattung	Bezeichnung	Genotyp / Referenz	Bezugs - quelle
<i>A. tumefaciens</i>	LBA 4404 mit pAL 4404 (Helferplasmid)	Streptomycin und Rifampicin (HOEKOMA <i>at al.</i> , 1983)	Promega
<i>E.coli</i>	JM 110	F', traD36, lacI ^q Δ(lacZ)M15, proAB /e14 ⁻ (McrA ⁻) Δ(lac - proAB) thi gyrA96 (Nal ⁻) endA1 hsdR17 (r _K ⁻ m _K ⁺) relA1 supE44	Promega
<i>E.coli</i>	NM 522	F' lacI ^q Δ(lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺ /supE thi Δ(lac -proAB)Δ(hsdMS - mcrB)5(r _K ⁻ m _K ⁻ McrBC ⁻)	Pharmacia

Die Bakterienstämme lagen als Dauerkulturen vor und wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.1.6 Vektoren und Expressionsplasmide

Tab. 2.4 Auflistung der verwendeten Plasmide, mit Beschreibung und Angabe der Referenzen bzw. Bezugsquellen

Plasmid	Beschreibung	Antibiotika - Resistenz (<i>E. coli</i>)	Referenz/ Bezugsquelle
p245*	enthält PVX VLK	Ampicillin	Prof. E. MAIB
p388*	Binärer Vektor mit PLRV - VLK	Kanamycin	COMMANDEUR UND MARTIN (1993)
pBCIISKM	Phagemid	Chloramphenicol	Stratagene
pBlueskriptII	Phagemid <i>lacZ</i>	Ampicillin	Stratagene
pe35Stu_pA*	Klonierungsvektor	Ampicillin	Prof. E. MAIB
pGEM® - T Easy	Klonierungsvektor <i>lacZ</i>	Ampicillin	Promega
pLX222*	Binärer Vektor, <i>lacZ</i>	Tetracyclin	LANDSMANN <i>et al.</i> (1988)
pSL1180	Superlinker Phagemid	Ampicillin	Pharmacia Brosius
pSL1180PPVPVY*	enthält CP Fragmente des PPV und PVY	Ampicillin	Prof. E. MAIB
pTaq*	Expressionsvektor mit Sequenz der <i>Taq</i> DNA Polymerase	Ampicillin	PLUTHERO <i>et al.</i> (1993)
V53*	enthält das selbstspleißendes Intron ST-LS1 aus Kartoffel	Ampicillin	Prof. E. MAIB

* Die schematische Darstellung dieser Plasmide ist mit den jeweils relevanten Restriktionsschnittstellen unter 8.1 A - G im Anhang dargestellt

2.1.7 Enzyme

In diesem Abschnitt werden die zur Plasmid - Identifizierung, Plasmid - Modifikation und DNA - Amplifikation verwendeten Enzyme, ihre Bezugsquellen und die verwendeten Puffer aufgelistet.

2.1.7.1 Restriktionsendonukleasen (RE)

Tab. 2.5 Auflistung der verwendeten RE, mit Angabe der Erkennungssequenz, der Isoschizomere und Bezugsquellen

Enzym	Erkennungssequenz (5' → 3')	Bezugsquelle
<i>Asp718 (Acc65I)</i>	G▼GTACC	Boehringer (MBI)
<i>AvII</i>	TGC▼GCA	Boehringer
<i>AvrII (XmaJI)</i>	C▼CTAGG	NEB (MBI)
<i>BamHI</i>	G▼GATCC	MBI
<i>BglII</i>	A▼GATCT	NEB
<i>BssHII (Paul)</i>	G▼CGCGC	NEB (MBI)
<i>Ecl136II</i>	GAG▼CTC	MBI
<i>Eco32I (EcoRV)</i>	GAT▼ATC	MBI (NEB)
<i>EcoRI</i>	G▼AATTC	MBI
<i>HindIII</i>	A▼AGCTT	MBI
<i>KpnI</i>	GGTAC▼C	MBI
<i>MfeI</i>	C▼AATTG	NEB
<i>MluI</i>	A▼CGCGT	MBI
<i>NheI</i>	G▼CTAGC	MBI
<i>PmlI</i>	CAC▼GTG	NEB
<i>PstI</i>	CTGCA▼G	MBI
<i>PvuII</i>	CAG▼CTG	NEB
<i>SacI</i>	GAGCT▼C	NEB
<i>SacII (Cfr42I)</i>	CCGC▼GG	NEB (MBI)
<i>SalI</i>	G▼TCGAC	MBI
<i>StuI</i>	AGG▼CCT	NEB
<i>XbaI</i>	T▼CTAGA	MBI
<i>XhoI</i>	C▼TCGAG	MBI

▼ Spaltungsstelle innerhalb der Sequenz; in Klammern angegeben: Isoschizomere der jeweiligen RE und entsprechende Bezugsquellen

2.1.7.2 Nukleinsäure - modifizierende Enzyme

Tab. 2.6 Auflistung der verwendeten Nukleinsäure - modifizierenden Enzyme, mit Angabe der Konzentrationen, Bezugsquellen und Pufferzusammensetzungen

Enzym	Konzentration	Bezugsquelle	Pufferbezeichnung und Zusammensetzung
Alkalische Phosphatase (CIAP)	1 U/ μ l	Promega	CIAP - Puffer (10 x), pH 9,3 (0,5 M Tris, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM $ZnCl_2$, 10 mM Spermidin)
RNase A	75 U/mg	Boehringer	TE - Puffer (10/0,1), pH 8,0 (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA)
RQ1 - DNase	1 U/ μ l	Promega	RQ1 - Puffer (10 x), pH 8,0 (400 mM Tris, 100 mM $MgSO_4$, 10 mM $CaCl_2$)
T4 DNA - Ligase	1 U/ μ l	MBI	Ligationspuffer (10 x), pH 7,8 (400 mM Tris, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 5 mM ATP)
T4 DNA - Ligase	1 U/ μ l	Promega	Schnell - Ligationspuffer (2 x), pH 7,8 (60 mM Tris, 20 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA, 2 mM ATP, 10% PEG 1500)

2.1.7.3 Polymerasen

Tab. 2.7 Auflistung der verwendeten Polymerasen, mit Angabe der Konzentrationen, Bezugsquellen und Pufferzusammensetzungen

Enzym	Konzentration	Bezugsquelle	Pufferbezeichnung und Zusammensetzung
AMV Reverse Transkriptase	10 U/ μ l	Invitrogen	AMV - Puffer (5 x), pH 8,3 (250 mM Tris, 250 mM KCl, 50 mM $MgCl_2$, 2,5 mM Spermidin, 50 mM DTT)
Klenow DNA Polymerase I	10 U/ μ l	MBI	Klenow - Puffer (10 x), pH 7,2 (500 mM Tris, 100 mM $MgSO_4$, 1 mM DTT)
SuperScript II RNase H - RT	200 U/ μ l	Invitrogen	Erststrang - Puffer (5 x), pH 8,3 (250 mM Tris, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$)

Enzym	Konzentration	Bezugsquelle	Pufferbezeichnung und Zusammensetzung
Taq DNA Polymerase	1 U/μl	MBI,	Taq - Puffer (10 x), pH 8,8 (100 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,8% Nonidet P40) (s. 3.2.11)
	5 U/μl	Sigma,	
	5 U/μl	Promega,	
	5 U/μl	Eurogentec	
	n.e.*	Taq AG Maiss	

* n.e.: nicht ermittelt

2.1.7.4 Protein - modifizierende Enzyme

Tab. 2.8 Auflistung der verwendeten Protein - modifizierenden und Zellwand - abbauenden Enzyme, mit Angaben der Konzentrationen, Bezugsquellen und Pufferzusammensetzungen

Enzym	Konzentration	Bezugsquelle	Pufferbezeichnung und Zusammensetzung
Lysozym	100.000 E/mg	Merck	
Proteinase K	20 mg/ml	Roth	Proteinase K - Puffer (2 x), pH 7, 0 (0,2 M Tris, 25 mM EDTA, 0,3 M NaCl, 2% SDS)

2.2 CHEMIKALIEN

2.2.1 Chemikalien (fest)

Tab. 2.9 Auflistung der verwendeten Feststoffe, mit Angabe der Bezugsquellen und verwendeten Abkürzungen

Bezeichnung	Bezugsquelle	Abkürzung
1 - Naphthalene acetic acid (Auxin)	Duchefa	NAA
3,5 - Dimethoxy - 4 - hydroxyacetophenon	Sigma Aldrich	Acetosyringon
4 - chloro - 2 - 2 - methylbenzenediazonium Salz	Sigma	Fast Red
5 - Bromo - 4 chloro - 3 - indolyl β - D - galactopyranoside	MBI	X - Gal
6 - Benzyladenin (Cytokinin)	Duchefa	BAP
Agar Agar	Appllichem	Agar
Agarose	Seakem®	
Agarose (Large DNA Low Melt)	Biozym	LM Agarose
Amberlite	MBI	
Ammoniumacetat	Merck	

Bezeichnung	Bezugsquelle	Abkürzung
Ammoniumpersulfat	Serva	
Ampicillin	Serva	
ATP	Roth	
Calciumchlorid	Merck	CaCl ₂
Chloramphenicol	Merck	
Claforan	Duchefa	
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva	
D (+) Saccharose	Roth	
Dextran T70	Roth	
Dimethylsulfoxid	Sigma	DMSO
Diethylpyrocarbonat	Sigma	DEPC
Dithiotreitol	Bio vectra	DTT
Ethylendinitrilotetraessigsäure	Merck	EDTA
Glucose	Roth	
Glyzin	Roth	
Hefe Extrakt	Roth	
Hepes	Roth	
Hexamin Kobaltchlorid	Sigma	
Hydroquinone	Sigma	
Isopropyl - β - D - Thiogalactopyranosid	Biovectra	IPTG
Kaliumacetat	Merck	KOAc
Kaliumchlorid	Merck	KCl
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	KH ₂ PO ₄
Kanamycin	Roth	
Lithiumchlorid	Roth	
Magnesiumchlorid	Roth	MgCl ₂
Magnesiumsulfat	Merck	MgSO ₄
Manganchlorid	Merck	MnCl ₂
MOPS	Roth	
Murashige und Skoog - Medium	Duchefa	MS
N,N - Diethyldithiocarbamidsäure	Sigma Aldrich	NaDIECA
Naphthol AS - MX Phosphate	Roth	Naphthol
Natriumacetat	Roth	NaOAc
Natriumchlorid	Roth	NaCl
Natriumhydrogencarbonat	Merck	NaHCO ₃

Bezeichnung	Bezugsquelle	Abkürzung
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	NaH ₂ PO ₄
Natriumdisulfit	Merck	Na ₂ S ₂ O ₅
Natriumhydrogenphosphat	Roth	Na ₂ HPO ₄
Natriumhydroxid	Merck	NaOH
Nitrophenylphosphat	LOEWE	
Ovalbumin	Sigma	
Phenylmethylsulfonylfluoride	ICN	PMSF
Plant Agar	Duchefa	
Polyethylenglykol 1500	Merck	PEG 1500
Rubidiumchlorid	Roth	RbCl
SDS ultra pure	Roth	SDS
Select Peptone 140	Life Technologies	Peptone
Spermidin	Sigma	
Streptomycin	Serva	
Tetracyclin	Serva	
Tris - HCl	Roth	
Tris - Base	Roth	Tris

2.2.2 Chemikalien (flüssig)

Tab. 2.10 Auflistung der verwendeten Flüssigchemikalien, mit Angabe der Bezugsquellen und Abkürzungen

Bezeichnung	Bezugsquelle	Abkürzung
2 - Mercaptoethanol	Merck	
2 - Propanol	Roth	Isopropanol
Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30 37,5:1	Roth	Acrylamid 37,5:1
Diethanolamin 99%	Sigma Aldrich	
Dimethylformamid	Serva	DMF
Essigsäure Rotipuran (99,9%)	Roth	
Ethanol (99,9%)	Roth	EtOH
Ethidiumbromid 1% Stammlösung	Roth	EtBR
Glycerin	Roth	
Isoamylalkohol	Merck	
Methanol	Roth	MEtOH
Natriumhypochlorit Lösung (12%)	Roth	
Nonidet P40 Substitut (Igepal CA - 630)	Sigma	Nonidet

Bezeichnung	Bezugsquelle	Abkürzung
Roti Phenol	Roth	Phenol
Salzsäure rauchend (37%)	Merck	HCl
Trichlormethan	Roth	Chloroform
Tween 20	Roth	
Tween 80	Roth	

2.3 SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit dem Programm Vektor NTI oder PRIMO MSP 4.3 entwickelt und von den Firmen MWG - Biotech AG (Ebersberg) oder Invitrogen / Gibco BRL (Karlsruhe) synthetisiert und als lyophilisierte Proben geliefert. Aus diesen wurden durch die Zugabe der entsprechenden Menge TE - Puffer (s. Tab. 2.6) Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 µM hergestellt.

Zum Teil wurden den Oligonukleotiden für die Klonierung Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen angefügt, die in Tab. 2.11 gesondert gekennzeichnet sind. Die jeweiligen verwendeten Primerkombinationen und die Größe der erwarteten Amplifikate ist im Ergebnisteil angegeben.

Tab. 2.11 Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
35Eco	GGAATTCCTTGATGTGATATCTCCACTGAC <i>EcoRI</i>
35Hind	CAAGCTTGCTGGGAAGTACTCACACATT <i>HindIII</i>
35S	GATTGATGTGATATCTCCAC
35Term	CTTATATGCTCAACACATGA
amp1	GTTTTAGATTTATTAGTAATAAATTAGTTA
amp2	ATAACACTACAACCACTTCATTCTAACAA
CG1	GAAGATCTGGTACCTAGGCGCGCGCGCGCGCGCGGGGGATCCGCTAGCTAC <i>BglII KpnI AvrII BamHI NheI</i>
CG2	GTAGCTAGCGGATCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCCTAGGTACCAGATCTTC <i>Nhe Bam Avr Kpn BglII</i>
intspl1	GGGGGGCTCTAGAGGTAAGTTTCTGCTTCT <i>XbaI</i>
intspl2	ACATGCATGCCGACGCGTCCGCTAGCGCGAGCTCGCCTGCACATCAACAAATTTTG <i>MluI NheI SacI</i>

Bezeichnung	Sequenz
IR 1	GCTCTAGACTCGAGACTTCTCGAGCTCCTCAATC <i>XbaI XhoI XhoI SacI</i>
IR 2	GCTCTAGACGACGCGTCCGCGGGGACCTAGGAGCATTTCATTTAGCTTCAG <i>XbaI MluI SacI AvrII</i>
Mf *	AGTCGAATATTTATTGAAATTAATCGT
Mr *	ACGATTAATTTCAATAAATATTCGAC
M13 rev	GGAAACAGCTATGACCATG
M13 uni	GTAAAACGACGGCCAGT
Mas *	AAAAAAAAAACTAATAATTTTTACGAAC
mod1	ATTTTCATTTGGAGAGGGTGG
mod2	AAGAACCCTAATTCCTTATCT
Ms *	GGGTGGTTATTAGTATTTTTCGAC
PLRV_JElo	GCTCTAGAGACTCTGAAGGATCC <i>XbaI BamHI</i>
PLRV_JEup	GGGGTACCAGATCTAGTATAAGATCAC <i>KpnI BglII</i>
PVXa	CGGGATCCGCTAGCCAAACAGAAATGATAGATACAG <i>BamHI NheI</i>
PVXb	GCTCTAGAGCATTTCATTTAGCTTCAGA <i>XbaI</i>
PVY_1	AAGGCCTAGATCTGCTAGCCGATTTCTATATACGCTTC <i>BglII NheI</i>
PVY_1 (2)	ACGCGTCGACCGAAATGACACAATCGATGCATGAGGAAGCACT <i>MluI SalI</i>
PVY_2	GCTCTAGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTAGCCTATGTAATACTTATATATCGT <i>XbaI NheI</i>
PVY_3	GCTCTAGAGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTAGCCACCTCATAAAAGTCAAAGCAT <i>XbaI NheI</i>
PVY_4	ACGCGTCGACCGAGCAACTCAATCACAGTT <i>MluI SalI</i>
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	AATACGACTCACTATAG
Umas *	AAAAAAAAAACTAATAATTTTTACAAA
Ums *	GGGTGGTTATTAGTATTTTTGAT

* diese Primer wurden für die Amplifikation Bisulfit modifizierter DNA eingesetzt; An den fett markierten Stellen, wurden die Nukleotide C→T bzw. G→A im Vergleich zur Originalsequenz ausgetauscht

2.4 "KITS"

Tab. 2.12 Auflistung der eingesetzten Kits mit Herstellerangabe

Produkt	Hersteller
DNeasy ® Plant Mini Kit	Qiagen
Qiaex II ® Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick ® Spin	Qiagen

2.5 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tab. 2.13 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien, mit Bezeichnung und Bezugsquellen

Produkt	Bezeichnung	Bezugsquelle
Anzuchtschalen	Pikierkiste PK14	Hermann Meyer
Celite	Celite 545	Serva
Dialyseschlauch	Visking [®] dialysis tubing 20/32 (Ø 16 mm)	Serva
Dünger	22 + 4 + 6 mit Spurennährstoffen	Fa. Berghoff
Einwegspritzen		Braun Melsungen
Elisa Platten (hohe Bindungskapazität)	Mikrolon 96 K	Greiner
Handschuhe, Latex	Gentle Skin	Meditrade
Handschuhe, Nitril	Nitril 3000	Meditrade
Leuchtstofflampe	L36 W/11, Lumilux	Osram
Parafilm	PM 996	Roth
Pasteurpipetten		Greiner
Petrischalen		Greiner
Pflanzenschutzmittel	Pirimor, Benomyl Netzschwefel Euparen, Metasystox	Syngenta, DuPont Neudorff Bayer CropScience
pH - Papier	Universal Indikatorpapier (pH 1-11)	Roth
Pipettenspitzen	Tipps 200, 1000	Greiner, Sarstedt
Reaktionsgefäß für Bisulfit Modifikation	Biopur [®] 2 ml Safe Lock Tubes	Eppendorf
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml	Greiner, Sarstedt

Produkt	Bezeichnung	Bezugsquelle
Safe Lock Reaktionsgefäß	1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Sarstedt
Töpfe	Plantpak (Ø 8 und 10 cm)	Hermann Meyer
Whatman Papier	3MM Chr	Whatman Biometra

2.6 SONSTIGE MATERIALIEN

Tab. 2.14 Auflistung sonstiger verwendeter Materialien mit Bezugsquellen

Produkt	Konzentration	Bezugsquelle
Desoxynucleoside Triphosphat Set	je 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roth/Sigma
Lambda DNA (dam - dcm)	400 mg/ml	MBI
Nitrocellulose Transfer Membran	Protran BA 85 (0,45 µm Poren)	Schleicher und Schuell
Protein MW Marker SM0431	0,1 - 0,2 mg/ml (ea)	MBI
Protein MW Marker V523A	0,5 mg/ml (ea)	Promega

2.7 GERÄTE

Tab. 2.15 Auflistung der verwendeten Geräte, mit Typbezeichnungen und Bezugsquellen

Gerät	Typ	Bezugsquelle
Autoklav	Typ M - MCS	Sanoclav
Bildschirm	CTM - 12	Hautarex
Destille	GFL Bi - dest 2104	GfL
Digitalkamera	Coolpix 990 (3,2 Mpi)	Nikon
Elektrophoresekammer	Horizontal Midi Mini 440,000	Harnischmacher polymer
ELISA Photometer	Microplate Reader 550	Bio - Rad
ELISA Platten washer	Auto strip washer Elx50	Bio - Tek instruments inc.
Feinwaage	analytic A200S	Sartorius
Gefriertrocknungsanlage	Loc - 2m Beta 1 - 16	Christ
Gewebekulturschrank	Rumed	Rubarth Apparate GmbH
Gradientencycler	T3 und 200	Biometra
Hybridisierungssofen	Hybridisierungs Inkubator	Biometra
Gel Jet Imager	Typ N20	Intas
Kamera und Stativ	Intas MW 312	intas® Göttingen

Gerät	Typ	Bezugsquelle
Kühlfalle	Heto CT60e	Heto
Kühlzentrifuge	Sorvall® RC5B (Rotoren: SLA 1500 und SS 34) Sigma 4 K 15 : (Rotoren 12167, 1147)	Sorvall Dupont B.Braun Biotech Int
Magnetrührer	MR 2000 RH basic	Heidolph Ika® Werke
pH Meter	PH523	WTW
Pipetten	2 µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Gilson Pipetman
Polaehne Presse	Typ R30DT71K4 - 2	SEW Enrodive, Bruchsal
Protein - Transfer - Kammer	Tank Transphor unit	Amersham Pharmacia Biotech
Rolltisch	RM 5	
Rundschüttler und Brutschrank	Certomat®R, Certomat® MO Certomat®M, Certomat® HT	B.Braun Biotech Int
Schwenktisch	GFL® 3013	GfL
Spannungsquellen	2197 Power Supply Electrophoresis Power Supply E443, Supply E714, Supply E143	LKB Bromma Consort
Spektralphotometer	55IS UV/VIS Spectrophotometer	Perkin - Elmer
Sterilbank	5320 Lamin Air® HA2448GS	Heraeus
Sterilisator	Tv40u	Memmert
Template Tamer		QBiogen
Thermoblock	Thermostat 5320	Eppendorf
Thermocycler	Péltier Thermal Cycler PTC	Mj Research
Thermoschränke	H - Inkubator Pt 100	Biometra
Tischzentrifugen für 1,5 und 2 ml Reaktions - gefäße	Sigma 113 Mini Spin Biofuge 13	Sigma Eppendorf Haraeus Sepatech
Trockenschrank		WTB Binder
UV - Tisch	TVL - 312 A	Spektroline®
Vakuumpzentrifuge	Hetovac VR - 1	Heto

Gerät	Typ	Bezugsquelle
Vertikal - Elektrophorese Kammer	Mighty Small II, SE 250 / SE 260	Hofer Scientific Instruments
Videoprinter	Video Copy Processor P91 D	Mitsubishi
Vortex	MS 1 Minishaker MS 2 Minishaker REAX 2000 Minispin Rotor F45 - 12 - 11	IKA® IKA® Heidolph Eppendorf
Waage	MC1 Laboratory LC420 1205 MP	Sartorius Sartorius
Wärmehaube	Certomat®H	B.Braun Biotech Int.
Wasserbad mit Thermostat	Haake D1 & G Haake F3 & S Haake N2 & B	Haake Fisons Haake Fisons Haake Fisons

2.8 SOFTWARE

Tab. 2.16 Auflistung der verwendeten Software, mit Angabe der Version und dem rechtlichen Urheber

Programm	Version	Rechte bei
Blast	2.0	National Center for Biotechnology Information
Chi Quadrat Test	2003	J. Preacher ¹
Chromas	2.23, 1998	Technelysium Pty Ltd
ClustalX	1,83, 1988	HIGGINS UND SHARP, 1988
ELISA Microplate Manager	5.0 1/52	Bio - Rad
Excel	97, 1997	Microsoft
Gel - Dokumentation Intas GDS	2002	Intas
NatGene2		Technical University of Denemark DTU ²
Oligo	4.0, 1991	RYCHLIK UND RHOADS, 1989
Primo	MSP 4.3	Chang Bioscience Inc ³
Vector NTI, Demoversion	4.0, 1997	InforMarx Inc

Angabe der Internetseiten, auf denen diese Programme kostenlos zur Verfügung gestellt sind:
(letzter Zugriff am 14.11.2005)

¹: <http://www.unc.edu/~preacher/chisq/chisq.htm> (University of North Carolina at Chapel Hill)

²: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>

³: <http://www.changbioscience.com/primos/primom.htm>

3 METHODEN

In diesem Teil werden alle Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit Anwendung gefunden haben, beschrieben. Aufgrund der besseren Übersicht ist der Abschnitt in biologische und molekularbiologische Methoden unterteilt. Diesem ist ein Kapitel vorangestellt, in dem Standardmethoden beschrieben werden, die wiederholt in anderen Verfahren Anwendung gefunden haben.

Grundsätzlich wurde durch Sterilisation sichergestellt, dass die verwendeten Geräte und Kulturgefäße frei von vermehrungsfähigen Organismen und infektiösen Partikeln sind. Dazu wurden die Verbrauchsmaterialien aus Polypropylen im Autoklaven bei 1,0 bar Überdruck für 20 min bei 121 °C und hitzebeständige Gegenstände aus Glas oder Metall für 3 h bei 160 °C mit trockener Hitze sterilisiert.

Alle verwendeten Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit A. bidest hergestellt. Zum Einstellen des pH - Wertes wurde, sofern nicht anders vermerkt, 1 M NaOH oder 1 M HCl verwendet.

Grundsätzlich wurden die Lösungen erst nach der Adjustierung des pH - Wertes auf das gewünschte Endvolumen mit A. bidest aufgefüllt und anschließend für 20 min bei 120 °C sterilisiert. Lösungen mit hitzesensitiven Stoffen wurden durch Filtrieren entkeimt, was in den einzelnen Methodenbeschreibungen explizit angegeben ist.

Alle Zentrifugationsschritte sind in Umdrehungen pro Minute (UpM) angegeben und wurden in den Tischzentrifugen (s. Tab. 2.15) für 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße durchgeführt. Wurden andere Zentrifugen verwendet ist dies unter Angabe des Rotors explizit bei der Beschreibung der Methode angegeben. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur (Rt) durchgeführt.

3.1 BIOLOGISCHE METHODEN

3.1.1 Anzucht von *N. benthamiana* - Pflanzen

Für die Anzucht von *N. benthamiana* - Pflanzen werden Samen in angefeuchteter Fruchstorfer Einheitserde Typ P im 10er Topf ausgesät und mit einem Petrischalendeckel gegen Austrocknung geschützt. Nach einer Woche

werden die Keimlinge einzeln in 10er Töpfe oder à 15 Stück in Anzuchtschalen pikiert.

3.1.2 Kultivierung von *N. benthamiana* - Pflanzen

Die Kultur der *N. benthamiana* - Pflanzen erfolgt bei minimal 20°C/22°C Heizungstemperatur/Lüftungstemperatur im Gewächshaus. In den Gewächshäusern besteht keine Möglichkeit zur Kühlung, wodurch in den Sommermonaten Temperaturen von über 40°C erreicht werden können.

Zwischen 6.00 Uhr und 22.00 Uhr wird eine Bestrahlung von mindestens 5 kLux durch Assimilationsleuchten gewährleistet.

Einmal pro Woche werden die Pflanzen mit 0,02%igem Dünger (s. Tab. 2.13) gegossen.

Der Pflanzenschutz wird bei Bedarf mit Pirimor, Metasystox, Benomyl, Euparen oder Netzschwefel nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

3.1.3 Virusübertragung auf *N. benthamiana* - Pflanzen

Die Virusübertragung auf eine gesunde Pflanze wird einerseits dazu genutzt, die Viren in Erhaltungskultur über den gesamten Zeitraum der Arbeit zur Verfügung zu haben, andererseits um die transgenen Pflanzen auf eine Virusresistenz hin zu untersuchen. Aufgrund unterschiedlicher Übertragungswege der in dieser Arbeit verwendeten Viren wurde sowohl mechanische Übertragung, als auch die Agrobakterien - Infiltration zur Pflanzeninfektion eingesetzt.

3.1.3.1 Mechanische Virusübertragung

Da Viren nicht aktiv in Zellen eindringen können, wird die Blattoberfläche durch ein Abrasivum leicht verletzt, so dass die Viren in die Zellen eindringen und sie infizieren können.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Hepespuffer (pH 7,0)	30 mM Hepes
Phosphat - Puffer (pH 7,0*)	0,5 M KH_2PO_4
	0,5 M Na_2HPO_4

*der pH - Wert wird eingestellt durch Mischung der beiden Lösungen miteinander

Um die mechanisch übertragbaren Viren PVY und PVX von einer Pflanze auf eine andere im Fünfbblatt - Stadium zu übertragen, wird das Blatt einer infizierten

Pflanze (frisches oder gefriergetrocknetes Material) im Verhältnis 1:5 mit Hespuffer oder Phosphat - Puffer im Mörser zerrieben und mit dem Daumen auf die jüngsten vollentwickelten Blätter gestrichen. Das Abrasivum Celite 545 wird entweder direkt auf die zu inokulierenden Blätter gestäubt, oder in den Mörser zum Vireninokulum gegeben.

Anschließend werden die Pflanzen kurz mit Wasser abgespült und unter den unter 3.1.2 aufgeführten Bedingungen kultiviert.

3.1.3.2 Virenübertragung mittels Agrobakterien - Infiltration

Das Luteovirus PLRV ist nicht mechanisch übertragbar. Darum wird dieses Virus mittels der Agroinfiltrationsmethode nach GRIMSLEY *et al.* (1995) übertragen. Innerhalb der Arbeitsgruppe stand dafür ein rekombinanter *A. tumefaciens* - Stamm (ATHV) zur Verfügung, der mit dem binären Plasmid p388 transformiert wurde, dessen T - DNA den replikationsfähigen VLK des PLRV enthält.

Nach der Infiltration der Bakterien in das Blattgewebe, wird durch das im Inokulationspuffer enthaltene Acetosyringon, einen niedrigen pH - Wert und Temperaturen unter 28°C die *vir* - Gen Kette des Bakteriums aktiviert (ALT - MÖRBE *et al.*, 1988,1989; weitere Erläuterungen s. 3.2.9). Da die virale Sequenz unter Kontrolle des konstitutiven 35S - Promotors des CaMV steht, kann in der Pflanzenzelle eine effektive Transkription des PLRV - VLKs stattfinden. Zum einen kann die T - DNA wie unter 3.2.9 beschrieben in das pflanzliche Genom integriert und das Transgen exprimiert werden, zum anderen besteht die Möglichkeit der transienten Expression, bei der die Gene vorübergehend vom rekombinanten Ti - Plasmid exprimiert werden (SONTI *et al.*, 1995). Liegen dann infektiöse Partikel des PLRV in den Zellen vor, kann die enthaltene RNA repliziert und die Pflanze systemisch infiziert werden.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

LB_{Kan50}	s. Tab. 3.3
Inokulationslösung (pH 5,5)	10 mM MgCl ₂
	10 mM MES
	100 µM Acetosyringon

Der rekombinante *A. tumefaciens* - Stamm ATHV, der den VLK des PLRV in der T - DNA beinhaltet, wird aus der Dauerkultur auf LB_{Kan50} - Medium (s. Tab.

3.3) fraktioniert ausgestrichen und für 3 Tage bei 28°C inkubiert. Eine Einzelkolonie dieser Vorkultur wird mit einem Zahnstocher in 20 ml LB_{Kan50} in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit 250 UpM 2 - 3 Tage bis zu einer Dichte von OD₆₀₀ = 1,0 - 1,5 bei 28°C kultiviert. 1,5 ml dieser Flüssigkultur werden für 3 min mit 13.000 UpM in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß sedimentiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wird das Bakterienpellet in 2 ml Inokulationslösung resuspendiert und für 4 h bei Rt zur Induktion der *vir*-Gen Kette inkubiert. Diese Lösung wird in 1 ml nadellose Spritzen aufgezogen und nahe der Blattadern in die Unterseite der zu infizierenden Blätter infiltriert, wobei das Blatt auf der Oberseite leicht mit dem Daumen der anderen Hand stabilisiert wird. Insgesamt werden in drei Blätter einer *N. benthamiana* Pflanze im Siebenblatt - Stadium insgesamt 2 ml der Bakteriensuspension infiltriert.

3.1.4 Durchführung der Resistenztests

Diese Tests dienen der Untersuchung transgener Pflanzen auf eine Virusresistenz. Dazu werden aus Samen jeweils 15 Pflanzen wie unter 3.1.1 beschrieben bis zum Fünf- bzw. Siebenblatt - Stadium angezogen und anschließend wie unter 3.1.3.1 bzw. 3.1.3.2 beschrieben, mit Virus inokuliert. Zur Kontrolle der Infektion wurden jeweils 15 nicht transgene *N. benthamiana* - Pflanzen des gleichen Alters mit dem jeweiligen Virus inokuliert, wodurch sichergestellt werden konnte, dass die Infektion mit einer Rate von 100% stattgefunden hatte.

Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Pflanzen der T1 Generation untersucht wurden, wurden jeweils zwei der fünfzehn Pflanzen eines Testes mittels Standard PCR (s. 3.2.5.1; verwendete Primer s. Ergebnisteil) auf die Präsenz des Transgens untersucht. Sobald in mindestens einer dieser zwei Pflanze die viral - abgeleitete Sequenz nachgewiesen werden konnte, musste davon ausgegangen werden, dass bei einer angenommenen Aufspaltung von 3:1, also bei der minimalen Insertion von nur einer Kopie des Transgens, mindestens zehn der 15 getesteten Pflanzen transgen waren.

3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1 Standardmethoden

3.2.1.1 Phenol - Chloroform Reinigung

Mit Hilfe der Phenolextraktion werden Proteine aus Nukleinsäurelösungen entfernt. Phenol ist ein guter Wasserstoffbrückenbildner und kann hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäure - Seitenketten ausbilden. Auf diese Weise dissoziiert es den Protein - Nukleinsäure Komplex in freie Komponenten, wobei sich die denaturierten Proteine in der Phenolphase anreichern. Dabei muss der pH - Wert des Phenols 7,8 betragen, da sonst auch die DNA in die phenolische Phase über geht. Zur Erleichterung der Phasentrennung, wird ein Chloroform - Isoamylalkohol Gemisch (24:1) verwendet, bei dem das Chloroform die Proteine denaturiert.

Um die Nukleinsäure in einer Lösung von Proteinen zu reinigen, wird die Probe mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt und 30 sec lang gründlich vermischt. Nach fünfminütiger Zentrifugation mit 13000 UpM wird die wässrige Phase in ein neues Eppendorf - Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe des gleichen Volumens an Chloroform oder eines Chloroform/Isoamylalkohol - Gemisches (24:1) und einer 30 sekundigen Vermischung werden die restlichen Proteine und Phenolspuren in der Chloroform Phase angereichert. Durch eine Zentrifugation für 5 min mit 13000 UpM werden die beiden Phasen des Gemisches wieder getrennt und die Nukleinsäure kann nach Abnahme der wässrigen Phase und Überführung in ein neues Reaktionsgefäß mit einer Natriumacetat / Ethanol - Fällung (s. 3.2.1.2) präzipitiert werden.

3.2.1.2 Natriumacetat / Ethanol - Fällung von Nukleinsäuren

Bei Fällungsreaktionen wird die Nukleinsäure quantitativ aus wässrigen Lösungen ausgefällt. Die Verteilung zwischen fester und flüssiger Phase ist dabei abhängig vom Löslichkeitsprodukt der Nukleinsäure. Die Löslichkeit, die unter anderem vom Wassergehalt abhängt, kann durch Zugabe von Salzen wie Natriumacetat vermindert werden. Aus salzhaltigen wässrigen Lösungen, kann die Nukleinsäure dann mit Alkohol gefällt werden. Sofern im Ergebnisteil nicht explizit angegeben, wird immer die Methode der Natriumacetat / Ethanol - Fällung zur Präzipitation der Nukleinsäure eingesetzt.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Natriumacetat - Lösung (pH 5,5) 3 M NaOAc

TE - Puffer s. Tab. 2.6

Um die Nukleinsäuren zu präzipitieren wird ein 10tel des Gesamtvolumens der Probe an Natriumacetat - Lösung und das 2,0 - 2,5 fache Volumen eiskalten 96%igem EtOH (EtOH_{abs}) zur Probe gegeben. Nach Inkubation bei Rt für 10 Minuten (bei geringeren Nukleinsäure Konzentrationen in der Lösungen: 30 min bei -20°C) folgt eine Zentrifugation mit 13000 UpM für 20 min bei 4°C. Anschließend wird das Nukleinsäurepellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min mit 13000 UpM zentrifugiert.

Nach Trocknung des Nukleinsäurepellets im Vakuumkonzentrator wird die Nukleinsäure in TE - Puffer aufgenommen und kann, weil das EDTA als Chelatbildner eine saure Hydrolyse und Nukleaseaktivität unterbindet, bei -20°C mehrere Monate gelagert werden.

3.2.1.3 Proteinase K - Verdau

Die Eigenschaft der Proteinase K, Peptidverbindungen nahe der Carboxylgruppe von aliphatischen und aromatischen Aminosäuren zu hydrolysieren, wird genutzt um native Proteine oder Nukleasen aus Lösungen zu entfernen bzw. zu deaktivieren.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Proteinase K - Puffer s. Tab. 2.8

Proteinase K 20 mg/ml Proteinase K_{aq}

Um Proteine in einer Lösung zu denaturieren, wird das 0,5 fache Volumen des Proteinase K - Puffers und Proteinase K (Endkonzentration: 50 - 100 µg/ml) zur Probe gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Um die Proteinase K zu inaktivieren wird der Ansatz anschließend 10 min bei 68 °C inkubiert.

3.2.2 Agarosegel - Elektrophorese nach McDONELL *et al.* (1977)

DNA - und RNA - Moleküle wandern aufgrund ihrer negativen Ladungen im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Feldstärke, der Nettoladung des Moleküls und dem Reibungskoeffizienten, der durch Struktur und Größe des Moleküls und der

Viskosität des Mediums bestimmt wird. Als Medium dient die polymere Verbindung Agarose.

Da kleine Moleküle überproportional schneller durch die Matrix wandern als große, ist es möglich, diese voneinander zu trennen. Dabei steht die relative Wanderungstrecke der DNA - Fragmente in linearem Zusammenhang zum Logarithmus der Fragmentgröße.

Soll die DNA nach der Agarosegel - Elektrophorese präparativ aufgereinigt und kloniert werden, wird Low Melting Agarose (Fa. Biozym) für das Agarosegel (LM - Gel) verwendet, deren Schmelzpunkt durch in die Polysaccharidketten eingeführten Hydroxyethylgruppen niedriger ist als der der DNA, wodurch gewährleistet wird, dass die DNA beim Schmelzen des Gels während der Aufreinigung nicht denaturiert.

3.2.2.1 Herstellung eines Größenstandards für die Agarosegel - Elektrophorese

Mit Hilfe eines Größenstandards, der unter gleichen Bedingungen wie die zu analysierende Nukleinsäure im Agarosegel aufgetrennt wird, ist es möglich, die Größe der aufgetrennten DNA - Fragmente zu bestimmen. Als Größenstandard für die Agarosegel - Elektrophorese wird die DNA des λ - Phagen mit dem RE *Pst*I verdaut, wodurch die 48502 bp umfassende Phagen - DNA in 28 Fragmente definierter Größe (s. Abb. 3.1) zerlegt wird (SANGER, 1977).

140 μ l λ - Phagen DNA (0,4 mg/ml) werden in einem Reaktionsvolumen von 300 μ l mit 40 u *Pst*I und 30 μ l 10xNEB - Puffer 3 bei 37°C 3 Stunden lang verdaut. Um die Reaktion zu stoppen, wird der Reaktionsansatz 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend werden 100 μ l Lade - Puffer (s. 3.2.2) zugegeben und der Größenstandard bei - 20 °C gelagert.

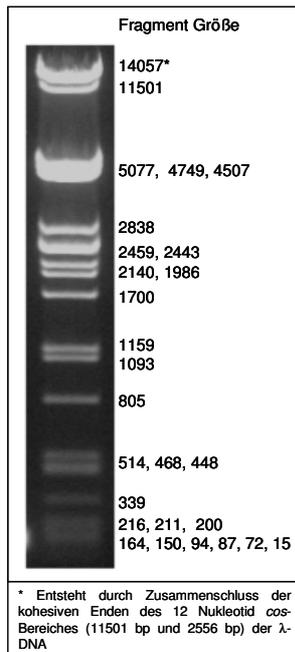


Abb. 3.1 DNA Fragmente der *PstI* verdauten λ - Phagen - DNA im 1%igen Agarosegel

3.2.2.2 Agarosegel - Elektrophorese und Dokumentation

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

50 x TAE Puffer(pH 8,4)	24,2 % (w/v) Tris
	5,11 % (w/v) Eisessig
	10% (v/v) 0,5 M EDTA
Lade - Puffer	50% (v/v) Glycerin
	0,4 % (w/v) Bromphenolblau
Ethidiumbromid - Lösung	7,5 mg / ml Etbr _{aq}

Für ein 1%iges Agarose Gel, welches Fragmentgrößen von 200 bp bis ca. 10.000 bp trennen kann, werden je nach Größe des Gelträgers 0,4 g - 0,8 g Agarose in 40 ml - 80 ml 1x TAE Puffer kurz auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlen auf 60°C werden 3,7 ‰ (v/v) Ethidiumbromid - Lösung zugegeben und in einen Gelträger (75mm * 100 mm/ 160mm * 100mm) zu einer Geldicke von ca. 5 mm gegossen. Die Auftragstaschen mit einem Volumen von ca. 20 - 40 μ l werden durch einen Kamm geformt, der vor dem Erstarren in das Gel getaucht wird. Nach dem Erhärten des Gels wird es horizontal in eine mit 1x TAE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt, so dass es vollständig mit Puffer bedeckt ist.

4 μ l λ / *PstI* - Größenstandard (s. 3.2.2.1) werden neben den Proben in die Auftragstaschen pipettiert, wodurch später die Größen der DNA - Fragmente der Proben bestimmt werden können.

Zu Beginn der Elektrophorese wird bei einer Stromstärke von 250 mA eine Spannung von 80 V angelegt, die nach 5 min auf 120 V erhöht wird. Bei Verwendung von LM - Gelen wird die anfänglich angelegte Spannung von 60 V nach 5 min auf 80 V erhöht, da das Gel sonst schmelzen könnte.

Die nach Größe getrennten Nukleinsäuren werden anschließend mit Hilfe eines UV - Transilluminators sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Videoeinrichtung mit Rotfilter fotografiert, da doppelsträngige DNA reversibel mit dem Ethidiumbromid interkaliert und dadurch stark im UV - Licht fluoresziert.

3.2.2.3 Extraktion der DNA aus einem Agarosegel mit dem Qiaex II® Gel Extraction Kit

Zur Elution der DNA aus dem Agarosegel nach der Auftrennung wird das QIAEX II® Agarose Gel Extraction Kit der Fa. QIAGEN nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wird das DNA - Fragment mittels Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, das Gelstück durch Hitzeinkubation gelöst und die DNA an Silikagel - Partikel gebunden. Im anschließenden Waschschrift werden Verunreinigungen wie Agarose, Proteine, Ethidiumbromid und Salze entfernt. Die Elution der Nukleinsäure erfolgt mit einem Nidrigsalzpuffer wie TE oder A. bidest. Das Eluat wird anschließend zur Ligation eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3 Polyacrylamidgel - Elektrophorese

Proteine können aufgrund ihrer Größe mittels SDS - Polyacrylamidgel - Elektrophorese (PAGE) nach LAEMMLI (1970) getrennt werden.

Das dreidimensionale Netzwerk des Polyacrylamids entsteht dabei durch die Polymerisation von monomerem Acrylamid und dem quervernetzenden bifunktionellen N,N'-Methylenbisacrylamid nach Zugabe der Radikale Ammoniumpersulfat und TEMED. Das bifunktionelle TEMED bewirkt dabei ebenfalls eine Quervernetzung der Acrylamidmoleküle.

Die Konzentrationen der Acrylamidmonomere und des TEMEDS bestimmen die Porengröße und damit die Auflösefähigkeit des Gels (SAMBROOK *et al.*, 1989). Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkt ein effektive Überdeckung der Eigenladungen der Proteine, so dass Anionen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen, die aufgrund ihrer Molekülgröße und nicht ihrer Ladung getrennt werden.

Niedermolekulare reduzierende Thiole wie 2 - Mercaptoethanol oder DTT bewirken eine Reduzierung der Disulfidbrücken in den Polypeptidketten, so dass die Proteine in ihrer Faltblatt - oder Helix - Struktur vorliegen.

3.2.3.1 Diskontinuierliche Polyacrylamid - Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970)

Bei der diskontinuierlichen PAGE werden Gele verwendet, die sich aus einem niederkonzentrierten Sammel - (4%) und einem hochkonzentrierten Trenngel (10%) zusammensetzen. Die Diskontinuität bezieht sich dabei auf die Parameter Gelstruktur, pH - Wert und Ionenstärke der Puffer, sowie die Art der Ionen im Gel - und Elektrodenpuffer.

Durch Verwendung unterschiedlicher Puffer für die Gele und die Elektrophoresekammer werden die Proben im Sammelgel konzentriert bevor sie im Trenngel differenziert werden, da die Substanzen mit der größten Mobilität im Sammelgel dem Leitton (Chlorid) folgen. Dabei sind die Mobilitäten wegen der großen Poren des Sammelgels rein ladungsabhängig. An der Grenzschicht zum engporigen Trenngel werden die Proteine aufgestaut und ihre Zonen geschärft. Das niedermolekulare Folgeion (Glycin) überholt dort die Proteine in Richtung Anode. Da die Diskontinuität nur noch an der Front besteht, werden die Proteine im homogenen Puffersystem im Trenngel nach ihrer Molekülgröße separiert.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Acrylamidstammlösung	29,2 g Acrylamid
	0,8 g N,N' - Methylenebisacrylamid
	10,0 g Saccharose
	ad 100 ml mit A. bidest

(nach dem Ansetzen 1 h mit 1g Amberlite rühren, anschließend filtrieren und bei 4°C lagern)

Trenngelpuffer (pH 8,8)	400 mM Tris
	0,1 % SDS
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	125 mM Tris
	0,25 % SDS
Ammoniumpersulfat (APS)	10,0 % Ammoniumpersulfat
Elektrophoresepuffer (pH 8,3)	50 mM Tris
	380 mM Glycin

Laemmli Puffer	20 mM Tris
bei -20°C lagern	2 mM EDTA
	2,0 % SDS
	10,0 % 2 - Mercaptoethanol
	0,05 % Bromphenolblau
	20,0 % Glycerin

Für die Herstellung der Trenngele werden in die Gießapparatur für die Vertikal - Gel - Elektrophorese je Gel eine Keramik - und eine Glasplatte eingespannt, die durch T - Spacer 1,5 mm getrennt werden. Weil mit der Gießapparatur für die Vertikal Elektrophoresekammer Mighty Small II (s. Tab. 2.15) gearbeitet wird, die auf dem Prinzip kommunizierender Röhren basiert, kann nicht polymerisiertes Gel auch zwischen die Keramik - und Glasplatten laufen. Um eine leichtere Trennung zu ermöglichen wird in diese Zwischenräume Wachspapier eingelegt.

Um vier 10% - ige Trenngele herzustellen, werden 14,0 ml Acrylamidlösung, 10,5 ml Trenngelpuffer und 17,0 ml H₂O mit 420 µl APS entgast. Nach Zugabe von 42 µl TEMED werden die Trenngele sofort gegossen und jeweils mit 1 ml A. bidest überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Polyacrylamids über Nacht, werden die Gele bei 4°C gelagert oder mit Sammelgel überschichtet für die Elektrophorese eingesetzt.

Das Sammelgel wird 30 min vor dem Elektrophoreselauf gegossen. Dazu werden die Gelplatten in die Vertikal - Elektrophorese - Kammer eingesetzt, die Bestandteile des 4%igen Sammelgels (425 µl Acrylamidlösung, 815 µl Sammelgelpuffer, 2 ml A. bidest, 32,5 µl APS und 3,25 µl TEMED pro Sammelgel) gemischt und auf die Trenngele gegossen. Sofort wird der Probenkamm, der die Auftragstaschen formt, eingeführt und 30 min im Gel belassen, bis das Sammelgel auspolymerisiert ist.

Nach Entnahme des Kammes wird unpolymerisiertes Material entfernt, die Vertikal - Elektrophoresekammer an die Wasserkühlung angeschlossen und der Elektrophoresepuffer eingefüllt.

20 µl der Proteingestamtextraktion (s. 3.2.9.7.1) werden im Verhältnis 1:1 mit Laemmli Puffer gemischt und neben 5 µl eines Proteingrößenstandards (s. 3.2.3.4) aufgetragen.

Zur Konzentration der Proben im Sammelgel wird eine Spannung von 80V bei 60 mA angelegt. Wandern die Proben in das Trenngel ein, wird die Spannung auf 120 V und die Stromstärke auf 65 mA erhöht. Nach ca. 4,5 h hat die sichtbare Bromphenolblaufront des Laemmlipuffers die Unterkante des Trenngels erreicht und der Lauf wird gestoppt. Das Gel wird aus der Elektrophoresekammer entnommen und die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose - Membran (NC) geblottet oder gefärbt.

3.2.3.2 Gelelektrophorese im Tris - Tricin - Puffersystem nach SCHÄGGER UND VON JAGOW (1987).

Die Gelelektrophorese nach SCHÄGGER UND VON JAGOW (1987) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen mit einem kleineren Molekulargewicht. Dazu wird ein anderes Puffersystem eingesetzt als für das diskontinuierliche Gelsystem (s. 3.2.3.1).

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Acrylamidstammlösung	Acrylamid 37,5:1
Tricin - Gelpuffer(pH 8,45)	3,0 M Tris 0,3 % SDS
Ammoniumpersulfat (APS)	10% (w/v) Ammoniumpersulfat _{aq}
Kathodenpuffer (pH 8,25)	0,1 M Tris 0,1 M Tricin 0,1 % SDS
Anodenpuffer (pH 8,9)	0,2 M Tris

Der Zusammenbau der Gießapparatur erfolgt wie unter 3.2.3.1 beschrieben. Um vier 10%ige Trenngele herzustellen, werden 20 ml Acrylamidlösung, 20 ml Tricin - Gelpuffer, 12,77 ml A. bidest und 6,9 ml Glycerol mit 300 µl APS entgast. Nach Zugabe von 30 µl TEMED werden die Gele sofort gegossen. Nach ca. 1 h sind die Gele vollständig auspolymerisiert und können für die Elektrophorese verwendet werden.

Für den Gelelektrophoreselauf werden der Kathoden - und Anoden - Puffer in die Kammer gefüllt. Das Auftragen der Proben und der Elektrophorese Lauf werden wie unter 3.2.3.1 beschrieben durchgeführt.

3.2.3.3 Coomassie - Blau Färbung der Proteine im Polyacrylamidgel

Der Farbstoff Coomassie - Blau bindet sich als tiefblauer Komplex unspezifisch an nahezu alle Proteine. Der Nachweis der Proteine liegt im Bereich von 0,1 - 0,2 µg Protein pro Bande.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Färbelösung	0,2 % Coomassie Brilliant Blue R 250
	10,0 % MEtOH
	40,0 % Eisessig

(bei 60°C im Wasserbad unter Rühren lösen, anschließend die abgekühlte Lösung über Faltenfilter filtrieren)

Entfärbelösung	10 % Eisessig
-----------------------	---------------

Nach der Methode von WEBER UND OSBORNE (1969) wird das Gel nach der Elektrophorese eine Stunde in einer mit Färbelösung gefüllten Färbeschale bei Rt inkubiert. Anschließend wird es über Nacht in Entfärbelösung entfärbt, wobei selbige mehrmals gewechselt wird.

3.2.3.4 Bestimmung des Molekulargewichtes

Da sich bei der Trennung im Polyacrylamidgel eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und der relativen Wanderungsstrecke der denaturierten Polypeptide ergibt, kann die molekulare Masse der Proteine mit Hilfe des Proteinmarkers (s. Tab. 2.14), der Proteine bekannten Molekulargewichtes und unterschiedlicher Größe enthält, anhand der Laufstrecke bestimmt werden.

Die verwendeten Protein *Molecular Weight Marker* sind in Abb. 3.2 dargestellt.

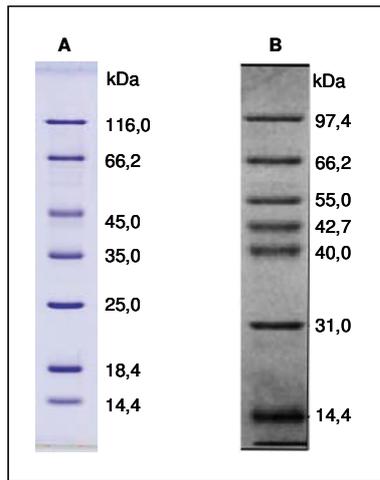


Abb. 3.2 Darstellung der verwendeten Protein Marker

A: Protein MW Marker SM0431;
B: Protein MW Marker V523A;

3.2.4 Nukleinsäure - Extraktion aus *N. benthamiana* - Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Extraktion der Nukleinsäuren verwendet. Die eine beruht darauf, dass Nukleinsäure nach einer Salzfällung mit einer organischen Extraktion gereinigt wird. Bei der anderen Methode wird die Nukleinsäure an eine Silika - Membran oder an Silikapartikel gebunden, gewaschen und durch eine Ethanol - Fällung von Verunreinigungen befreit.

3.2.4.1 Gesamtnukleinsäure Extraktion nach EDWARDS et al. (1991)

Diese Methode dient einer schnellen Extraktion pflanzlicher Nukleinsäure, die in ihrer Reinheit für eine PCR ausreichend ist.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Extraktionspuffer (pH 7,5)	200 mM	Tris
	250 mM	NaCl
	25 mM	EDTA
	0,5%	SDS

Mit dem Deckel von einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß werden 2 Blattscheiben aus den zu untersuchenden Pflanzen gestanzt. Nach Zugabe von 400 µl Extraktionspuffer werden die Blattscheiben direkt im Reaktionsgefäß mit Mikropistillen mazeriert. Die Proben werden 5 sec lang gründlich gemischt und anschließend die Proteine und Blattbestandteile durch Zentrifugation für 1 min mit 13000 UpM sedimentiert. Aus 300 µl des Überstandes wird die Nukleinsäure in einem neuen Reaktionsgefäß durch Zugabe von 300 µl Isopropanol für 2 min bei Rt gefällt und in nachfolgender Zentrifugation für 5 min

mit 13000 UpM sedimentiert. Nach Trocknung des Nukleinsäurepellets im Vakuumkonzentrator, wird es in 100 µl TE - Puffer (s. Tab. 2.6) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.4.2 DNA Extraktion aus *N. benthamiana* - Pflanzen mittels DNeasy® - Kit von Qiagen

Die DNA wird aus den *N. benthamiana* - Pflanzen mit dem DNeasy® - Plant Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Das Prinzip beruht auf einer Lyse der mechanisch zerstörten Zellen, bei gleichzeitigem Verdau der RNA. Nach der Lyse werden die Proteine und Polysaccharide mit Salz gefällt und zusammen mit den groben Zellbestandteilen mittels einer Qiashreder TM - Säule entfernt. Um die DNA weiter zu reinigen, wird sie in einer Säule an eine Silikamembran gebunden und mehrfach gewaschen. Mit einem Niedrigsalzpuffer wird die DNA anschließend von der Membran eluiert und kann mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden.

3.2.4.3 RNA - Extraktion nach VERWOERD et al. (1989) mit heißem Phenol

RNA ist sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse. Um die ubiquitär vorkommenden, sehr stabilen RNasen zu eliminieren, wird immer mit Handschuhen gearbeitet und jedes verwendete Gerät vorher für 4 h bei 180 °C - 200 °C sterilisiert.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Extraktionspuffer (pH 8,0)	100 mM LiCl
	100 mM Tris
	10 mM EDTA
	1% SDS
Hepespuffer (pH 7,0)	s. 3.1.3.1
Lithiumchlorid Lösung	4 M LiCl
Chloroform/Isoamylalkohol Gemisch	Verhältnis 24:1
RNase freies Wasser	20% DEPC _{aq} über Nacht rühren und anschließend autoklavieren

250 mg Blattmaterial werden in 350 µl Hepes Puffer gemörsert. 300 µl von diesem Pflanzenpresssaft werden in ein 2 ml Safelock Eppendorf

Reaktionsgefäß überführt, das 600 µl eines 80°C heißen Gemisches von Phenol und Extraktionspuffer im Verhältnis 1:1 enthält. Nach einer gründlichen, 30 sec langen Vermischung folgt eine Zentrifugation für 5 min mit 13000 UpM. Der wässrige Überstand wird mit demselben Volumen (ca. 300 µl) eines Chloroform / Isoamylalkohol - Gemisches ausgeschüttelt und erneut für 5 min mit 13000 UpM zentrifugiert. Nach Abnahme des wässrigen Überstandes wird die Nukleinsäure durch Zugabe von 1 Volumen Lithiumchlorid Lösung über Nacht bei 4°C gefällt und am nächsten Tag durch Zentrifugation bei 4°C für 20 min mit 13000 UpM (Zentrifuge: Sigma 4 K 15 , Rotor 12167) pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet im Vakuumkonzentrator nahezu vollständig getrocknet und in 175 µl RNase freiem Wasser resuspendiert.

Nach Zugabe von 20 µl RQ1 - Puffer (s. Tab. 2.6) wird die DNA mit 5 µl RQ1 DNase 30 min bei 37°C verdaut. Diese wird anschließend mittels Phenol/Chloroform Reinigung (s. 3.2.1.1) aus der Lösung entfernt, die RNA gefällt (s. 3.2.1.2) und nach Aufnahme in 50 µl TE - Puffer bei -20°C gelagert.

3.2.5 Amplifikation von Nukleinsäure

3.2.5.1 *Polymerase chain reaction (PCR) nach MULLIS (1986)*

Die *Polymerase chain reaction* (PCR) ist eine Technik der *in vitro* Amplifikation von spezifischen DNA Sequenzen durch simultane Synthese von DNA Strängen, beginnend an Primern, die spezifischen an die DNA angelagert werden.

An die beiden, durch Hitzeinkubation denaturierten DNA Stränge werden zwei Primer angelagert, die komplementär zu unterschiedlichen Enden der DNA sind und den zu amplifizierenden Abschnitt der DNA begrenzen, so dass eine hitzestabile DNA Polymerase (s. 3.2.11) von diesen Startermolekülen aus einen positiven und einen negativ gegensinnigen Strang synthetisieren kann. Wiederholt man den Vorgang der Denaturierung, Primeranlagerung und Synthese mehrmals, ist es möglich, DNA exponentiell (2^n , wobei n = Anzahl der Zyklen) zu amplifizieren. Durch eine letzte Inkubation bei einer Temperatur von 68 - 72°C wird die Polymerisation vervollständigt.

Die PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt, der einen automatisch temperierbaren Reaktionsraum hat und ein vorgegebenes Temperaturprogramm mit mehreren Zyklen durchführen kann. Dabei können die Zeiten und

Temperaturen der einzelnen Schritte pro Zyklus verändert werden. Bei einem Gradientencycler handelt es sich um einen Thermocycler, der die Verwendung verschiedener Temperaturen in den unterschiedlichen Spalten des Reaktionsraumes ermöglicht.

Die heute für die Amplifikation zur Verfügung stehenden hitzestabilen DNA Polymerasen (s. Tab. 2.7), die für mehrere Zyklen der PCR verwendet werden können, haben unterschiedliche Eigenschaften.

Die hitzestabile DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq* Polymerase), hat ein Temperaturoptimum von 72°C und eine Halbwertszeit von 5 min bei 97,5°C. Sie hat keine 3' - 5' Exonuklease Aktivität, aber die Funktion einer terminalen Transferase.

Die *Pfu* - Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* hat im Gegensatz dazu eine 3' - 5' - Exonuklease Aktivität, die als *proof - reading* bezeichnet wird. Dadurch ist sie in der Lage "falsch" eingebaute Nukleotide zu erkennen und zu entfernen, so dass die Fehlerrate ungefähr um den Faktor zehn sinkt. Die Funktion der terminalen Transferase fehlt diesem Enzym.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

dNTP je 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Für einen 50 µl Ansatz einer PCR werden folgende Reagenzien benötigt:

- je 1,0 µl 10 µM 3' und 5' Primer
- 0,5 µl 25 mM dNTP
- 5,0 µl 25 mM MgCl₂
- 5,0 µl 10 x *Taq* - Puffer (s. Tab. 2.7)
- 1,0 µl Plasmid (1:50 verd.) (s. 3.2.8.1.4)
- 0,1 - 1,0 µl *Taq* Polymerase (0,5 u pro Ansatz, s. Tab. 2.6)
- ad 50,0 µl mit A. bidest

(Werden PCR Ansätze mit kleineren Reaktionsvolumina durchgeführt, wird die Menge der einzelnen Komponenten analog zu den hier dargestellten 50 µl im Verhältnis angepasst)

Zur Kontrolle der PCR wird immer eine Positivkontrolle mit Plasmid - DNA durchgeführt, wodurch überprüft werden kann, ob die PCR korrekt abgelaufen ist. Des Weiteren wird eine Negativkontrolle durchgeführt, in der anstelle von DNA A. bidest eingesetzt wird, um zu überprüfen, ob die verwendeten Lösungen mit DNA verunreinigt sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Temperaturprogramme sind nachfolgend aufgelistet:

D3		Gradient	
Temperatur	Zeit [min:sec]	Temperatur	Zeit [min:sec]
1. 94 °C	4:30	1. 94 °C	2:00
2. 94 °C	1:00	2. 94 °C	0:15
3. 53 °C	0:30	3. 46 - 60 °C	0:30
4. 72 °C	1:30	4. 68 °C	1:30
5. Schritt 2 - 4	34 x wiederholen	5. Schritt 2 - 4	10 x wiederholen
6. 72 °C	10:00	6. 94 °C	0:15
7. 4 °C	∞	7. 46 - 60 °C	0:30
		8. 68 °C	3:00+0:05/Zyklus
		9. Schritt 6 - 8	25 x wiederholen
		10. 68 °C	7:00
		11. 4 °C	∞

Die Amplifikate werden zur Kontrolle elektrophoretisch aufgetrennt, indem 4 - 15 µl eines Ansatzes mit 4 µl Lade - Puffer auf ein 1%iges Agarose Gel aufgetragen werden (s. 3.2.2).

Wird im Ergebnisteil von einer Standard PCR gesprochen, meint dies, dass eine PCR mit dem oben aufgeführten Ansatz und dem Temperaturprogramm D3 durchgeführt wurde. Die jeweils verwendeten Primerkombinationen und die Größe der zu erwartenden Fragmente sind dem Ergebnisteil bzw. Anhang zu entnehmen.

3.2.5.2 Reverse Transkription (RT) - PCR nach CHELLY et al. (1989)

Bei diesem Verfahren wird RNA nach Anlagerung eines Primers, der am 3' Ende des Sinnstranges der RNA hybridisiert und damit die freie 3' - Hydroxylgruppe als Startstelle der Amplifikation für den negativ gegensinnigen Strang liefert, durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer PCR in doppelsträngige DNA amplifiziert. Die Methode ermöglicht dadurch z.B. die Amplifikation sinnpositiver einzelsträngiger RNA des PVY Genoms aus infizierten Pflanzen.

Eine der hier verwendete Reversen Transkriptasen ist die RNA - abhängige DNA Polymerase des *Avian myeloblastosis virus* (AMV), deren

Temperaturoptimum bei 42°C liegt. Sie besitzt eine RNase H - Aktivität, wodurch RNA aus DNA - RNA Hybridmolekülen, aber keine reine RNA, abgebaut wird. Im Gegensatz zur AMV - Reversen Transkriptase besitzt die *SuperscriptII*, die Polymerase des *Moloney murine leukemia virus* (MMuLV), eine sehr viel schwächere RNase H - Aktivität, wodurch cDNA effektiver angereichert werden kann. Beide Transkriptasen weisen allerdings mit einer Fehlinsertion pro 5×10^4 Basen eine relativ hohe Fehlerrate auf.

Bei der RT - PCR wird zwischen dem Einschritt - und dem Zweischnitt - Verfahren unterschieden. Bei dem schnelleren Einschritt Verfahren finden die cDNA Synthese durch die AMV - Reverse Transkriptase und die DNA Amplifikation durch die *Taq* Polymerase in einem Reaktionsgefäß im selben Puffer statt, wodurch die Gefahr von Kontaminationen verringert wird. Im Zweischnitt - Verfahren wird durch die MMuLV *SuperscriptII* - Polymerase der cDNA Erststrang produziert und die anschließende PCR (s. 3.2.5.1) in einem neuen Reaktionsgefäß durchgeführt. Der entscheidende Vorteil besteht darin, dass beide Reaktionen (RT und PCR) unter optimalen Pufferbedingungen durchgeführt werden können, was zu einer effizienteren und akkurateren Amplifikation führt, die es ermöglicht auch längere Fragmente (bis 5 kb) zu amplifizieren.

3.2.5.2.1 Einschritt RT - PCR

Für einen 50 µl Ansatz einer Einschritt RT - PCR werden folgende Reagenzien benötigt:

Je	1,0 µl	10 µM	3' und 5' Primer
	0,5 µl	25 mM	dNTP
	5,0 µl	25 mM	MgCl ₂
	5,0 µl		AMV - Puffer (s. Tab. 2.7)
	2,0 µl		Gesamt RNA (s. 3.2.4.3)
	0,1 µl		<i>Taq</i> DNA Polymerase (Sigma, 0,5 U)
	0,05 µl		AMV Reverse Transkriptase (0,5 U)
ad	50,0 µl		mit A. bidest

Temperaturprogramm: RT - PCR

Temperatur	Zeit [min:sec]	Bemerkung
1. 42 °C	45:00	cDNA Synthese
2. 94 °C	4:30	Denaturierung
3. 94 °C	0:30	
4. 37 °C	0:30	suboptimale Annealing - Temperatur
5. 72 °C	1:30	
6. Schritt 3 - 5 5 x wiederholen		
7. 94 °C	0:30	
8. 53 °C	0:30	optimale Annealing - Temperatur
9. 72 °C	1:30	
10. Schritt 7 - 9 32 x wiederholen		
11. 72 °C	10:00	
12. 4 °C	∞	

3.2.5.2.2 Zweischritt RT - PCR

An dieser Stelle wird ausschließlich die cDNA Synthese beschrieben an die sich eine Standard - PCR (s. 3.2.5.1) anschließt.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen**Erststrang - Puffer**

s. Tab. 2.7

DTT

100 mM DTT

1 µl RNA (s. 3.2.4.3) wird mit 10 µl A. bidest und 1 µl des Gegensinnstrang - Primers für 10 min bei 70 °C denaturiert. Nach Abkühlung auf 4 °C werden 4 µl des Erststrang - Puffers, 2 µl DTT und 1 µl dNTP (s. 3.2.5.1) dazu gegeben und vorsichtig gemischt. Nach Erwärmung des Gemisches auf 42 °C wird 1 µl *SuperscriptII* zugegeben und die cDNA 50 min bei 42 °C synthetisiert. Durch Hitzeinaktivierung bei 70 °C für 15 min wird die Synthese gestoppt und die cDNA bei -20 °C gelagert oder 1 µl direkt in einer PCR (s. 3.2.5.1) eingesetzt.

3.2.5.3 Hybridisierung synthetisch hergestellter einzelsträngiger Oligonukleotide

Um zwei einzelsträngig gegensinnige synthetisch hergestellte Oligomere klonieren zu können, müssen diese durch Hybridisierung miteinander in doppelsträngige Form gebracht werden.

Dazu werden pro Ansatz 20 µl der 100 pmolaren Lösungen der Oligonukleotide CG1 und CG2 (s. Tab. 2.11) in einem 0,5 µl Eppendorfgefäß gemischt und im Thermocycler zu einem Doppelstrang hybridisiert, in dem die anfängliche Anlagerungstemperatur von 95°C pro Zyklus in 0,5°C - Schritten auf 4°C gesenkt wird, wobei die Hybridisierungstemperaturen jeweils für 60 sec vorliegen.

Temperaturprogramm: Oligohybridisierung

Temperatur	Zeit [min:sec]
1. 95°C	10:00
2. 95°C - 0,5°C/Zyklus	1:00
3. Schritt 2 149 x wiederholen	
4. 4°C	∞

3.2.6 Aufreinigung von PCR - Produkten mit dem QIAquick® PCR Purification KIT

Mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits der Firma Qiagen können aus einem PCR Ansatz überschüssige Nukleotide, störende Salze und die *Taq* DNA Polymerase entfernt werden, die z.B. eine Ligation (s. 3.2.7.4) beeinträchtigen würden. Das Kit wird nach den Angaben des Herstellers verwendet, wobei die DNA - Fragmente in einer Säule an eine Silikamembran gebunden und Primer sowie Verunreinigungen mittels eines Waschschrattes entfernt werden. Nach Elution der DNA von der Membran mit einem Niedrigsalzpuffer, wird das PCR - Produkt direkt zur Ligation verwendet oder mehrere Monate bei -20°C gelagert.

3.2.7 Modifikation von DNA

3.2.7.1 DNA - Verdau mit Restriktionsendonukleasen

RE der Klasse II erkennen spezifisch gegenläufig gleichangeordnete Erkennungssequenzen von 4 - 6 Basenpaaren in doppelsträngiger DNA. Indem sie die Phosphodiesterbrücken der DNA an ihren spezifischen Erkennungssequenzen aufbrechen und dabei Doppelstrangbrüche produzieren, verdauen sie die DNA, wobei glatte oder einzelsträngige kohäsive Enden mit 3´- oder 5´ - überhängenden Nukleotiden entstehen. RE aus unterschiedlichen Organismen erkennen verschiedene Erkennungssequenzen.

Die Konzentration der RE wird in units/ μ l angegeben, wobei laut Definition 1 unit (u) Enzym in 60 min bei der jeweils optimalen Temperatur 1 μ g Substrat - DNA verdaut. Eine Inaktivierung ist entweder durch Hitze (15 min 65°C) oder durch Zugabe von EDTA (pH 8,0, Endkonzentration von 10 mM) möglich.

Um die DNA zu verdauen wird immer der vom Hersteller mitgelieferte Puffer verwendet. Sofern zwei RE verwendet werden, deren Pufferbedingungen inkompatibel sind, wird zuerst der Verdau mit einem Enzym im optimalen Puffer durchgeführt und nach einer Fällung (s 3.2.1.2) der Verdau mit dem zweiten Enzym unter ebenfalls optimalen Bedingungen durchgeführt.

Für einen Kontrollverdau werden 15 μ l Ansätze verwendet. Soll die DNA anschließend kloniert werden, wird der Verdau in einem 40 μ l Ansatz durchgeführt (s. Tab. 3.1).

Tab. 3.1 Zusammensetzung eines Ansatzes für den Verdau mit RE

	Kontrollverdau	Verdau für Ligationen
DNA	4,0 μ l (s. 3.2.8.1.4 und 3.2.8.2.5)	3 - 30 μ l (s. 3.2.8.1.4)
10 x Puffer	1,5 μ l	4 μ l
RE	je 1 U	je 2 U
A. bidest ad	15,0 μ l	40 μ l

Diese Ansätze werden für 60 - 90 min bei 37°C bzw. 56°C (entsprechend den Herstellerangaben) inkubiert.

3.2.7.2 *In vitro* DNA Neusynthese mit dem Klenow Fragment nach CLARK et al. (1987)

Bei dem Klenow Fragment handelt es sich um das 68 kDa C - terminale Polypeptid der DNA Polymerase I aus *E. coli*, bei dem durch proteolytische Spaltung die 5' - 3' Exonuklease Aktivität zerstört wurde, während die 5'-3' Polymerase Aktivität erhalten blieb. Da die 5' Enden nicht abgebaut werden, können durch letztere 5' überstehende, einzelsträngige DNA Enden, die z.B. durch Verdau mit RE entstehen, als Matrize bei einer Neusynthese benutzt werden, so dass doppelsträngige DNA mit glatten Enden entsteht. Dadurch wird zum einen die Zerstörung vorhandener Erkennungssequenzen von RE und aber auch die Erzeugung neuer Erkennungssequenzen ermöglicht. Des Weiteren können DNA Fragmente mit glatten Enden für eine Klonierung erzeugt

werden, wenn in Plasmiden keine komplementären Enden durch den Verdau mit RE erzeugt werden können.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Klenow - Puffer (s. Tab. 2.7)

dNTP s. 3.2.5.1

Nach Verdau der DNA mit RE in einem 40 µl Ansatz (s. 3.2.7.1) wird die DNA mit Natriumacetat / Ethanol gefällt und in 32 µl A. bidest aufgenommen. Nach Zugabe von 4 µl Klenow - Puffer und 4 µl dNTPs, werden 2 u Klenow Fragment zugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wird der Reaktionsansatz 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend Eis abgekühlt. Nach einer LM - Agarosegel - Elektrophorese (s. 3.2.2) werden die DNA Fragmente mit dem QIAEX II® Agarose Gel Extraction Kit gereinigt (s. 3.2.2.3).

3.2.7.3 DNA Dephosphorylierung in Anlehnung an SAMBROOK et al. (1989)

Die alkalische Phosphatase (*calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP) aus Kälberdarm entfernt die 5´ - Phosphatgruppe von Nukleinsäuren und verhindert dadurch das Rezirkularisieren von Plasmiden bei ungerichteten Klonierungen.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

CIAP - Puffer (10x) (s. Tab. 2.6)

EDTA - Lösung 500 mM EDTA

Zu einem Restriktions - Ansatz von 40 µl (s. Tab. 3.1) werden 5 µl A. bidest, 5 µl CIAP - Puffer und 1,5 u CIAP zugegeben. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 37 °C wird erneut 1 u CIAP zugegeben und der Ansatz für 45 min bei 56°C inkubiert. Durch Zugabe von 0,5 µl EDTA Lösung wird die Aktivität der Phosphatase gestoppt.

Um das Enzym aus der Lösung zu entfernen, wird das Volumen auf 95 µl mit A. bidest aufgefüllt und ein Proteinase K - Verdau (s. 3.2.1.3) durchgeführt. Nach anschließender Phenol/Chloroform - Reinigung (s. 3.2.1.1) und Natriumacetat / Ethanol - Fällung (s. 3.2.1.2) wird die Nukleinsäure in 40 µl TE - Puffer aufgenommen, nach Zugabe von 8 µl Ladepuffer in einem LM - Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit dem QIAEX II® Agarose Gel Extraction Kit (s. 3.2.2.3) gereinigt.

3.2.7.4 Ligation

Die T4 DNA - Ligase katalysiert die Bildung neuer oder gebrochener Phosphodiesterbindungen. Wurden durch einen Verdau von Nukleinsäure mit RE (s. 3.2.7.1) kohäsive Enden komplementärer Sequenz erzeugt, ist es möglich, diese endständigen Nukleotide mittels der T4 DNA - Ligase miteinander zu verbinden.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Ligationspuffer

s. Tab. 2.6

Für einen Ligationsansatz werden bei einem Gesamtvolumen von 20 µl folgende Volumina eingesetzt:

2,0 µl	Ligationspuffer
0,7 µl	T4 DNA - Ligase [1,5 U/µl]
2,0 µl	linearisierter gereinigter Vektor (s. 3.2.7.1)
5 - 10 µl	DNA - Fragment (s. 3.2.7.1 bzw. 3.2.7.2)
ad 20 µl	mit A. bidest

Nach Inkubation dieses Ansatzes über Nacht bei Rt, wird das rekombinante Plasmid in *E.coli* Zellen transformiert (s. 3.2.8.1).

3.2.8 Transformation von Bakterien

3.2.8.1 Transformation von *E. coli*

Um *E. coli* Zellen zu transformieren stehen zwei Methoden zur Auswahl. Bei der Methode nach SAMBROCK *et al.* (1989) wird die Kompetenz der Zellen DNA aufzunehmen, durch Mg^{2+} - Ionen erzeugt, bei der anderen Methode durch Rubidiumchlorid. Während die Methode nach SAMBROCK *et al.* (1989) höhere Transformationsraten liefert, liegt der Vorteil der zweiten Methode in der schnellen Durchführung.

3.2.8.1.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen nach SAMBROOK *et al.* (1989)

Die Transformation wird nach der durch SAMBROOK *et al.* (1989) leicht modifizierten DND - Methode nach HANAHAH (1983) durchgeführt. Dabei wird die Kompetenz der Zellen Plasmid - DNA aufzunehmen durch Mg^{2+} - Ionen erzeugt, die die Durchlässigkeit der Zellwand erhöhen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche *E. coli* - Stämme (s. Tab. 2.3) verwendet. Der Stamm JM110 besitzt im Gegensatz zum Stamm NM522 Mutationen in den *dam* - und *dcm* - Genen, so dass die von ihnen kodierten Methylasen nicht gebildet werden und somit keine Methylierung der beiden Nukleotide Adenin und Cytosin stattfindet. Der Vorteil des *E. coli* - Stammes NM522 liegt in einer höheren Ausbeute der Plasmid - DNA, sowie in einer geringeren Rekombinationsfrequenz.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

LB - Medium (pH 7,5)	1,0 % Peptone
	0,5 % Yeast Extract
	1,0 % NaCl
	1,5 % Agar
SOB (pH 6 - 7)	20,0 g/l Peptone
	5,0 g/l Yeast extract
	10,0 mM NaCl
	2,5 mM KCl
Mg²⁺ - Lösung	1 M $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$
	1 M $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
SOC Medium	1 ml 2 M Glucose
	1 ml 2 M $MgCl_2$
	ad 100 ml SOB

Nachfolgend aufgelistete Lösungen werden durch eine 0,45 μm Membran steril filtriert:

Transformationspuffer (TFB)	10 mM MES
pH 6,2 einstellen mit 10 M KOH	100 mM RbCl
	45 mM $MnCl_2 \cdot H_2O$
	10 mM $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$
	3 mM Hexamin Kobaltchlorid

DND Lösung (pH 7,5)	15,3 % (w/v) DTT
	90 % (v/v) DMSO
	1 % (v/v) 1M KOAc
	150 µl Aliquots bei -20°C aufbewahren

Der jeweils verwendete *E. coli* Wirtsstamm wird am Vortag aus der Dauerkultur auf LB_{fl} - Medium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Von dieser Übernachtkultur werden einige Kolonien steril mit einer Impföse abgenommen, in 1 ml SOB - Medium suspendiert, mit 29 ml SOB und 300 µl Mg²⁺ - Lösung in einen 2 l Erlenmeyerkolben überführt und auf einem Rundschüttler (250 UpM) bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ von 0,45 - 0,55 kultiviert. Die Zellen befinden sich zu diesem Zeitpunkt in der logarithmischen Wachstumsphase, in der sie am besten Plasmid - DNA aufnehmen können (COSLOY UND OISHI, 1973).

Die Bakteriensuspension wird in sterile Glasröhrchen überführt und 10 min auf Eis gekühlt, um das Zellwachstum zu stoppen. Anschließend werden die Zellen sedimentiert (12 min, +4°C, 1000 UpM; Zentrifuge Sigma 4 K 15; Rotor 1147) und in 10 ml TFB resuspendiert. Erneut werden die Zellen 10 min auf Eis gekühlt, unter gleichen Bedingungen sedimentiert (s.o.) und in 4 ml TFB aufgenommen. Nach vorsichtigem Vermischen mit zweimal je 140 µl DND, welches die Durchlässigkeit der Bakterienzellwände erhöht und somit die Aufnahme der Plasmid - DNA erleichtert, werden die Zellen erneut 15 min auf Eis gekühlt. Jeweils 200 µl dieser kompetenten Zellen werden zu jedem Ligationsansatz und zu 10 ng des Kontrollplasmides pBluescriptII pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Um die DNA - Aufnahme zu erhöhen, erfolgt eine Hitzeinduktion bei 42°C für genau 90 sec. Da die Zellen besonders effizient bei Temperaturen von 0°C - 5°C (COSLOY UND OISHI, 1973) die Plasmid DNA aufnehmen, werden sie anschließend 2 min auf Eis gekühlt, bevor jeweils 800 µl SOC Medium zu den Proben gegeben und die Ansätze für eine Stunde unter Schütteln (250 UpM) bei 37°C kultiviert (s. 3.2.8.1.2) werden.

3.2.8.1.2 Selektion transformierter *E. coli* Zellen

Während der einstündigen Inkubation wachsen die Bakterien ohne Selektionsdruck, so dass die Zellen plasmidlokalisierte Gene, die unter Kontrolle eines prokaryontischen Promotors stehen, exprimieren können. Bei den meisten Vektoren handelt es sich dabei um Proteine, die den Bakterien

eine Antibiotika - Resistenz verleihen (s. Tab. 2.4), so dass Zellen, die ein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben auf antibiotikahaltigem Medium wachsen können.

In Tab. 3.2 sind die einzelnen Resistenzgene, die von ihnen kodierten Proteine und deren Wirkungsweise, sowie das Antibiotikum gegen das sie gerichtet sind, aufgeführt.

Die Konzentrationen der eingesetzten Antibiotika, die zur Selektion rekombinanter Klone eingesetzt werden, ist Tab. 3.3 zu entnehmen. Diese werden nach dem Autoklavieren zu dem auf ca. 60°C abgekühlten Medium gegeben. Sofern hier ein Konzentrationsbereich angegeben ist, ist im Ergebnisteil die entsprechende Abkürzung mit der verwendeten Konzentration als Index angegeben.

Tab. 3.2 Antibiotika - Resistenzgene und ihre Wirkung

Resistenzgen	Kodiertes Protein	Herkunft	Antibiotikum	Wirkungsweise
<i>nptII</i>	Neomycin - Phospho - transferase	Transposon Tn5 (GARFINKEL <i>et al.</i> , 1981)	Kanamycin	katalysiert als Aminoglycosid-3'- Phospho-Transferase (TypII) ATP - abhängige Phosphorylierung der 3'-Hydroxylgruppe des Aminohexose - Rings bestimmter Aminoglycosid - Antibiotika und inaktiviert sie damit
<i>AadA</i> (Strep/Spec ^R) - Gen	Streptomycin - Adenyltrans - ferase	Plasmid R538 - 1 von <i>E. coli</i> (DAVIES UND SMITH, 1978)	Strepto- und Spectino- mycin	verhindert durch Modifikation der 3´ - OH Position des Streptomycin - N - methyl - L - glucosamin - Rings bzw. der 9 - OH Position des Spectinomycins die Bindung an die Ribosomen
<i>amp^r</i> bzw. <i>bla</i> _(TEM - 1)	TEM - 1 β - Laktamase		Ampicillin	spaltet den β - Lactam Ring des Ampicillins
<i>cm^R</i>	Acetyl - transferase	Transposon Tn9 (PROCTOR UND ROWND, 1982)	Chlor- amphenicol	katalysiert Acetyl - CoA - abhängige Acetylierung des Chloramphenicols und hebt damit dessen antibakterielle Wirkung auf
<i>tetA</i>	Membran - protein	Transposon Tn10 (BRYAN, 1984).	Tetracyclin	bewirkt die Ausschleusung von Tetracyclinen

Tab. 3.3 Übersicht über die verwendeten Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	Konzentration in LB - Medium	Abkürzung
Ampicillin	150 mg/l	LB _{Amp}
Tetracyclin	6 - 12 mg/l	LB _{Tet6} - LB _{Tet12}
Streptomycin	50 mg/l	LB _{Str}
Kanamycin	50 mg/l	LB _{Kan}
Chloramphenicol	25 mg/l	LB _{Camp}

Eine weitere Möglichkeit der Selektion, stellt das Blue - White - Screening dar. Dieses ist mit den Vektoren pBlueskriptII und pGEM® - T Easy möglich, da ihre Mehrfachklonierungsstelle in der α - Peptid kodierenden Region des *lacZ* - Gens liegt. Das α - Peptid umfasst die Aminosäuren 1 - 146 des *LacZ* - Gens und kann eine Deletion von 30 Aminosäuren nahe des N - Terminus des selben Gens im *E. coli* - Stamm NM522 komplementieren. Durch diese α - Komplementierung generieren beide Genabschnitte zusammen eine funktionsfähige β - Galaktosidase, die das farblose Substrat X - Gal, bei dem eine chromophore Gruppe β - 1 - 4 - glykosidisch an Glukose gebunden ist, zu einem Indoxyl - Derivat spaltet, welches an der Luft zu einem blauen Dibrom - Dichlor - Derivat oxidiert.

Die Expression beider Genabschnitte erfolgt durch Induktion mit IPTG, das als Lactose - Analogon an den Lac - Repressor bindet und dessen Dissoziation vom Operator bewirkt, woraufhin das Lac - Operon aktiviert und die Produktion der β - Galactosidase induziert wird. In Folge davon färben sich Bakterienkolonien, sofern beide Genfragmente exprimiert und komplementiert werden, auf einem Medium, dem IPTG und X - Gal zugesetzt wurden, blau. Kann die β - Galaktosidase nicht komplementiert werden, weil in den Mehrfachklonierungsort in der α - Peptid kodierenden Region des Vektors ein DNA - Fragment eingebaut worden ist, bleiben die Kolonien weiß gefärbt, so dass rekombinante Klone anhand der weißen Färbung ihrer Kolonien auf Indikatormedium leicht identifiziert werden können.

Zusammensetzung der benötigten Medien

Indikatormedium (LB_{AIX})	1 l LB _{Amp} (s. 3.2.8.1.1 und Tab. 3.3) nach Abkühlung auf ca. 60°C Zugabe von 40 mg X - Gal gelöst in 1 ml DMF 46 mg IPTG gelöst in 1 ml A. bidest
---	---

Anschließend werden je 100 µl von jedem Ligationsansatz auf je 3 - 5 Platten mit dem Drigalski - Spatel auf antibiotikahaltigem LB - Medium bzw. Indikatormedium plattiert und bei 37°C über Nacht kultiviert. Mit dem Kontrollplasmid wird eine Verdünnungsreihe angelegt (10^{-1} - 10^{-4}) und ausplattiert, wodurch die Transformationsrate in Kolonien/µg Plasmid - DNA bestimmt werden kann.

3.2.8.1.3 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen nach TANG *ET AL.* (1994) (Eiszellen)

Bei dieser Methode wird die Zellwanddurchlässigkeit durch Rubidiumchlorid erreicht.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Psi Medium (pH 7,6)	5 g Hefe Extrakt 20 g Peptone 5 g MgSO ₄ ad 1000 ml A. bidest
TFBI (pH 5,8, Essigsäure)	30 mM KaOAc 100 mM RbCl 10 mM CaCl 50 mM MnCl ₂ 15% (v/v) Glycerol
TFBII (pH 6,5)	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl 15% (v/v) Glycerol

1 ml einer 20 ml *E. coli* über Nacht Kultur in LB - Medium wird in 100 ml Psi Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer OD₅₅₀ von 0,48 inkubiert. Durch Abkühlen der Zellkultur

für 15 min auf Eis wird das Zellwachstum gestoppt. In einer anschließenden Zentrifugation für 5 min mit 2000 UpM (Zentrifuge: Sigma 4 K 15; Rotor 1147) werden die Zellen sedimentiert, nach Verwerfen des Überstandes in 40 ml TFBII resuspendiert und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Wie oben beschrieben werden die Zellen sedimentiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 4 ml TFBII gelöst. Sofort danach werden 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Transformation aufbewahrt.

Um die gefrorenen Zellen zu transformieren, werden sie langsam auf Eis aufgetaut und zum Ligationsansatz (s. 3.2.7.4) pipettiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis, wird das Zell - Ligations - Gemisch 90 sec auf 42°C erhitzt und nach Zugabe von 500 µl Psi - Medium 60 - 90 min bei 37°C und 250 UpM kultiviert. Die Selektion von 100 µl dieser Kultur erfolgt wie unter 3.2.8.1.2 beschrieben.

3.2.8.1.4 Isolierung rekombinanter Plasmid - DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid - DNA aus *E. coli* wird nach der durch SAMBROOK *et al.* (1989) modifizierten Methode von BIRNBOIM UND DOLY (1979) durchgeführt.

Das Prinzip der Methode beruht auf der selektiv alkalischen Denaturierung von genomischer DNA. Denn da aufspiralisierte zirkuläre DNA auch im pH - Bereich von 12,0 - 12,5 im doppelsträngigen Zustand verbleibt, wird bei der folgenden Neutralisation nur die genomische Bakterien - DNA präzipitiert, während die Plasmid - DNA in Lösung bleibt.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

LB_{II} - Medium (pH 7,5)	1,0 % Peptone
	0,5 % Yeast Extract
	1,0 % NaCl
Lösung A (pH 8,0)	15 mM Tris
	10 mM EDTA
	50 mM Glucose
Lösung B	200 mM NaOH
	1% (w/v) SDS
Lösung C (pH 4,8)	3,0 M NaOAc

Lösung D (pH 7,0)

100 mM NaOAc (pH 7,0)

50 mM Tris (pH 8,0)

TE/RNase

10 µg RNase/ml TE - Puffer (s. Tab. 2.6)

Mit einer Einzelkolonie der transformierten Zellen, die über Nacht auf Selektivmedium gewachsen ist, werden 3,5 ml des entsprechenden LB_{fl} - Selektivmediums (s. 3.2.8.1.2) im Reagenzglas angeimpft und ca. 6 h bei 37°C unter Schütteln (250 UpM) kultiviert.

2 ml dieser Bakteriensuspension werden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und 3 min mit 13000 UpM sedimentiert. Das Pellet wird in 200 µl Lösung A resuspendiert und 15 min bei Rt inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Lösung B wodurch die Bakterienzellwände aufgebrochen werden, wird der pH - Wert durch Zugabe von 300 µl Lösung C abgesenkt. Während der folgenden 30 minütigen Inkubation auf Eis, werden die Bakterienproteine und Zellwandbestandteile ausgefällt und durch zweimal je zehnminütige Zentrifugation mit 13000 UpM sedimentiert und verworfen. Durch vorsichtiges Mischen der Überstände mit 600 µl Isopropanol wird die Plasmid - DNA der Probe gefällt und wie oben beschrieben pelletiert. Das Pellet wird in 200 µl Lösung D resuspendiert und mit 400 µl EtOH präzipitiert. Das durch anschließende Sedimentation (10 min, 13000 UpM) gewonnene DNA Pellet wird durch Vakuumzentrifugation getrocknet und in 100 µl TE/RNase aufgenommen.

Da die Möglichkeit besteht, dass die T4 DNA - Ligase die beiden Enden des Vektors miteinander verbindet, ohne dass das zugegebene Fragment eingefügt wird, wird ein Restriktionsverdau mit den aus der Klonierung gewonnenen Plasmidpräparationen durchgeführt (s. 3.2.7.1), um zu überprüfen, ob das gewünschte Fragment in den Vektor integriert wurde.

3.2.8.2 Transformation von *A. tumefaciens*

3.2.8.2.1 Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* Zellen

Um *A. tumefaciens* - Zellen zu transformieren, wird die Methode der Elektroporation nach POTTER (1988) verwendet. Im Vergleich zu der Transformation der *E. coli* - Stämme wird hier die Aufnahme der Fremd - DNA durch kompetente Zellen durch einen elektrischen Impuls und nicht durch einen Hitzeschritt bewirkt.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

LB_{Str} - 5_{NaCl} - Medium (pH 7,5)	10 g Peptone
	5 g Yeast Extract
	5 g NaCl
	15 g Agar
Hepes - Puffer I (pH 7,0)	1 mM Hepes
Glycerol	10% (v/v) Glycerin

Der Agrobakterien des Stammes LBA4404 werden aus der Dauerkultur fraktioniert auf LB_{Str} - Medium (s. Tab. 3.3) ausgestrichen und für 48 h bei 28°C inkubiert. Dann wird eine Einzelkolonie mit dem Zahnstocher in 20 ml LB_{Str} in einem 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und bei 28°C auf dem Schüttler (250 UpM) über Nacht kultiviert. 10 ml dieser Bakterienkultur werden am nächsten Tag in 500 ml LB_{Str} - 5_{NaCl} - Medium in einem 1 l Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 28°C unter Schütteln (250 UpM) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 kultiviert. Die Salzkonzentration wird hier auf 5 g NaCl/l gesenkt, da eine hohe Salzkonzentration während der Elektroporation zu einer Entladung führen kann, die die Transformationsausbeute negativ beeinflusst.

Um das Wachstum der Bakterien zu stoppen, wird der Erlenmeyerkolben für 15 - 30 min auf Eis gestellt. Die Bakterienkultur wird dann in zwei vorgekühlten Sorvallbechern im Festwinkelrotor mit 6000 UpM (Zentrifuge: Sorvall® RC5B; Rotor: SLA 1500) bei 4°C für 15 min sedimentiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes, werden die Zellen auf Eis gekühlt und jeweils in 500 ml kaltem Hepes - Puffer I resuspendiert um die Zellen zu waschen. Nach Sedimentation der Zellen für 15 min mit 6000 UpM (s.o.) und Verwerfen des Überstandes werden die Zellen erneut in 300 ml kaltem Hepes - Puffer resuspendiert und wie oben beschrieben sedimentiert. Nach Abnahme des Überstandes wird das Bakterienpellet in 20 ml vorgekühltem Glycerol aufgenommen und in kleinere Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 4°C mit 6000 UpM (Zentrifuge: Sorvall® RC5B; Rotor: SS 34) für 15 min und Verwerfen des Überstandes, wird das Bakterienpellet erneut in 2 ml Glycerol aufgenommen und in 40 µl Aliquots in 1,5 ml Eppendorf - Reaktionsgefäße überführt. Dieses verhindert beim anschließenden Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und der Lagerung bei -80°C das Platzen der Bakterienzellen.

3.2.8.2.2 Elektroporation nach POTTER (1988)

Bei der Elektroporation werden durch den elektrischen Impuls temporäre Poren in der Cytoplasmamembran erzeugt, wodurch kurzzeitig die Permeabilität der Agrobakterienzellwand erhöht wird (POTTER *et al.*, 1984). Dadurch wird die Aufnahme der DNA durch passive Diffusion ermöglicht.

Um die Fremd DNA in die kompetenten Agrobakterien - Zellen zu transferieren, werden folgende Parameter am Elektroporator (Invitrogen II) eingestellt:

- armed position
- 50 μ F
- 150 Ohm

An dem Gerät wird mittels einer Spannungsquelle eine Spannung von 1500 V und eine Stromstärke von 25 mA bei einer Leistung von 25 W angelegt. Um sicherzustellen, dass die gewünschten Parameter vollständig umgesetzt werden, wird das Gerät vor der eigentlichen Elektroporation zweimal be- und entladen und sämtliche Parameter an dem Gerät überprüft.

Um die kompetenten Agrobakterien zu transformieren, werden die Zellen auf Eis aufgetaut und je 1 - 3 μ l der Fremd DNA zugegeben. Mittels vorsichtigem Aufnehmen und Abgeben der Lösung mit der Eppendorfpipette wird die DNA mit den Zellen gemischt. Anschließend wird das Zell - DNA Gemisch in eine vorgekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette überführt. Nachdem die Küvettenkontakte sorgfältig abgetrocknet wurden, wird die Küvette in den Elektroporator eingesetzt und durch Betätigen des *Pulse* Schalters der elektrische Impuls ausgelöst. Die Küvette wird anschließend sofort aus dem Elektroporator entnommen und 1 ml SOC zum Ansatz gegeben. Nach gründlicher Durchmischung mit einer vorgekühlten Pasteurpipette wird die Agrobakterien - Lösung in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 3 - 4 h bei 28°C auf dem Schüttler mit 250 UpM kultiviert.

Anschließend werden je 100 μ l dieser Kultur mit dem Drigalskispatel auf LB_{Str+Tet6} - Platten (s. 3.2.8.2.3) ausplattiert und 24 - 72 h bei 28°C kultiviert.

Als Negativ - Kontrolle wird *A. bidest* zur Elektroporation der Bakterienzellen verwendet, die anschließend sowohl auf LB_{Str-} als auch auf LB_{Str+Tet6-} Medium kultiviert werden. Dadurch kann zum einen überprüft werden, ob die Agrobakterien die Elektroporation unbeschadet überstanden haben und ob die Tetracyclin Konzentration hoch genug war, um das Wachstum nicht rekombinanter Agrobakterien zu unterbinden.

3.2.8.2.3 Selektion transformierter *A. tumefaciens* - Zellen

Die Selektion transformierter Zellen erfolgt wie unter 3.2.8.1.2 beschrieben. Da der *A. tumefaciens* - Stamm LBA4404 das Resistenzgen *aadA* trägt, werden die Zellen mit LB - Medium selektiert, dem neben 6 mg Tetracyclin/ l, was durch das *tetA* - Gen kodierte Protein des binären Vektors pLX_222 detoxifiziert wird, noch 25 mg Streptomycin/ l LB (s. Tab. 3.2) zugesetzt.

In der anschließenden Flüssigkultur wird die Tetracyclinkonzentration auf 12 mg pro Liter LB_{fl} erhöht.

3.2.8.2.4 Isolierung rekombinanter Plasmid - DNA aus *A. tumefaciens*

Um zu überprüfen, ob die *A. tumefaciens* - Zellen das rekombinante Plasmid aufgenommen haben, wird das unter 3.2.8.1.4 beschriebene Protokoll leicht modifiziert durchgeführt.

Zusammensetzung der Lösungen

Lysispuffer A	4 mg Lysozym / ml Lösung A (s. 3.2.8.1.4)
Mit Lösung B equilibriertes Phenol	1 ml Lösung B (s. 3.2.8.1.4) mit 2 ml Phenol vortexen und das Phenol unterhalb der Trennlinie abnehmen
Lösung C	(s. 3.2.8.1.4)
Lösung D	(s. 3.2.8.1.4)

Von der Übernacht - Kultur werden mit einem Zahnstocher 3 ml LB_{Str+Tet12} im Reagenzglas angeimpft und mit 250 UpM bei 28°C für 48 h inkubiert. 2 ml dieser Vorkultur werden im 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß für 2 min mit 13000 UpM sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die pelletierten Bakterien in 100 µl eiskaltem Lysispuffer A vorsichtig resuspendiert und 10 min bei Rt inkubiert, wodurch die Bakterienzellwand der Agrobakterien effizient abgebaut wird. Nach Zugabe von 200 µl Lösung B und vorsichtigem Mischen wird erneut 10 min bei Rt inkubiert. Anschließend werden 30 µl mit Lösung B equilibriertes Phenol zugegeben und alles auf dem Vortex vermischt. Nach Zugabe von 150 µl Lösung C und vorsichtigem Vermischen werden die Proteine 15 min bei -20°C gefällt und anschließend durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 4°C mit 13000 UpM sedimentiert. Der wässrige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 70% EtOH 15 min bei

-20°C gefällt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 4°C mit 13000 UpM (Sigma 4 K 15; Rotor 12167), wird der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig in 300 ml Lösung D resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml EtOH_{abs} zur Fällung der DNA für 15 min bei -20°C wird erneut 10 min bei 4°C mit 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die pelletierte Nukleinsäure mit 70%igem EtOH gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation bei 4°C mit 13000 UpM (s. o.) wird das Pellet im Vakuumkonzentrator getrocknet. Nach Resuspendierung in 50 µl TE/RNase wird ein Kontrollverdau (s. 3.2.7.1) durchgeführt und die Nukleinsäure bei -20°C gelagert.

Ist eine Identifizierung positiver Klone anhand des Kontrollverdaus aufgrund der schlechten Qualität der Plasmidpräparation nicht möglich, werden 2 - 4 µl davon mit *A. bidest* auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und in *E. coli* Zellen (NM522) "zurück" transformiert, wobei die Selektion mit LB_{Tet12} - Medium durchgeführt wird.

3.2.8.2.5 Herstellung von *A. tumefaciens* - Dauerkulturen

Die Agrobakterienkulturen, die die rekombinanten Plasmide tragen, sollen unbegrenzt lagerbar und vermehrbar sein. Dies wird durch Zugabe von Glycerin erreicht, welches die zellschädigende Eiskristallbildung beim Tiefrieren verhindert und somit eine Kultivierung der Zellen nach dem Auftauen ermöglicht.

Benötigte Lösung

Steriles Glycerin (87%)

Um eine Dauerkultur herzustellen, werden 850 µl *A. tumefaciens* - Flüssigkultur mit 150 µl 87%igem Glycerin vermischt.

Die Aufbewahrung der Dauerkulturen erfolgt nach sorgfältigem Vermischen bei -20°C.

3.2.9 Transformation von *N. benthamiana* - Pflanzen nach HORSCH *et al.* (1985)

Um fremde DNA stabil ins Genom von *N. benthamiana* - Pflanzen zu integrieren wird eine leicht modifizierte Methode der Agrobakterien - vermittelten Blattscheibentransformation nach HORSCH *et al.* (1985) durchgeführt, bei der die Fähigkeit des Gram - negativen Bodenbakteriums *A. tumefaciens*,

plasmidlokalisierte, genetische Information in das Genom von dikotylen Pflanzenzellen einschleusen zu können, genutzt wird.

Das Agrobakterium besitzt ein tumorinduzierendes Plasmid (Ti - Plasmid) auf dem u.a. die Virulenzregion und die Transfer - DNA (T - DNA) lokalisiert sind, die durch eine Reihe bakterieller Ti - Plasmid lokalisierter Virulenzgene (*vir*-Gene) gesteuert in das pflanzliche Genom transferiert wird.

Nach der Anlagerung von *A. tumefaciens* an die Pflanzenzelle durch die Bildung von bakteriellen Adhäsinen, werden konstitutiv VirA - und VirG - Proteine gebildet, die als Sensor und Regulatorkomponente eine funktionelle Einheit in der Bakterienmembran darstellen. Das *virA* - Gen ist ein Rezeptor für phenolische Substanzen, wie Acetosyringon, die nach Verwundung durch die Pflanzenzelle freigesetzt werden und gebunden einer Autophosphorylierung unterliegt, die zur Transkriptionsaktivierung und Expression aller weiteren *virD*, *virE* und *virB* - Gene führt (KEMPKEN UND KEMPKEN, 2000). Die T - DNA, die bei der Infektion einer Zelle als Einzelstrang in das Pflanzengenom integriert wird, wird von zwei kurzen Bordersequenzen (eine Wiederholung von 25 bp) flankiert, die von den Genprodukten der *virD1*-und *virD2*- Gene erkannt werden. Diese induzieren als Endonukleasen Einzelstrangbrüche in der DNA, die als Initiations- und Terminationssignale für die Synthese eines T - DNA Einzelstranges dienen, an dessen 5' - Ende kovalent das VirD2 - Protein bindet. Um eine Reassoziierung mit dem Ti - Plasmid zu verhindern und den Transport durch die Zellwände und verschiedenen Membranen zu ermöglichen, binden auch Proteine des VirE2- Operons an diesen Einzelstrang, entfalten ihn in eine transportgängige Konformation und schützen ihn insbesondere vor Nukleasen. Die mit der T - DNA assoziierten VirD2- und VirE2- Proteine besitzen des Weiteren Kernlokalisationssequenzen, die dem Komplex die Aufnahme durch Kernmembranporen in den Zellkern erlauben.

Die elf Genprodukte des VirB - Operons, die hohe strukturelle und funktionelle Homologien zu Proteinen aufweisen, die an der bakteriellen Konjugation, der DNA Aufnahme und dem Proteinexport beteiligt sind, bilden wahrscheinlich den für die Aufnahme erforderlichen Membran - assoziierten Exportapparat.

Die Integration in die pflanzliche DNA erfolgt dann zufällig an vorhandenen Strangbrüchen durch illegitime Rekombination (MAYERHOFER *et al.*, 1991), wobei transkriptionsaktive Bereiche als Integrationsorte bevorzugt werden.

Dabei lagert sich das 5' Ende der einzelsträngigen T - DNA (TINLAND *et al.*, 1994) an einen zufälligen Bruch der Pflanzen - DNA an und das 3' - Ende wird durch Reparations - und Rekombinationsenzyme der Pflanze in deren DNA eingebaut. Der durch Torsionskräfte verursachte Bruch im komplementären pflanzlichen DNA - Strang bewirkt dann durch eine Auffüllreaktion eine Neusynthese am T - DNA Template.

Heute werden für die Transformation sogenannte entschärfte Plasmide verwendet, bei denen die Tumorbildung durch Veränderung der Ti - Plasmide und der T - DNA unterdrückt ist und die Gene für die Expression der Opinsynthetisierenden Proteine entfernt wurden. Dafür wurden dominant selektive Markergene unter Kontrolle des in Pflanzen aktiven *nos* Promotors und *nos* Terminators eingefügt, die eine Selektion der transformierten Zellen ermöglichen.

3.2.9.1 *In vitro* Anzucht von *N. benthamiana* - Pflanzen

Um Blattscheiben von *N. benthamiana* - Pflanzen zu transformieren, wird steriles Blattmaterial benötigt, welches durch *in vitro* Anzucht der Pflanzen produziert wird.

Dazu müssen *N. benthamiana* - Samen oberflächensterilisiert werden, um die Samenschale von Bakterien und Pilzsporen zu befreien, die sich auf dem zuckerhaltigen MS - Medium ebenfalls vermehren würden.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Natriumhypochlorid - Lösung 1,3% Natriumhypochlorid_{aq} (bezogen auf aktives Chlor)

Ca. 100 *N. benthamiana* - Samen werden in ein 1,5 ml Eppendorf - Reaktionsgefäß gefüllt und 10 min mit 1 ml 1,3%iger Natriumhypochlorid - Lösung geschüttelt, wodurch das aktiv abgespaltene Chlor organische Verbindungen denaturiert. Anschließend wird das Natriumhypochlorid mit einer Pipette abgenommen und die Samen dreimal kurz mit 1 ml 70%igem EtOH gewaschen. Zum Entfernen von EtOH - Resten, die eine Keimung der Samen verhindern würden, werden die Samen dreimal 1 min mit je 1 ml A. bidest gewaschen.

Anschließend werden jeweils 5 - 6 Samen in Magenta Boxen ausgelegt, die mit ca. 50 ml sterilem MS - Medium (s. 3.2.9.2.1) befüllt wurden. Nach einer

mindestens drei monatigen Kultivierung im Gewebekulturschrank bei 26°C mit 16 Stunden Beleuchtung mit photosynthetisch aktivem Licht, werden die Pflanzen für die Transformation verwendet.

3.2.9.2 Transformation

Das Prinzip der Pflanzentransformation beruht darauf, dass die Pflanzenzellen besonders regenerativer Organexplantate wie Blattscheiben mit rekombinanten Agrobakterien inkubiert werden können, wobei die T - DNA stabil ins pflanzliche Genom integriert wird. Nach Abtöten der Agrobakterien durch Antibiotika, können die transformierten Zellen aufgrund ihrer Totipotenz auf phytohormonhaltigem Selektivmedium zu ganzen Pflanzen regeneriert und später an Gewächshausbedingungen adaptiert werden.

3.2.9.2.1 Anzucht von *A. tumefaciens* und Blattscheibentransformation

Damit die Blattscheiben Transformation möglichst effektiv verläuft, müssen sich die Agrobakterien in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die Anzucht erfolgt bei 26°C, da bei dieser Temperatur die Insertion der T - DNA besonders effizient stattfindet (s. 3.1.3.2).

Zusammensetzung der benötigten Lösungen und Medien

MS - Medium (pH 5,9)	0,750 % Plant Agar
	2,000 % Saccharose
	0,475 % MS
MS_{fl} - Medium (pH 5,9)	2,000 % Saccharose
	0,475 % MS
Auxin - Stammlösung	1 mg NAA/ 200 µl 1 N NaOH
Cytokinin - Stammlösung	1 mg BAP / 20 µl 1 N NaOH

(Die autoklavierbaren Phytohormon - Stammlösungen können bis zu 2 Monate bei 4 °C gelagert werden.)

T1 - Medium	1 mg BAP
	0,1 mg NAA
	500 mg Claforan
	50 mg Kanamycin
	pro 1 l MS - Medium

T2 - Medium	250 mg Claforan 50 mg Kanamycin pro 1 l MS - Medium
Claforanlösung	500 mg Claforan /l A. bidest

In Tab. 3.4 sind die Antibiotika - Konzentrationen aufgelistet, die zur Selektion transformierter Blattscheiben verwendet werden.

Tab. 3.4 Konzentration der Antibiotika bei der Pflanzentransformation

Antibiotikum	Antibiotikakonzentration	Abkürzung
	MS - Medium	
Kanamycin	50 - 400 mg/l	MS _{Kan50} - MS _{Kan400}
Claforan (Cefotaxim)	250 - 500 mg/l	MS _{Cef250} - MS _{Cef500}

Die Agrobakterien, die das rekombinante binäre Plasmid tragen, werden aus der Dauerkultur fraktioniert auf LB_{Str+Tet6} - Medium ausgestrichen und 24 - 72 h bei 26°C kultiviert. Anschließend werden 4 ml LB_{Str+Tet8} mit einer Einzelkolonie angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 auf dem Schüttler mit 250 UpM bei 26°C angezogen. Von dieser Bakterienkultur werden 200 µl in einer Petrischale mit 15 ml MS_{fl} - Medium gemischt und 10 - 15 frisch geschnittene Blattstücke mit der Blattunterseite nach oben auf die Lösung gelegt. Während der nachfolgenden Inkubation im Dunkeln bei 26°C für 48 Stunden, können die Bakterien die T - DNA in die genomische DNA der verletzten Zellen einschleusen (s. 3.1.3.2). Um die Agrobakterien anschließend von den Blattstücken zu entfernen, werden die Blattstücke drei bis fünfmal mit Claforanlösung gewaschen. Dessen Wirkstoff Cefotaxim verhindert die Vernetzung von Peptidoglykanen durch Bindung und Inaktivierung von Transpeptidasen und stört dadurch die Zellwandsynthese der Bakterien, so dass keine weitere Vermehrung der Agrobakterien stattfinden kann.

Nach dem Waschen werden max. 10 Blattstücke für zwei Wochen bei 26°C mit der Blattunterseite nach oben so auf T1 - Medium kultiviert, dass besonders die Blattränder Kontakt zum Selektiv - Medium haben, damit sich keine Kalli aus nicht transformierten Zellen ausbilden. Nach 2 Wochen werden die Blattstücke auf neues T1 - Medium umgesetzt, wobei abgestorbene Blattstückchen oder solche mit auswachsenden Agrobakterienkulturen entfernt werden.

Um zu vermeiden, dass später mehrere Klone einer transformierten Zelle regeneriert und untersucht werden, werden die undifferenziert ergrünenden Kalli auf T1 - Medium vereinzelt, bevor das Sprosswachstum einsetzt. Nach ca. 3 - 4 Wochen erscheinen die ersten Sprosse aus den undifferenzierten Kalli und pro Kallus wird ein Spross mit einem scharfen Skalpell abgeschnitten und auf T2 - Medium in 30 ml Reagenzgläsern mit Kunststoffkappe umgesetzt. Dort entwickeln sich aus den vordifferenzierten Sprossen aufgrund der Totipotenz der pflanzlichen Zellen Wurzeln.

3.2.9.2 Adaption der Sprosse an Gewächshausbedingungen

In den Reagenzgläsern herrscht ein optimales Mikroklima mit konstanter Luftfeuchte, in dem die Pflanzen nur eine dünne Kutikula ausbilden. Deshalb muss deren Adaption an die Gewächshausbedingungen (s. 3.1.2) schrittweise erfolgen.

Sind die Pflanzen ca. 4 cm hoch und haben ein Wurzelgeflecht ausgebildet, werden die Pflanzen aus den Röhrchen entnommen und das T2 - Medium von den Wurzeln mit Leitungswasser abgewaschen. Bevor sie in angefeuchtete Fruhstorfer Einheitserde Typ P in 10er Töpfe überführt werden, werden die Wurzeln in eine Benomyl - Lösung (0,1 %) getaucht um einen Pilzbefall zu verhindern. Um die Sprosse anfänglich vor einer zu hohen Verdunstung zu schützen, wird eine Plastiktüte über den Topf gebunden, die nach einer Woche schrittweise durch Aufschneiden geöffnet wird. Nachdem die Tüte oben vollständig geöffnet ist und die Pflanze nach ca. 48 h keine Welkeerscheinung zeigt, wird die Tüte abgenommen und die Pflanze bis zur Samenreife kultiviert.

3.2.9.3 Samenernte

Die zwittrigen *N. benthamiana* - Pflanzen blühen nach ca. 3 Monaten und setzen aufgrund der Möglichkeit sich selbst zu bestäuben Samenkapseln an. Diese werden nach dem Abreifen geerntet und für vier Wochen in Papiertüten getrocknet, in denen ein stetiger Luftaustausch gesichert ist. Durch Sieben werden die Samen von den Samenkapseln getrennt und in Eppendorfreaktionsgefäßen luftdicht bei Rt gelagert.

3.2.9.4 Bestimmung der Anzahl der Integrationsorte

Die Vererbung des inserierten Fremd - DNA an die Nachkommen, liefert Aufschluss darüber, an wie vielen Loci das Transgen in das pflanzliche Genom integriert wurde.

Die transgenen Pflanzen sind, im Gegensatz zu nicht transgenen, durch das eingebrachte *nptII* - Gen Kanamycin resistent. Dadurch bleiben die Keimblätter transgener Pflanzen nach der Samenkeimung auf Kanamycin - haltigem Selektivmedium grün, während nicht transgene Pflanzen durch die Störung der Chlorophyllsynthese chlorotisch erscheinen.

Um eine Aussage über die Anzahl der Integrationsorte treffen zu können, wird eine Spatelspitze voll Samen oberflächensterilisiert (s. 3.2.9.1) und in Petrischalen auf MS_{Kan400} - Medium (s. 3.2.9.2.1) ausgelegt. Nach ca. einer Woche werden die Keimblätter der nicht transgenen Pflanzen chlorotisch und das Verhältnis von transgenen zu nicht transgenen Nachkommen wird bestimmt. Zur Kontrolle werden Samen einer nicht transgenen *N. benthamiana* - Linie auf dem Selektiv - Medium ausgelegt, wodurch überprüft wird, ob die Kanamycin Konzentration zur Selektion ausreichend hoch ist.

Das Verhältnis der nichttransgenen zu transgenen Nachkommen wird anschließend im χ^2 - Test analysiert. Da nur zwei Phänotypen auftreten, also der Freiheitsgrad gleich 1 ist, wird die Yates Korrektur auf Kontinuität durchgeführt und die χ^2 - Werte nach folgender Formel berechnet:

$$\sum_{i=1}^n = \frac{(B_i - E_i - 0,5)^2}{E_i}$$

Dabei gibt B die Anzahl der Beobachtungen an, während mit E die Anzahl der Erwartungen bezeichnet wird. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 5 % und einem Freiheitsgrad von 1, kann die getestete Annahme nicht verworfen werden, wenn der berechnete χ^2 - Wert kleiner oder gleich 3,84 ist.

3.2.9.5 Serologischer Nachweis viraler Proteine in *N. benthamiana* - Pflanzen

Der spezifische Nachweis viraler Proteine in Pflanzen kann mittels Enzym - linked - immunosorbent Assay (ELISA), Western Blotting und Tissue Print durchgeführt werden. Durch den Einsatz virusspezifischer Antikörper kann mit

dem ELISA das Vorkommen des Proteins detektiert werden, während das Western Blotting zusätzlich eine Aussage über das Molekulargewicht des Proteins ermöglicht. Durch den Tissue - Print kann die Lokalisierung des viralen Proteins im Pflanzengewebe bestimmt werden.

3.2.9.6 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) nach CLARK UND ADAMS (1977)

Für den Nachweis viraler Hüllproteine in *N. benthamiana* - Pflanzen wird der serologische ELISA nach CLARK UND ADAMS (1977) durchgeführt, bei dem die viralen Proteine aufgrund einer spezifischen Antigen - Antikörper Reaktion durch einen Farbnachweis identifiziert werden können.

Bei dem direkten Nachweis mit dem Plate trapped Antigen - ELISA (PTA - ELISA) werden die viralen Proteine direkt an Polystyrol - Mikrotiterplatten mit hoher Proteinbindekapazität gekoppelt und mittels viruspezifischer Antikörper nachgewiesen. Diese Antikörper sind mit alkalischer Phosphatase konjugiert (Virus - IgG - AP), die die Phosphatgruppe von farblosem p - Nitrophenylphosphat abspaltet, wodurch im alkalischen Milieu gelbes Nitrophenol entsteht. Die Zunahme der gelben Farbe ist ein Maß für die Menge an gebundenem Enzym bzw. enzymgekoppeltem Antikörper und kann spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden.

Als Positivkontrolle werden im ELISA nicht transgene Pflanzen verwendet, die zum selben Zeitpunkt wie die transgenen Testpflanzen mit dem jeweiligen Virus infiziert wurden. Für die Negativkontrolle wird Blattmaterial nicht infizierter nicht transgener Pflanzen eingesetzt.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

PBS (pH 7,4)	0,137 M NaCl
	1,044 M NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O
	2,70 mM KCl
	1,44 mM KH ₂ PO ₄
Beschichtungspuffer (pH 9,6)	15 mM Na ₂ CO ₃
	34 mM NaHCO ₃
Probenpuffer PBS - NaDIECA (pH 9,6)	10 mM NaDIECA
	in 1x PBS

Waschpuffer PBS - T	0,05% Tween ₈₀ in 1x PBS
Antikörperpuffer PBS - TPO	2% PVP 0,2% Ovalbumin in PBS - T
Substratpuffer (pH 9,8)	1 mg/ml p-Nitrophenyl- phosphat in 10% Diethanolamin

Ca. 100 mg des zu untersuchenden Blattmaterials werden mit der Polaehe Pflanzenpresse zerkleinert, durch Zugabe von 750 µl PBS - NaDIECA von den Walzen abgespült und in einem Eppendorfreaktionsgefäß aufgefangen. Durch eine Zentrifugation für 1 min mit 13000 UpM werden die groben Pflanzenbestandteile sedimentiert. Von dem Überstand, in dem sich die viralen Proteine befinden, werden in zwei Vertiefungen der Mikrotiterplatte je 100 µl pipettiert und die viralen Proteine durch Inkubation bei 4°C über Nacht an das Polystyrol gebunden. Durch fünfmaliges Waschen mit Waschpuffer im Mikroplate Washer für je 5 Minuten werden nicht gebundene Proteine entfernt. In jede Vertiefung werden 100 µl des Virus - IgG - AP - Konjugates (1:200 mit PBS - TPO verdünnt) pipettiert und für 4 h bei 37°C an das Antigen gebunden. Dabei werden freie Anlagerungsstellen durch das im Puffer enthaltene Tween, Polyvinylpyrrolidon und Ovalbumin abgesättigt. Nachdem, durch erneutes Waschen (s.o.), nicht gekoppelte Antikörper entfernt wurden, werden jeweils 100 µl Substratlösung in die Vertiefungen pipettiert. Die Messung der Extinktion, die Rückschlüsse auf den Virustiter im Pflanzenpresssaft zulässt, wird mit dem Microplate Reader bei 405 nm durchgeführt.

Auswertung des PTA - ELISA

Die Analyse der ELISA Daten (s. 3.2.9.6) erfolgte nach der objektiven Auswertung nach REK (1987). Dazu werden die aufgenommenen Messwerte der Größe nach geordnet und die Mittelwerte je drei aufeinanderfolgender Werte gebildet. Die graphische Auswertung erfolgt, indem die Mittelwerte gegen die Gruppennummer aufgetragen werden. Die resultierende Kurve geht zuerst nahezu senkrecht nach oben und knickt irgendwann in die Horizontale ab. Der Mittelwert der Gruppe, die vor dem Umschlagpunkt der Kurve liegt, wird

ausgewählt und mit 1,2 multipliziert. Alle Pflanzen, deren Absorption größer oder gleich diesem Produkt ist, gelten als virusinfiziert.

3.2.9.7 Western - Blotting nach TOWBIN (1979)

Beim Western - Blotting werden die aus der Pflanze extrahierten Proteine zuerst mittels PAGE (s. 3.2.3) aufgetrennt und nach Übertragung auf eine Nitrocellulose - Membran mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Mit Hilfe des Protein Größenstandards auf dem Polyacrylamidgel können im Gegensatz zum ELISA zusätzliche Informationen über die molekulare Masse der viralen Proteine ermittelt werden.

3.2.9.7.1 Proteinextraktion nach BERGER *et al.* (1989)

Obwohl die Qualität der zu blottenden Proteine für das Gelingen des Protein - Blotting Experimentes entscheidend ist, da Proben mit degradierten Proteinen auf dem Polyacrylamidgelen Banden geringerer Masse liefern können, wird in dieser Arbeit die schnell durchführbare Extraktion der Gesamtproteine nach der Methode von BERGER *et al.* (1989) durchgeführt, bei der die Proteine nicht vor einem Abbau geschützt sind.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Berger - Puffer (pH 8,8)	750 mM Tris
	4 % (w/v) SDS
	4 % (w/v) 2 - Mercaptoethanol
	40 % (w/v) Saccharose

300 mg Blattmaterial von *N. benthamiana* - Pflanzen werden mit 750 µl heißem (95°C) Probenpuffer gemörsert. Dieser Pflanzenextrakt wird in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Nach Sedimentation bei 4°C für 15 min mit 13000 UpM wird der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteine bei 4°C gelagert, oder durch Polyacrylamidgel - Elektrophorese (s. 3.2.3) aufgetrennt.

3.2.9.7.2 Gel - Blot im Wet - Verfahren

Bei dem hier durchgeführten Tank - Blot Verfahren nach TOWBIN *et al.* (1979) werden die mittels SDS - PAGE (s. 3.2.3) aufgetrennten Proteine schonend durch elektrophoretischen Transfer verlustfrei auf eine Nitrocellulose Membran übertragen, durch Adsorption immobilisiert und spezifisch mit Antikörpern

detektiert. Damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran dem des Gels entspricht, erfolgt der Transfer senkrecht zur Trennrichtung.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Transferpuffer (pH 8,0)

25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % (v/v) MEtOH

Lagerung bei 4°C

Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine wird eine Vertikal - Elektroblot - Kammer von Hoefer Scientific Instruments verwendet, die über die Möglichkeit einer Wasserkühlung verfügt. Der luftblasenfreie Zusammenbau, der vorher in Transferpuffer getränkten Komponenten und einem ungefärbten PAGE Gel, ist schematisch in Abb. 3.3 dargestellt.

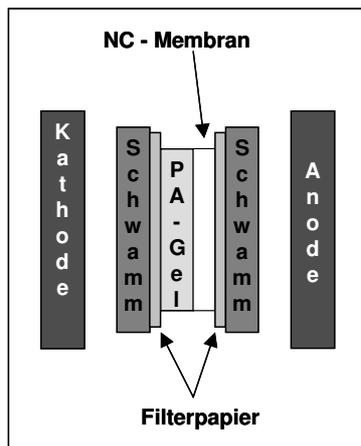


Abb. 3.3 Aufbau des Elektroblottes

Der Elektroblot wird, nachdem der Tank mit Transferpuffer gefüllt wurde, so in die Kammer eingeracht, dass die NC - Membran zur Seite der Anode liegt. Der Transfer erfolgt über Nacht durch eine Spannung von 40 V und einer Stromstärke von 160 mA.

Nachweisreaktion der transferierten Proteine ("Immunoassay")

Für den Nachweis der viralen Proteine auf der NC - Membran werden PVY spezifische Antikörper der Firma LOEWE eingesetzt. Der spezifische polyklonale Primärantikörper bindet an das PVY - Antigen. Anschließend wird ein zweiter enzymgekoppelter Antikörper, der gegen die leichten und schweren Ketten des Primärantikörpers gerichtet ist, der jetzt das Antigen darstellt, aufgetragen. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase hydrolysiert ein Naphtholphosphatester (Naphthol AS - MX Phosphat) zu

Phenolkomponenten und Phosphaten. Die entstehenden Phenole reagieren dann mit einem farblosen Diazoniumsalz (Fast Red TR) und bilden so einen unlöslichen Azofarbstoff. Dieses rote Reaktionsprodukt zeigt die Substratumsetzung an der Stelle, an der die Antikörper an die Membran binden konnten, weil dort virales Protein immobilisiert wurde.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

TBS (pH 7,4)	20 mM Tris 0,5 M NaCl
TBS - T	2 % Tween ₂₀ in TBS
TTBS	0,5 % Tween ₂₀ in TBS
Fast Red Puffer (pH 8,0)	0,2 M Tris 2 mM MgCl ₂

Fast Red - Lösung

45 mg Fast Red TR Salz / 7,5 ml Fast Red Puffer

Naphtol - Lösung

3 mg Naphthol / 7,5 ml A.dest

Naphtol / Fast - Red Färbelösung

Frisch angesetzte Naphtol - und Fast Red - Lösung im Verhältnis 1:1 mischen.

Um die ungesättigten Proteinbindestellen der Membran zu saturieren, wird diese anfänglich 2 min in TBS - T geschüttelt. Nach einem 15 minütigen Waschschrift mit TTBS wird der Antikörper PVY - IgG (Verdünnung: 1:400 in TTBS) zugegeben und unter leichtem Schwenken 1 h bei Rt an die viralen Proteine gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit TTBS für jeweils 5 min, bei dem nicht gebundene Antikörper entfernt werden, folgt eine Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Anti rabbit IgG alkaline P Konjugat, Verdünnung 1:32.000) für 1 h. Nach erneutem Waschen der Membran (s. o.), erfolgt durch die an den zweiten Antikörper gekoppelten Phosphatase, für ca. 5 - 10 min unter schwenken, die Umsetzung des Fast Red von 15 ml der Naphtol/Fast - Red Färbelösung.

3.2.9.8 Tissue - Print - Immuno - Assay (TPIA) nach LIN et al. (1990)

Die Methode des Tissue Print Immuno Assays (TPIA) nach LIN *et al.* (1990) ermöglicht die Lokalisation von Viren im Pflanzengewebe. Da der TPIA sensitiver als der ELISA ist, wird er zum Nachweis von PLRV Hüllproteinen verwendet.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

2% BSA (Bovine serum albumin) 200 mg Ovalbumin
in 10 ml PBS (s. 3.2.9.6)

TBS s. 3.2.9.7.2

Napthol /Fast Red Färbelösung s. 3.2.9.7.2

Von den zu testenden *N. benthamiana* - Pflanzen wird mit einer Rasierklinge sowohl ein gerader Blatt -, als auch Stengelquerschnitt durchgeführt. Die Schnittfläche wird sofort vorsichtig auf eine NC - Membran mit Proteinbindungskapazität gedrückt, wodurch neben den pflanzlichen auch die PLRV - Proteine adsorbiert werden. Nach Absättigung der nicht blockierten Bindungsstellen mit 2% BSA bei Rt und leichtem Schütteln wird die Membran 5 min mit PBS - T gewaschen. Anschließend wird der Antikörper MAk5G4 (KATUL, 1990) in einer 1:200 Verdünnung 1 h unter leichtem Schwenken an die Antigene gebunden. Zur Entfernung ungebundener Antikörper, wird der oben beschriebene Waschschrift wiederholt. Danach wird der Rabbit - anti - mouse - Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist (RAM - AP), in einer 1:1000 Verdünnung mit PBS - TPO zugegeben und durch einstündige Inkubation an den Antigen - Antikörper - Komplex gebunden. Erneut wird nicht - gebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen mit TBS entfernt. Durch Umsatz von Napthol AS - MX Phosphat/Fast - Red (s. 3.2.9.7.2) wird die Aktivität der alkalischen Phosphatase und damit das Vorliegen der viralen Proteine nachgewiesen. Da beim Aufdrücken der Blatt - bzw. Stamm - Querschnitte die Struktur der Proben erhalten bleibt, ist eine genaue Lokalisation des Antigens im pflanzlichen Gewebe möglich.

3.2.10 Nachweis der DNA Methylierung mittels differentieller Modifikation mit Bisulfit

Seit der Entdeckung des 5 - Methyl - Cytosins (5^mC) durch HOTCHKISS (1948) wurden mehrere Methoden zur Untersuchung und Sequenzierung dieser modifizierten DNA - Base entwickelt.

Die hier verwendete Methode der Bisulfit Konversion nach RAIZIS *et al.* (1995) ermöglicht es, alle Basen mit einer spezifischen Modifikation an jeder Stelle innerhalb der Nukleotidsequenz zu lokalisieren. Die Basis dieser hoch sensitiven Methode bildet die katalytische Wirkung des Bisulfits, Cytosin - Reste in einzelsträngiger DNA effizient in Uracil (U) umzuwandeln, während 5^mC nur in Einzelfällen (2 - 3%) konvertiert wird (WANG *et al.*, 1980).

Das Kohlenstoffatom 6 im Einzelstrang eines Cytosins (C) wird bei hoher Bisulfit Konzentration und leicht sauren Bedingungen (pH 5) sulfoniert. Das entstehende sulfonierte Zwischenprodukt ist anfällig für eine Desaminierung, so dass die Aminogruppe am Kohlenstoffatom 4 spontan hydrolysiert wird, was wiederum zur Bildung eines sulfonierten Uracils (sU) führt. Im resultierenden alkalischen Milieu wird das Bisulfit durch Abspaltung der Sulfongruppe regeneriert und es entsteht Uracil (U; s. Abb. 3.4).

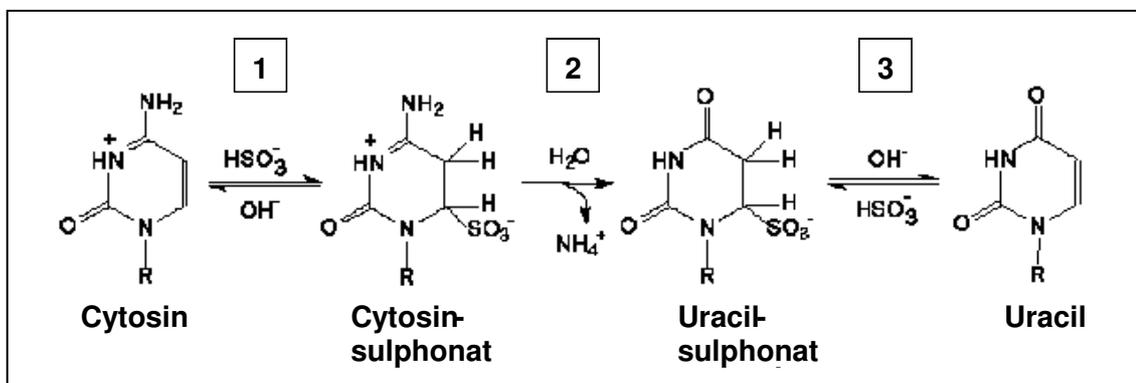


Abb. 3.4 Bisulfitmodifikation von Cytosin zu Uracil

1: Sulphonierung; 2: Hydrolytische Desaminierung; 3: Alkalische Desulfonierung

Vorraussetzung für eine vollständige Konversion ist die stringente Denaturierung der Ziel - DNA, da das Kohlenstoffatom 6 des Pyrimidinringes in doppelsträngiger DNA sterisch blockiert ist.

Bei einer anschließenden spezifischen Amplifikation des Gegensinnstranges mittels PCR paaren alle U - Moleküle mit Adenin (A), während 5^mC , die weiterhin als C erkannt werden, mit Guanin (G) paaren.

Im nächsten Zyklus der Amplifikation, paart A mit Thymin (T), so dass an Stellen, an denen das Cytosin nicht methyliert vorlag, im Sinnstrang ein Austausch von C zu T stattfindet (s. Abb. 3.5).

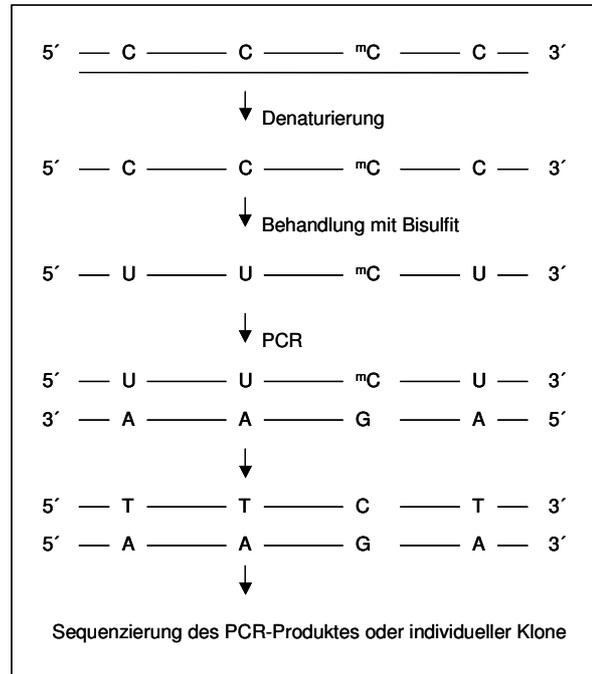


Abb. 3.5 Schematische Darstellung einer PCR nach Bisulfitmodifikation von methylierten und nicht methylierten Cytosinen

Durch eine Klonierung und Sequenzierung der PCR Produkte und der Analyse einzelner Klone, kann der Methylierungszustand individueller DNA - Stränge reflektiert und somit genau bestimmt werden, an welchen Stellen der Originalsequenz ein ^{5m}C vorgelegen hat.

3.2.10.1 Modifikation

Festes Metabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) zerfällt in wässriger Lösung zu $3\text{Na}_2\text{SO}_3$ und 12NaHSO_3 , welches C zu U konvertiert.

Entscheidend für die Konversion von nicht methyliertem C ist, dass die Bisulfit Lösung nicht oxidiert ist. Darum wird sie vor jeder Modifikation frisch angesetzt und Hydroquinone zugesetzt. Dieses ist ein α,β - ungesättigtes Di - Keton, das durch Oxidation in das nahezu energetisch gleichwertige p - Benzochinon überführt wird und so als Inhibitor der Bisulfit - Oxidation wirkt.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

NaOH	2M NaOH
Hydroquinone	~ 0,8 M* Hydroquinone

* 88,08 mg Hydroquinone (entspricht 1 M) lösen sich nicht vollständig in 1 ml A. bidest, deswegen wird eine ungefähre Molarität angegeben;

Bisulfit - Lösung (pH 5,0; 2 M NaOH)

1,9 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Merck, p.A.) in 2,5 ml A. bidest durch Zugabe von 0,7 ml 2 M NaOH und 0,5 ml Hydroquinone (~ 0,8 M) durch starkes Schütteln lösen. Anschließend pH Wert (pH = 5,0) mit pH - Papier kontrollieren.

Zur Denaturierung wird ein Gemisch aus 1 μg genomischer (s. 3.2.4.2) und 0,8 pg pBlueskriptII - DNA nach Zugabe von 0,7 μl NaOH (2M) 10 min bei Rt in 2 ml Biopur Safe Lock Tubes denaturiert. Nach Ablauf der 10 minütigen Denaturierung werden zu jedem Reaktionsansatz 200 μl der frisch präparierten Bisulfitlösung gegeben. Nach sofortiger Vermischung folgt eine Konversion für 15 h bei 50°C, während der die Reaktionsgefäße mit Parafilm verschlossen werden.

3.2.10.2 Desulfonierung und Aufreinigung

Die Desulfonierung und Aufreinigung der DNA ist von entscheidender Bedeutung für die anschließende Amplifikation, da sU nicht von der *Taq* DNA Polymerase repliziert werden kann. Reste der Bisulfitlösung, die als effektiver Puffer eine Alkalisierung verhindern, die die Voraussetzung für die Desulfonierung des U darstellt, müssen vollständig beseitigt werden.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Natriumacetatlösung (pH 5,5)	3 M NaOAc
Dextran T70	10 mg Dextran T70 in 1 ml A. bidest
NaOH	2 M NaOH
Ammoniumcetatlösung	7,5 M NH_4OAc

Nach der Modifikation werden die Reaktionsansätze auf Eis abgekühlt und 100 μl NaOAc, 460 μl A. bidest sowie 20 μl Dextran T70 zugegeben. Das natürlich vorkommende Polysaccharid Dextran dient dabei als Trägermaterial, da es sich aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften an die DNA bindet. Nach Fällung mit 800 μl Isopropanol (-20°C) wird die DNA 10 min mit 13000 UpM

sedimentiert und nach Verwerfen des Überstandes in 300 µl A. bidest gelöst. Durch Zugabe von 30 µl Natriumacetatlösung und 660 µl EtOH_{abs} wird die DNA erneut ausgefällt und anschließend 5 min mit 13000 UpM zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird die DNA mit 200 µl 0,2 M NaOH 15 min bei Rt inkubiert, um die Desulfonierung des U zu vervollständigen. Durch Zugabe von 100 µl Ammoniumacetatlösung und 600 µl EtOH_{abs} wird die DNA erneut gefällt, 10 min mit 13000 UpM pelletiert, der Überstand vollständig mit einer Pipette abgenommen und das Nukleinsäure - Pellet ca. 45 min im Vakuumkonzentrator getrocknet.

3.2.10.3 Parameter für die Primer zur Amplifikation der DNA nach der Bisulfit Modifikation

Um die DNA nach der Modifikation amplifizieren zu können, müssen von den Primern andere Parameter erfüllt werden, als bei einer "normalen" PCR, weil die beiden DNA - Stränge nach der Modifikation nicht mehr komplementär zueinander sind. Die Primer müssen demnach so entwickelt werden, dass sie spezifisch an einen Strang der DNA binden. Da im Rahmen dieser Arbeit beide Primer spezifisch an den Sinnstrang der modifizierten DNA binden sollten, unterscheidet sich besonders die Entwicklung des *antisense* Primers. Während im *sense* Primer G gegen T ausgetauscht werden, gilt für den *antisense* Primer, der ebenfalls an den Sinnstrang binden soll folgendes: Liegt im Sinnstrang ein C vor, würde im *antisense* Primer ein G stehen. Ist dieses C nicht durch eine Methylierung vor der Bisulfitkonversion geschützt, wird es zu U umgewandelt, so dass im Primer das G gegen ein A ausgetauscht werden muss.

Aus der Dissertation von BRINKMANN (2003) war bekannt, dass modifizierte pflanzliche DNA nach der Reinigung erst nach einer Reamplifikation mit *nested* Primern in ausreichender Menge vorliegt, um im Agarosegel detektiert und anschließend kloniert werden zu können.

Zur Anreicherung der modifizierten DNA sollte darum zuerst eine PCR durchgeführt werden, um die gereinigte DNA zu vermehren. Deswegen sollte das Primerpaar, welches dafür verwendet werden sollte, an Stellen binden, die durch die Modifikation kaum verändert werden, also an Stellen, an denen der Sinnstrang kaum C enthält.

Die *nested* gelegenen Primer hingegen sollten anschließend mit Sequenzen hybridisieren, die möglichst viele asymmetrischen C (aC) enthalten (von denen angenommen wurde, dass sie in nicht methyliertem Zustand vorliegen) und nahe am 3' - Bereich ein CG Paar aufweisen. Da diese CG Paare klassische Ziele der pflanzlichen DNA - Methyltransferasen sind, musste die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass das C in diesem Kontext sowohl methyliert, als auch nicht methyliert vorliegen kann. Ist das C nicht methyliert, zieht dies nach der Bilsulfit - Modifikation, eine Konversion zu U und sukzessive zu T nach sich, während ein methyliertes C vor dieser Umwandlung geschützt ist. Da aber gerade die Nukleotidabfolge am 3' - Ende für die Hybridisierung eines Primers entscheidend ist, wurden jeweils zwei Primerpaare (M und U) entwickelt, die nach der Modifikation mit dem CG (M - Primer) oder UG (U - Primer) hybridisieren können, zumal von HERMAN *et al.* (1996) gezeigt wurde, dass durch Verwendung solcher Primer bereits Rückschlüsse auf die Methylierung der zu amplifizierenden Sequenz möglich sind.

Sowohl die Lage der Primer, als auch deren Sequenzen sind im Ergebnisteil angegeben, da sie im Rahmen dieser Arbeit für die spezifischen Konstrukte entwickelt und adaptiert wurden und somit ein Teil der Ergebnisse darstellen.

3.2.10.4 Kontrolle der Modifikationseffizienz nach FROMMER *et al.* (1992)

Um die Modifikationseffizienz zu bestimmen wurde die Methode von FROMMER *et al.* (1992) durchgeführt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Primern amp1 und amp2 (s. Tab. 3.5) weisen jeweils eine Länge von 30 bp auf, wobei alle 9 C der Originalsequenz des *sense* - Stranges gegen T im *sense* bzw. die 4 G gegen A im *antisense* Primer ausgetauscht wurden.

Tab. 3.5 Auflistung der Primer amp1 und amp2

Bezeichnung	Sequenz
amp1	GTTTTAGATTTATTAGTAATAAATTAGTTA
amp2	ATAACACTACAACCAACTTCATTCTAACAA

Mit ihnen kann Sinnstrang - spezifisch ein 319 bp - Fragment des Ampicillinresistenzgens (Position 2125-2444, Genbank Sequenz X52328, SHORT *et al.*, 1988) der modifizierten pBluescriptII DNA amplifiziert werden. Innerhalb dieses Kontrollfragmentes kann dabei eine Cytosin - Methylierung ausgeschlossen werden, da das Plasmid in diesem Bereich keine

Erkennungssequenzen (CCWGG) für *E. coli* - DCM - Methyltransferasen besitzt (MAY UND HATTMANN, 1975). Bei einer vollständigen Modifikation werden folglich alle C des Kontrollfragmentes zu U umgewandelt, so dass nach einer Amplifikation des primären Sinnstranges, alle C der Sequenz im sekundären Sinnstrang gegen T, bzw. alle G im sekundären Gegensinnstrang durch ein A ausgetauscht sein müssen. Dadurch, dass nach einer Sequenzierung die Anzahl der C analysiert werden kann, die nicht konvertiert wurden, ist es möglich die Effizienz zu bestimmen mit der die Modifikation stattgefunden hat. Weil die genaue Durchführung und Adaption der Methode einen Teil der praktischen Arbeiten darstellen, sind sie dem Ergebnisteil zu entnehmen.

3.2.10.5 Amplifikation der modifizierten DNA

Nach Resuspendierung der modifizierten, gereinigten DNA (s. 3.2.10.2) in 30 µl TE - Puffer werden 3,0 µl der gereinigten DNA sofort mit einer Standard - PCR mit dem Temperaturprogramm D3 amplifiziert. Als *Taq* DNA Polymerase wird dafür immer 1 µl einer 1:40 Verdünnung der *Taq* AG Maiss verwendet (s. 3.2.14). Die jeweils verwendeten Primer, sowie die Größe der resultierenden PCR-Fragmente sind explizit im Ergebnisteil bzw. im Anhang angegeben.

3.2.10.6 Ligation in den pGEM® - T Easy Vektor

Das pGEM® - T Easy Vektor System der Fa. Promega dient dem Klonieren von PCR Produkten. Dazu wurde dem Vektor nach einem Verdau mit dem RE *EcoRV* je ein T an die entstehenden 5' Enden angehängt. Die PCR - Produkte von Polymerasen mit terminaler Transferase Aktivität sequenzunabhängig weisen hingegen 3' - A - Überhänge auf (CLARK, 1988; MARCHUK *et al.*, 1990). Durch diese Kompatibilität von A und T können diese PCR - Fragmente, direkt in den pGEM® - T Easy Vektor kloniert werden, sofern ein Ligase verwendet wird, die keine Exonukleaseaktivität aufweist, weil diese sonst die überstehenden T - bzw. A - Reste vom Vektor und dem PCR - Produkt abspalten würde.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Schnell - Ligationspuffer s. Tab. 2.6

Nach Reinigung des PCR Produktes mit dem QIAquick® PCR Purification KIT (s. 3.2.6) wird folgender Ligationsansatz vorbereitet:

- 5,0 µl 2x Rapid Ligation Buffer
- 1,0 µl T4 DNA - Ligase [1,5 U/µl]
- 1,0 µl pGEM® - T Easy Vektor
- 1 - 3 µl gereinigtes PCR Produkt, abhängig von dessen Größe und Konzentration:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Vektor [ng]} * \text{Größe Insert [kb]}}{\text{Größe des Vektors [kb]}}$$

ad 10 µl mit A. bidest

Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 4°C inkubiert und am folgenden Tag in den *E. coli* - Stamm NM 522 transformiert (s. 3.2.8.1).

3.2.10.7 Effiziente Durchmusterung von Bakterienkolonien

Mit Hilfe dieser Methode, die eine besondere Form der PCR (s. 3.2.5.1) darstellt, ist es möglich, sehr schnell die Klone zu identifizieren, die das rekombinante Plasmid aufgenommen haben. Dafür werden anstelle von gereinigter DNA, transformierte *E. coli* - Zellen einer Flüssigkultur in die PCR eingesetzt. Diese werden durch den ersten Denaturierungsschritt aufgebrochen und die Plasmid - DNA kann amplifiziert werden.

Als Primer werden M13uni oder M13rev eingesetzt, deren Sequenzen den Mehrfachklonierungsort des pGEM® - T Easy Vektors flankieren.

Die *E. coli* - Zellen einer Kolonie der Übernachts - Kulturen werden mit dem Zahnstocher in 100 µl LB_{Amp} übertragen. Nach einer gründlich Durchmischung wird ein folgender PCR - Ansatz vorbereitet:

- je 0,25 µl 10 µM M13 uni, 10 µM M13 rev
- 0,125 µl 25 mM dNTP
- 2,5 µl 25 mM MgCl₂
- 1,25 µl 10x *Taq* - Puffer (s. Tab. 2.7)
- 1,0 µl Bakteriensuspension
- 1,0 µl *Taq*_{AG Maiss} (1:40 Verdünnung, s. 3.2.11)
- ad 12,5 µl A. bidest

Nach Amplifikation mit dem Temperaturprogramm D3 (s. 3.2.5.1) werden 10 µl von jedem Ansatz in einer Agarosegel - Elektrophorese (s. 3.2.2) kontrolliert

und positive Klone aufgrund der Größe des jeweiligen PCR - Fragmentes identifiziert.

3.2.10.8 Aufreinigung der rekombinanten Plasmide für die Sequenzierung

Die Plasmid DNA muss, bevor sie sequenziert wird, von Fremdproteinen, Salzen und anderen Verunreinigungen, wie Primern und dNTPs gereinigt werden, damit eine erfolgreiche Sequenzierung stattfinden kann.

Mit 20 µl der LB_{Amp} Bakterienlösung dieser Klone, die bis dahin bei 4°C gelagert werden, wird eine 3,5 ml LB_{Amp} - Flüssigkultur angeimpft und diese für 6 h bei 37°C und 250 UpM inkubiert. Anschließend werden 2 ml der Flüssigkultur 2 min mit 13000 UpM zentrifugiert und die rekombinante DNA mit dem QIAquick® Spin Kit, was auf demselben Prinzip beruht, wie unter 3.2.6 beschrieben, nach Angaben des Herstellers isoliert.

Nach einem Kontrollverdau mit *PvuII* (s. 3.2.7.1) und Agarosegel - Elektrophorese (s. 3.2.2) wird ein Aliquot von 1 - 3 µl der Präparation (entsprechend 1 - 2 µg DNA) nach visueller Abschätzung im Vakuumkonzentrator getrocknet und zum Sequenzieren an die Fa. MWG - Biotech AG geschickt. Als Sequenzierprimer wird entweder M13uni oder M13rev eingesetzt.

3.2.11 Expression und Aufreinigung der DNA - abhängigen *Taq* DNA Polymerase

Die DNA abhängige *Taq* DNA Polymerase ist ein Enzym mit einem Molekulargewicht von 94 kDa, das in seinem Wirtsorganismus *Thermus aquaticus* für die Reparatur und die Replikation der DNA zuständig ist. Da *Thermus aquaticus* heiße Quellen besiedelt, hat diese *Taq* Polymerase ein Temperaturoptimum von 72 °C und selbst bei 97,5°C eine Halbwertszeit von 2 h. Nachdem SAIKI *et al.* (1988) die Isolierung gelang, ersetzt sie in der PCR die nicht hitzestabile Polymerase I aus *E. coli*, da einerseits der Ertrag und die Sensitivität erhöht, andererseits das Auftreten unspezifischer Reaktionen durch den möglichen Einsatz höherer Temperaturen vermindert wird.

Ausgehend von einem kurzen doppelsträngigen DNA - Abschnitt synthetisiert die *Taq* DNA Polymerase den Doppelstrang komplementär zur Base der einzelsträngigen Matrize in 5´ - 3´ Richtung durch Bildung von

Phosphodiesterbindung mit den freien 3´ - OH Gruppen der Nukleotide unter Abspaltung von Pyrophosphat. Dabei ist die Genauigkeit mit 1 Fehlinsertion pro $1,2 \times 10^5$ bp (CLINE *et al.*, 1996) aufgrund der fehlenden 3´ - 5´ Exonuklease - Fähigkeit relativ gering.

3.2.11.1 Expression rekombinanter Plasmide nach dem Expressionssystem nach CROWE (1992)

Das ca. 7 kb große Plasmid pTaq enthält die Sequenz des *Taq* DNA Polymerase - Gens (2,5 kb), welches unter Kontrolle eines IPTG induzierbaren *tac* Promotors steht. Dieser *tac* Promotor ist ein Hybrid aus dem *trp* - und *lac* Promotor aus *E. coli* und ermöglicht eine Expression bis zu 10 mg Protein pro Liter Bakterienkultur.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

IPTG 200 mM IPTG_{aq}

Die Bakterien, der *E. coli* NM522 - Dauerkultur, die das Expressions - Plasmid enthält, werden mit einer Impföse fraktioniert auf LB_{Amp} ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag werden einige Kolonien dieser Übernachtskultur in 200 ml LB_{fil-Amp} - Medium in einen 2l Erlenmeyerkolben überführt und bei 37°C mit 180 UpM ca. 6,5 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen, bei der sich die Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase befindet. Dann wird die Proteinexpression mit IPTG (Endkonzentration von 1 - 2 mM) induziert und die Bakterien 3 - 12 h unter oben genannten Bedingungen kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgt durch zehnmütige Zentrifugation bei 4°C mit 7500 UpM (Sorvall® RC5B ; Rotoren: SLA 1500), die Lagerung bei -20°C.

3.2.11.2 Reinigung der DNA - abhängigen Taq DNA Polymerase nach PLUTHERO (1993)

Bei der Aufreinigung von bakteriell exprimierter *Taq* DNA Polymerase nach der Methode von PLUTHERO (1993) werden nach einem lytischen Verdau der *E. coli*-Zellen alle Proteine, mit Ausnahme der hitzestabilen *Taq* Polymerase, durch eine Hitzeinkubation denaturiert und durch Sedimentation entfernt. Durch hohe Ammoniumsulfat - Konzentrationen, bei denen Proteine ihr Solvathülle verlieren und ihre Löslichkeit gesenkt wird, kann anschließend die rekombinante *Taq* Polymerase gefällt und gereinigt werden.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Puffer A (pH 7,9)	50 mM Tris
	50 mM Dextrose
	1 mM EDTA
Puffer B (pH 7,9)	10 mM Tris
	50 mM KCl
	1 mM EDTA
	1 mM PMSF
	0,5% Tween 20
	0,5% Igepal CA-630
Lysis - Puffer	4 mg Lysozym /ml Puffer A

Die pelletierten Bakterien (s. 3.2.11.1) werden zur Reinigung in 20 ml Puffer A aufgenommen und 10 min bei 4°C mit 7500 UpM (Sorvall® RC5B; Rotoren: SS34) pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Bakterien in 10 ml Lysis - Puffer für 15 min bei Rt lysiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer B werden die Bakterienproteine durch eine einstündige Hitzeinkubation bei 75°C denaturiert. Die denaturierten Zellbestandteile werden bei 4°C für 10 min mit 15.000 UpM (Sorvall® RC5B; Rotoren: SS34) sedimentiert. Zu dem Überstand in dem sich die rekombinante *Taq* DNA Polymerase befindet, werden unter leichtem Schütteln (180 UpM) bei 4 °C maximal 6 g Ammoniumsulfat portionsweise über 30 min zugegeben. Das präzipitierte Protein wird anschließend 10 min bei 4°C mit 15.000 UpM sedimentiert, in 2 - 4 ml Puffer A aufgenommen und direkt dialysiert (s. 3.2.11.3).

3.2.11.3 Dialyse

Die Dialyse ist ein Prozess, mit dem gelöste Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte separiert bzw. entsalzen und konzentriert werden können. Durch Osmose durch eine semipermeable Membran aus regenerierter Cellulose kann bei der Dialyse gegen den Aufbewahrungspuffer z.B. Ammoniumsulfat aus der Lösung entfernt werden. Um Verunreinigungen, wie Proteasen, andere Enzyme oder Spuren von Schwermetallen zu beseitigen, müssen die Dialyseschläuche vor der Dialyse gereinigt werden.

Zusammensetzung der benötigten Lösungen

Reinigungslösung 1	1mM Na ₂ CO ₃
Reinigungslösung 2	1 mM EDTA
Aufbewahrungslösung	50% EtOH 0,02% NaN ₃
Aufbewahrungspuffer	50 mM Tris 50 mM KCl 0,1 mM EDTA 1 mM DTT 1 mM PMSF 50 % Glycerin

Die Dialyseschläuche mit einer Porenweite von 25 Å und einem Ausschlussvolumen von 12000 - 14000 g/mol (Fa. Serva) werden 1h in 1%iger Essigsäure gequollen, anschließend in A. bidest geschwenkt und jeweils 10 min in Reinigungslösung 1 und 2 auf 96°C erhitzt. Nach erneutem Waschen mit A. bidest werden die Schläuche in Aufbewahrungslösung bei 4°C gelagert.

2 - 4 ml der Lösung A mit der exprimierten *Taq* DNA Polymerase (s. 3.2.11.2) werden in 10 cm lange gereinigte Dialyseschlauch gefüllt, die mit Klammern verschlossen werden. Nach zweimaliger Dialyse über Nacht bei 4°C gegen den Aufbewahrungspuffer im Verhältnis 1:250 (v/v), wird die gereinigte *Taq* DNA Polymerase 1:1 mit Aufbewahrungspuffer verdünnt und bei - 20 °C gelagert.

Aufgrund der Übersichtlichkeit wird das Ergebnis der Expression und Aufreinigung der *Taq* DNA Polymerase, die im folgenden als *Taq*_{AG Maiss} bezeichnet wird, in den folgenden Kapiteln dargestellt.

3.2.12 Bestimmung der Reinheit der isolierten *Taq* DNA Polymerase

Nach der Expression und Aufreinigung der *Taq* DNA Polymerase (s. 2.2.13.1, 2.2.13.2 und s. 2.2.13.3) wurde die Reinheit der *Taq*_{AG Maiss} bestimmt, indem nach der Dialyse unterschiedliche Verdünnungen mit A. bidest hergestellt wurden und diese auf ein SDS - Polyacrylamidgel (s. 2.2.3.2) aufgetragen (s. Abb. 3.6) wurden.

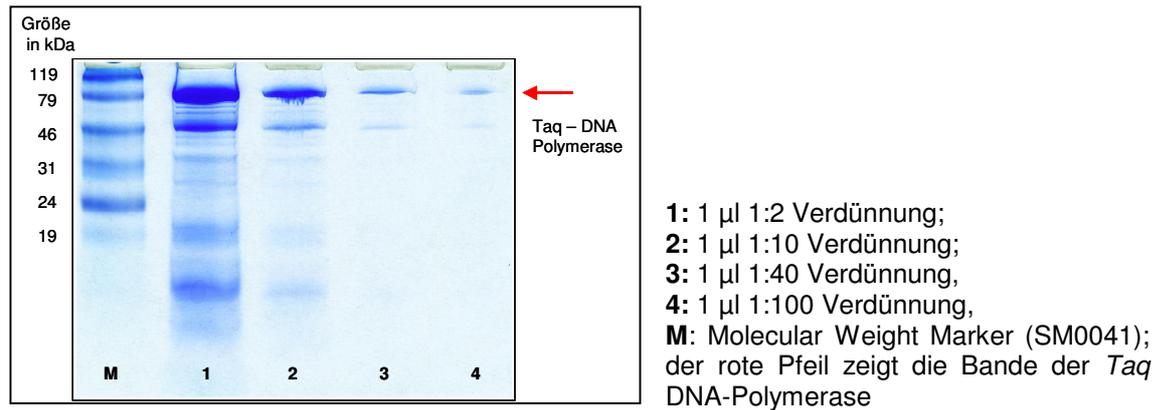


Abb. 3.6 Coomassieblau gefärbtes Tris - Tricin Polyacrylamidgel mit unterschiedlichen Verdünnungen der isolierten Taq DNA Polymerase nach der Dialyse

In den Spuren 1 bis 4 ist deutlich eine Bande in der Größe zwischen 79 kDa und 119 kDa zu erkennen, deren Größe anhand des Gels, dessen Trennschärfe mehr im Bereich kleinerer Proteine liegt, nicht genau festgelegt werden kann. Es wurde aber davon ausgegangen, dass es sich um die 94 kDa große Bande der Taq DNA Polymerase handelt.

Die weiteren Banden unterschiedlicher Größe zeigen, dass nicht alle Bakterienproteine durch die Aufreinigung entfernt werden konnten.

3.2.13 Aktivitätsbestimmung der isolierten Taq DNA Polymerase

Zur Bestimmung der Aktivität der Taq_{AG Maiss} wurde in 50 µl Ansätzen eine Standard PCR (s. 2.2.5.1) mit dem Temperaturprogramm D3 und den Primern 35Eco und 35Hind (s. Tab. 2.11) durchgeführt: Als Template wurde das aus *E. coli* isolierte (s. 3.2.8.1.4) Plasmid p Pk_{CGP} (s. Abb. 4.8) in einer 1:50 Verdünnung eingesetzt. Jeweils 1 µl von unterschiedlichen Verdünnungen der aufgereinigten Taq_{AG Maiss} (s. Abb. 3.7) wurden pro PCR Ansatz (s. u.) eingesetzt und die Amplifikate, deren erwartete Größe 809 bp betrug, anschließend im Agarosegel kontrolliert (s. Abb. 3.7).

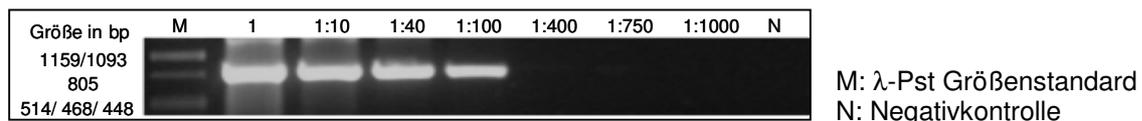


Abb. 3.7 PCR der Verdünnungsreihe der isolierten Taq DNA Polymerase

Die zur Amplifikation benötigte Enzymmenge beträgt etwa 1 unit (NEB, MÜHLHARDT, 2002). Die spezifischen Aktivität liegt zwischen 22.000 und

49.000 U/mg (CZUBAYKO, 2000), was einer Masse von etwa 20 - 45 ng entspricht.

Die 1:100 Verdünnung stellt die maximale Verdünnung dar, mit der in dieser Verdünnungsreihe die Plasmid - DNA amplifiziert werden kann. Die Enzymkonzentration der Stammlösung beträgt also mindestens 100 U/μl, was bei einer spezifischen Aktivität von 22.000 - 49.000 U/mg ca. 2 - 4,5 μg/μl entspricht.

3.2.14 Vergleich unterschiedlicher *Taq* DNA Polymerasen zur Amplifikation transgener modifizierter DNA

Um die Amplifikation der *Taq*_{AG Maiss} mit einer anderen *Taq* DNA Polymerase zu vergleichen, wurden die unter 4.3.6.4 beschriebene PCR und Reamplifikation im direkten Vergleich mit der kommerziell erhältlichen *Taq* DNA Polymerase der Firma Promega, an der modifizierten transgenen DNA der Pflanzen PV.14.13 (Produktgröße: 668 bp) durchgeführt.

Das Ergebnis der Reamplifikation ist in Abb. 3.8 dargestellt.

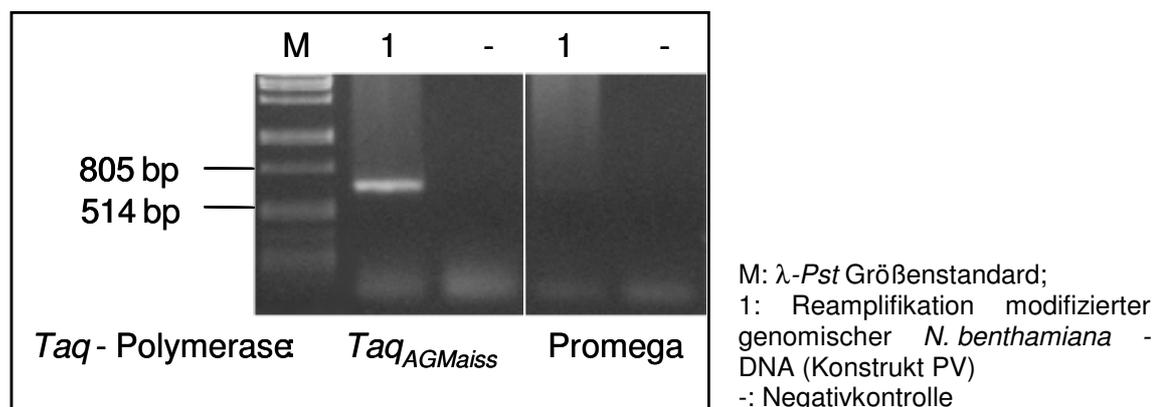


Abb. 3.8 Reamplifikation modifizierter *N. benthamiana* DNA mit unterschiedlichen *Taq* DNA Polymerasen

Die Kontrolle der Amplifikate im Agarosegel zeigte, dass es mit der kommerziell erhältlichen *Taq* DNA Polymerase von Promega nicht möglich war, die modifizierte transgene DNA zu amplifizieren, so dass für die Amplifikation der modifizierten DNA ausschließlich die *Taq*_{AG Maiss} verwendet wurde, obwohl deren Fehlerrate nicht bestimmt wurde.

4 ERGEBNISSE

4.1 TRANSFORMATION VON *N. BENTHAMIANA* - PFLANZEN ZUR ETABLIERUNG EINER RNA VERMITTELTEN VIRUS RESISTENZ

4.1.1 Die Klonierungsstrategien

A. Klonierungsstrategie für Konstrukte, die unterschiedlich lange Hüllprotein kodierende Sequenzen des PVY enthalten

Zur Untersuchung, ob die Länge der Pathogen - abgeleiteten Sequenz einen Einfluss auf eine Resistenzprägung gegen PVY hat, sollten im direkten Vergleich 109 bp - 382 bp lange Fragmente der Kernregion des Hüllprotein - kodierenden Bereichs des PVY verwendet werden, um eine RNA vermittelte PVY - Resistenz in *N. benthamiana* - Pflanzen zu etablieren. Die gesamte kodierende Sequenz des PVY Hüllproteins, sowie die Lokalisation der unterschiedlichen Fragmente, die für diese Konstrukte verwendet werden sollten, ist schematisch in Abb. 4.1 dargestellt. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Genbanksequenz AF321554.1 (STANIC-RACMAN *et al.*, 2000), die der verwendeten Sequenz aus dem Plasmid pSL1180PPVPVY zu 100% entspricht.

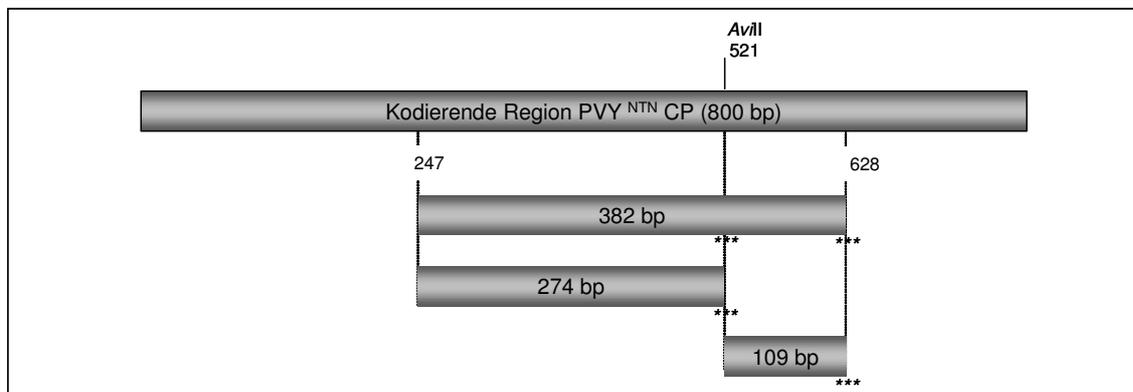


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der unterschiedlich langen Hüllprotein abgeleiteten Fragmente der PVY kodierenden Region

***: repräsentieren Stellen, an denen zehn synthetische CG - Paare eingefügt werden können (s. 4.1.1 C)

B. Klonierungsstrategie zur Verlängerung von PVY - Konstrukten, mit Hüllprotein Fragmenten des PLRV und PVX

In einem weiteren Ansatz sollte analysiert werden, ob die Verlängerung der PVY CP Fragmente mit Hüllprotein abgeleiteten Sequenzen des PLRV und des PVX einen Einfluss auf die PVY - Resistenz hat und ob es durch die

Kombination von PVY, PLRV und PVX abgeleiteten CP - Sequenzen möglich ist, eine multiple Virusresistenz in *N. benthamiana* - Pflanzen mit einem Konstrukt zu etablieren. Darum wurde eine Klonierungsstrategie ausgearbeitet, mit der es möglich war, ca. 300 bp lange Fragmente der Hüllprotein kodierenden Sequenzen kassettenförmig zu klonieren. Diese ist unter Angabe der verwendeten Restriktionsendonukleasen schematisch in Abb. 4.2 dargestellt.

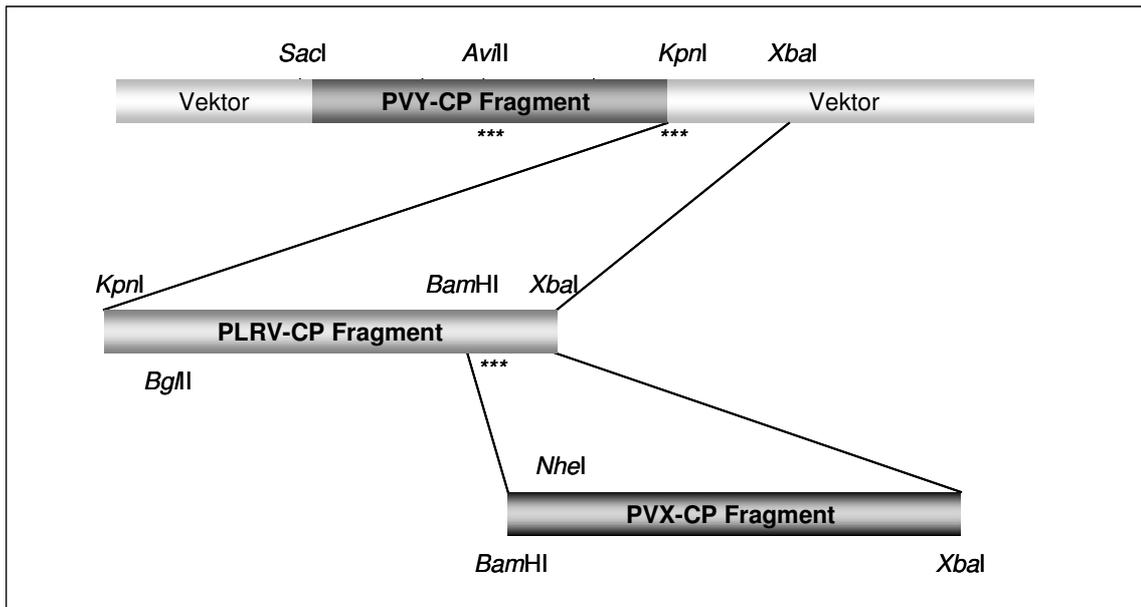


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für den kassettenförmigen Aufbau der unterschiedlichen Konstrukte, die aus Hüllproteinfragmenten von PVY, PLRV und PVX zusammengesetzt sind

***: repräsentieren Stellen, an denen zehn synthetische CG - Paare eingefügt werden können (s. 4.1.1 C)

C. Entwicklung von zehn synthetischen CG - Paaren, zum Einbau in die geplanten Konstrukte

Durch das Einfügen von 10 synthetisch hergestellten CG - Paaren ((CG)₁₀) innerhalb bzw. an das 3' - Ende der viral - abgeleiteten Sequenzen sollte untersucht werden, ob diese die Resistenz der transgenen *N. benthamiana* - Pflanzen beeinflussen und ob durch das Einfügen der (CG)₁₀ die Methylierung der transgenen DNA verändert wird.

Zu diesem Zweck wurden zwei komplementäre Oligomere (CG1 und CG2; s. Abb. 4.3) entwickelt, in deren Zentrum (CG)₁₀ lokalisiert sind und denen sowohl am 5' -, als auch am 3' - Ende unterschiedliche Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen angefügt wurden, so dass die (CG)₁₀ an den

entsprechenden Stellen in die geplanten Konstrukte eingefügt werden konnten (s. Abb. 4.1 und Abb. 4.2).

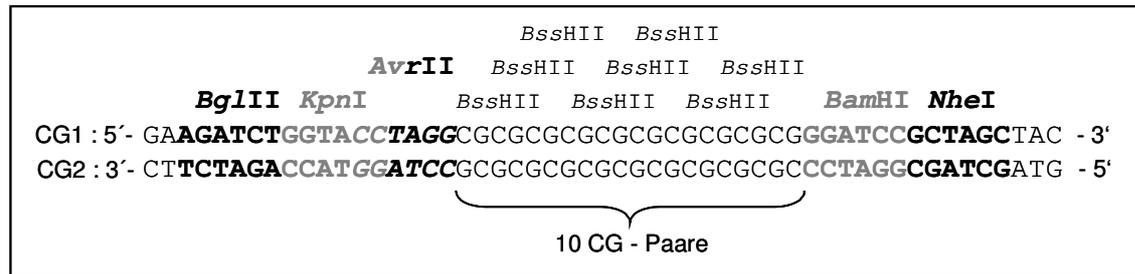


Abb. 4.3 Darstellung der synthetischen Oligomere CG1 und CG2 unter Angabe der Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme

4.1.2 Klonierung der Konstrukte in *E. coli* NM 522

Alle Klonierungsschritte wurden nach der Transformation in *E. coli* NM522 (s. 3.2.8.1) und analytischer Plasmidpräparation (s. 3.2.8.1.4) durch Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen (s. 3.2.7.1) und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (s. 3.2.2) auf den korrekten Einbau der jeweiligen Sequenz überprüft.

4.1.2.1 Hybridisierung und vorbereitende Klonierung der synthetischen (CG)₁₀

Die zwei einzelsträngigen Oligonukleotide CG1 und CG2 (s. Tab 2.11) wurden durch Hybridisierung in doppelsträngige Form gebracht (s. 3.2.5.3) und konnten anschließend für die weiteren Klonierungen verwendet werden. Um am 3' - Ende eine *Xba*I Erkennungsschnittstelle anzufügen, wurde das *Bgl*III - *Nhe*I Fragment des doppelsträngigen Oligomers in den Vektor pSL1180 (pSL1180_CG) kloniert. Durch eine weitere Klonierung des *Pml*III - *Xba*I Fragmentes aus dem Vektor pSL1180_CG in den *Stu*I - *Xba*I verdauten Vektor pe35Stu-pA2 entstand das Plasmid pe35_CG.

Aus den beiden Plasmiden pSL1180_CG und pe35_CG (Nukleotidabfolge der relevanten Bereiche mit Angabe der verwendeten Restriktionsschnittstellen s. 8.2), konnten die (CG)₁₀ für alle weiteren Klonierungsschritte benutzt werden. Dass sowohl die Hybridisierung, als auch die Klonierung fehlerfrei stattgefunden hatte, wurde überprüft, indem das Plasmid pSL1180_CG gereinigt (s. 3.2.1.2) und mit dem Primer M13rev sequenziert wurde.

4.1.2.2 Vorbereitung der Vektoren

Aufgrund seiner Erkennungsschnittstellen sollte der Vektor pBCIISKM für verschiedene vorbereitende Klonierungsschritte verwendet werden. Dafür war es notwendig, eine *AviI* Erkennungsschnittstelle zu entfernen. Die durchgeführten Maßnahmen, sind im Anhang unter 8.3 dargestellt.

Der Vektor pe35Stu-pA enthält die Sequenz des verdoppelten 35S Promotors und das Polyadenylierungssignal des *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Dadurch, dass hinter dem Promotor und vor dem Mehrfachklonierungsort in jedem Leseraster ein Stoppkodon (TAG) vorliegt, wird eine Expression der dort eingefügten Sequenzen verhindert. Um diesen Vektor für die Klonierungen verwenden zu können, wurde eine *KpnI*, sowie eine *SacI* Restriktionsschnittstelle entfernt und der vorhandene Mehrfachklonierungsort mit dem des Vektors pSL1180 ausgetauscht (Detaillierte Auflistung der Klonierungsschritte s. 8.3). Der resultierende Vektor pe35StuSL-MCS diene als Grundgerüst für alle weiteren Klonierungen und ist schematisch in Abb. 4.4 dargestellt. Die Nukleotidabfolge zwischen der *EcoRI* - und *HindIII* Erkennungsschnittstelle ist unter 8.2 im Anhang angegeben.

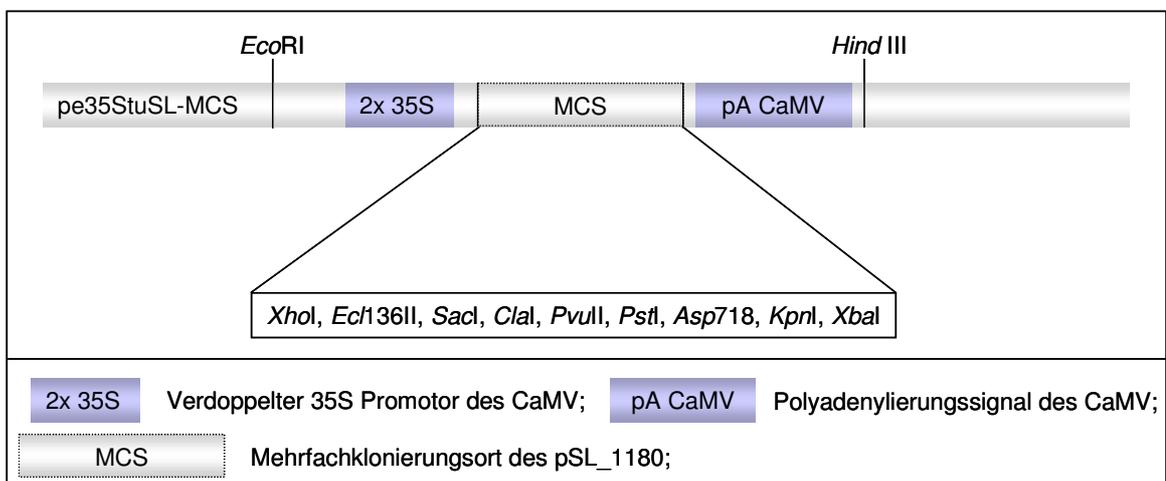


Abb. 4.4 Schematische Darstellung des Vektors peStuSL-MCS

4.1.2.3 Klonierung der Konstrukte mit unterschiedlich langen Hüllprotein abgeleiteten Sequenzen des PVY

Die in Abb. 4.1 angegebene Sequenz der Kernregion des PVY CP stand innerhalb der Arbeitsgruppe in dem Plasmid pSL1180PPVPVY zur Verfügung. Abb. 4.5 ist der schematische Ablauf der einzelnen Klonierungsschritte zu entnehmen, ein detaillierte Auflistung ist Tab. 8.1 zu entnehmen.

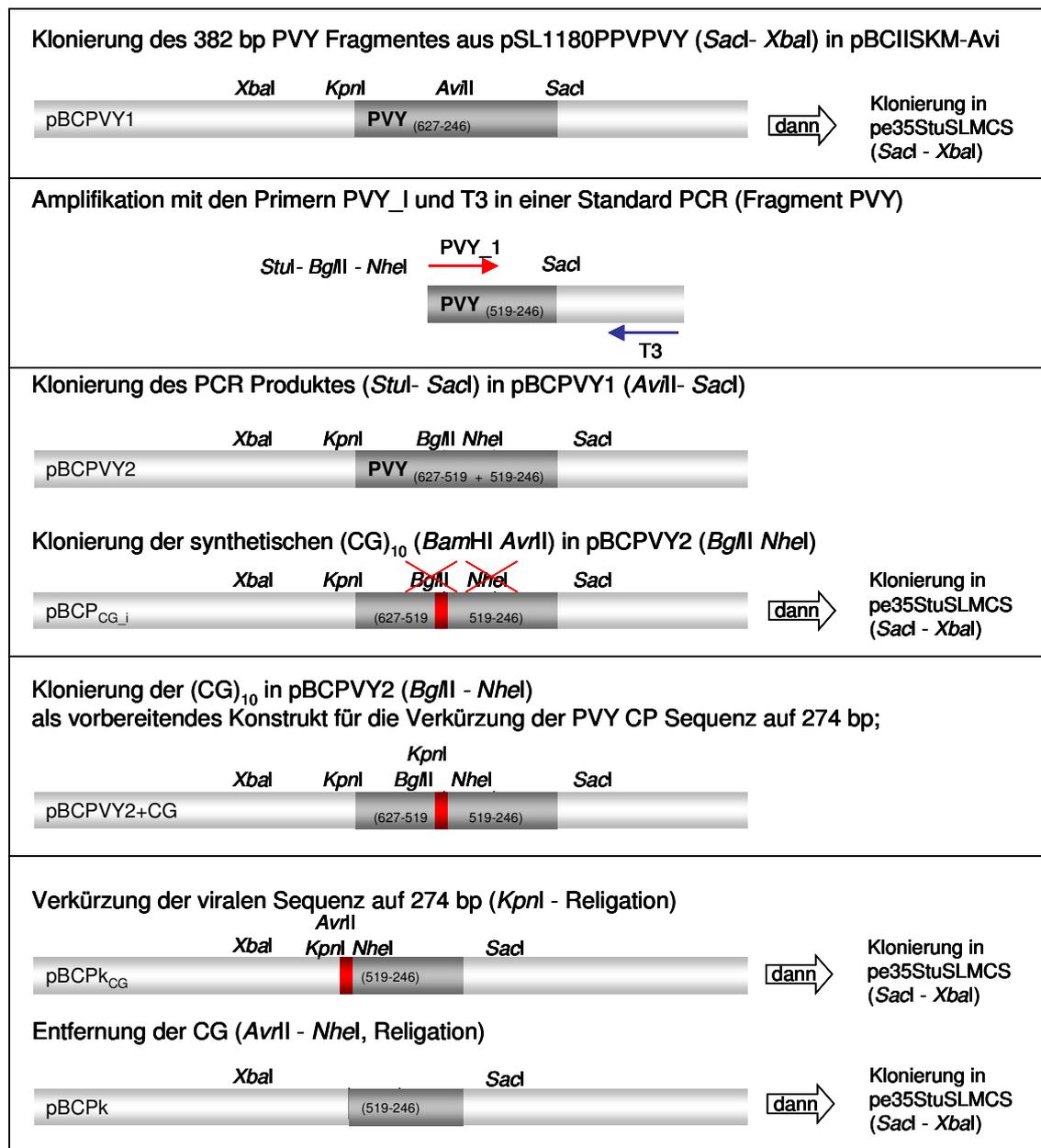


Abb. 4.5 Schematische Darstellung der PVY 'Vor' - Konstrukte

Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der Nukleotid Position der Genbank Sequenz AF321554 des PVY in sense Orientierung.

Um sicherzustellen, dass weder bei der Amplifikation noch bei den nachfolgenden Klonierungen Fehlinsertionen innerhalb der viral - abgeleiteten Sequenz auftraten, wurde das Plasmid pBCPVY2+CG nach einer Aufreinigung

(s. 3.2.1.2) sequenziert (s. 3.2.12.5). Im Alignment wurde ein Austausch von A durch G innerhalb einer *Bam*HI - Erkennungsschnittstelle festgestellt. Da diese nicht für weitere Klonierungen verwendet werden musste, wurde diese Abweichung nicht korrigiert (Daten nicht gezeigt).

Damit die transgene Sequenz in der Pflanze transkribiert und somit eine RNA vermittelte Resistenz etabliert werden konnte, wurden die unterschiedlichen Konstrukte jeweils *Sac*I - *Xba*I in den Vektor pe35StuSL-MCS (s. Abb 4.4) kloniert und dadurch unter Kontrolle des verdoppelten 35S Promotors und des Polyadenylierungssignals des CaMV gebracht. Aufgrund des Aufbaus war es anschließend möglich, die viralen Sequenzen aller Konstrukte samt Promotor und Polyadenylierungssignal durch eine *Eco*RI - *Hind*III Klonierung in den binären Vektor pLX_222 zu überführen (s. Abb. 4.6).

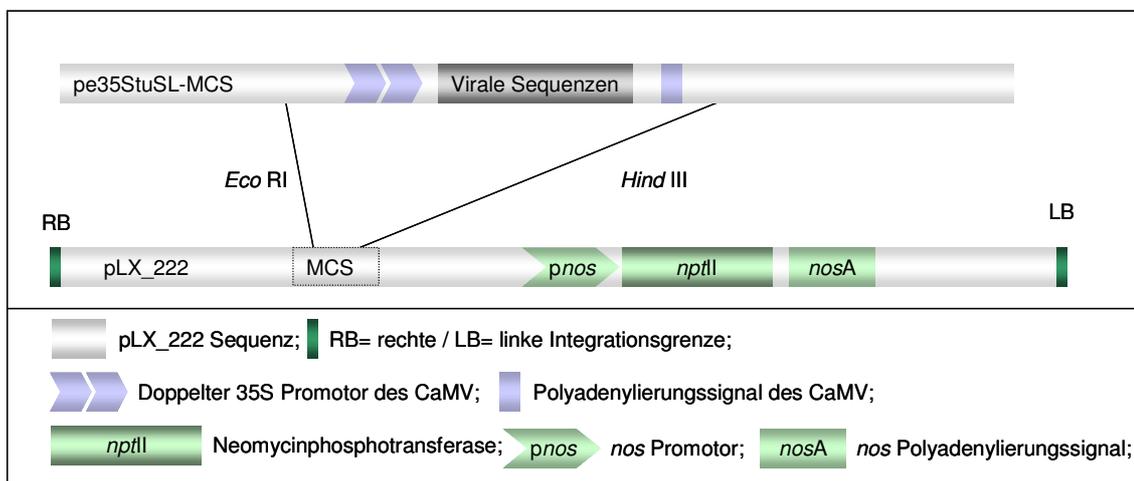


Abb. 4.6 Schematische Darstellung der Umsetzung der Klonierungskassetten aus dem Vektor pe35StuSL-MCS in den binären Vektor pLX_222

Nachdem das Konstrukt pBCPVY1 in den Vektor pe35SLMCS und nachfolgend in den binären Vektor pLX_222 kloniert worden war, wurde die PVY CP - Sequenz auf 109 bp verkürzt und an dem 3' - Ende der viralen Sequenz die (CG)₁₀ eingefügt (Detaillierte Auflistung der Klonierungsschritte s. Tab. 8.3).

Von den hergestellten Konstrukten wurden sechs für die Transformation von *N. benthamiana* - Pflanzen verwendet, die zur besseren Übersicht zusammengefasst in Abb. 4.7 schematisch dargestellt sind.

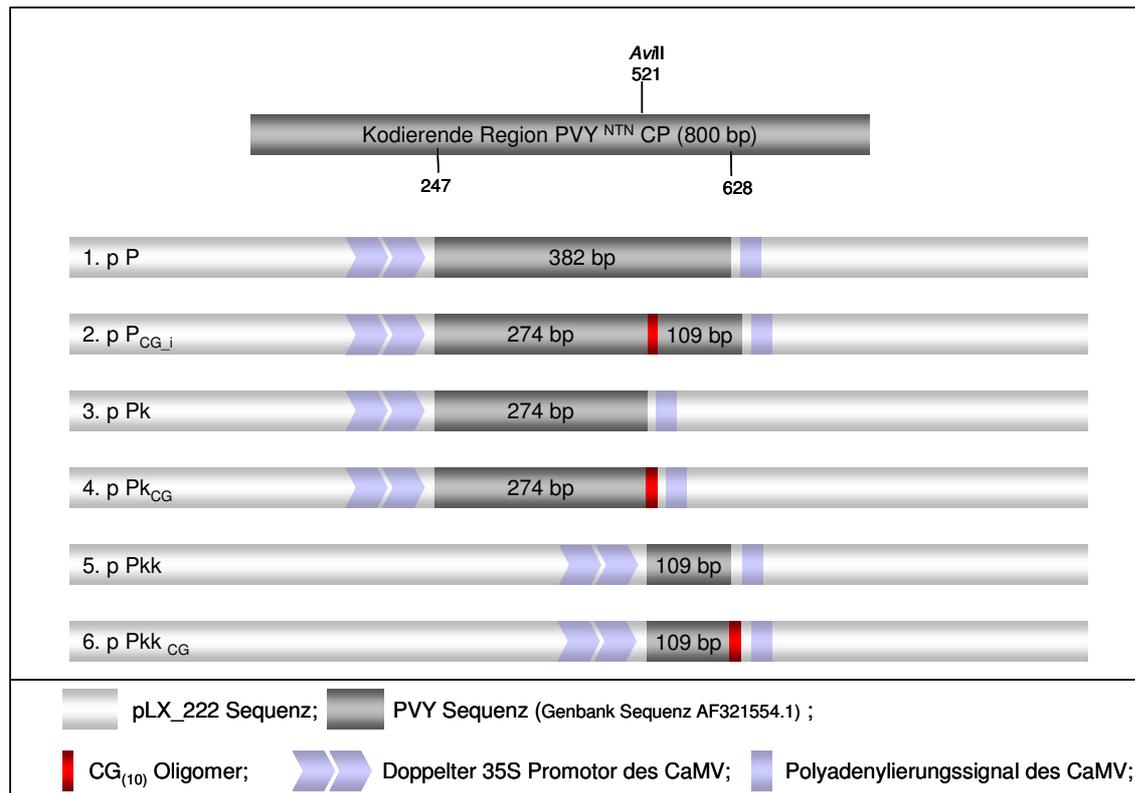


Abb. 4.7 Schematische Darstellung der zur Pflanzentransformation verwendeten PVY Konstrukte

Die Bezeichnungen der Konstrukte wurden aus der Länge der verwendeten CP - Sequenz abgeleitet (P: 382 bp; Pk: 274 bp; Pkk: 109 bp). Der Index CG gibt an, dass an das 3' - Ende der viral abgeleiteten Sequenz (CG)₁₀ angefügt wurden, während der Index CG_i gewählt wurde, um zu verdeutlichen, dass die (CG)₁₀ innerhalb der viral - abgeleiteten Sequenz lokalisiert sind.

4.1.2.4 Klonierung der Hüllproteinabgeleiteten Sequenzen des PLRV und PVX zur Verlängerung der PVY Konstrukte

Die Abschnitte der Hüllproteinsequenzen des PLRV und PVX, die für die Verlängerung der PVY Konstrukte verwendet werden sollten, standen innerhalb der Arbeitsgruppe in Form der Plasmide p388 und p245 zur Verfügung. Um die für die Klonierung notwendigen Erkennungsschnittstellen einzufügen, wurde an dem Plasmid p388 mit einer Standard - PCR unter Verwendung der Primer PLRV_JEup und PLRV_JElo ein 291 bp großes Fragment amplifiziert (s. 3.2.5.1), das 269 bp der kodierenden Sequenz des PLRV CP. Diese entspricht der Position 359 - 627 nt der Genbank Sequenz D13753.1 (KAWCHUK *et al.*, 1989). Nach Reinigung des PCR - Produktes wurde es 3' - terminal an die PVY CP Fragmente unterschiedlicher Konstrukte angehängt (Detaillierte

Auflistung der Klonierungsschritte s. Tab. 8.2) und die Bezeichnung selbiger um ein P für PLRV verlängert. Zur Verdeutlichung sind die hergestellten Konstrukte, die zur Pflanzentransformation verwendet wurden, schematisch in Abb. 4.8 dargestellt.

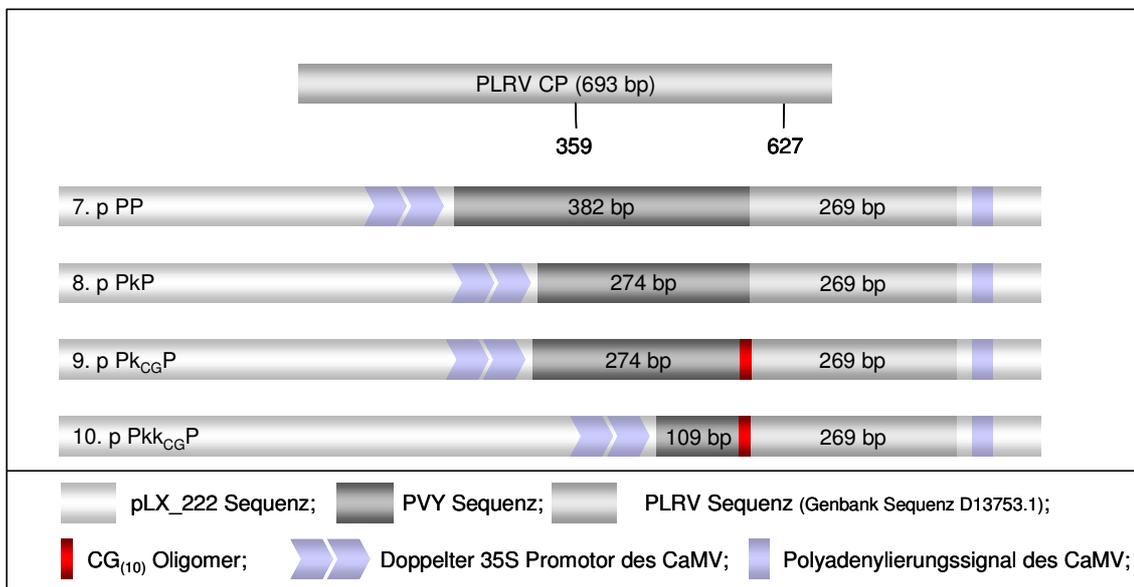


Abb. 4.8 Schematische Darstellung der zur Pflanzentransformation verwendeten PVY - PLRV Konstrukte

Die Bezeichnung der PVY Konstrukte, die mit der 269 bp PLRV CP - abgeleiteten Sequenz verlängert wurden, wurde mit P erweitert.

Durch Amplifikation eines 312 bp großen Fragmentes in einer Standard PCR mit den Primern PVXa und PVXb am Plasmid p245, wurden die notwendigen Restriktionssequenzen an die Enden eines 291 bp langen PVX CP Fragmentes angefügt, mit dem anschließend unterschiedliche PVY-PLRV Konstrukte verlängert wurden (Detaillierte Auflistung der Klonierungsschritte s. Tab. 8.2). Die Zahlen an der schematisch dargestellten CP-Sequenz in Abb. 4.9 beziehen sich auf die Genbank Sequenz M95516.1 (Position: 282 nt - 572 nt; KAVANAGH *et al.*, 1992), deren Nukleotidabfolge der des verwendeten Fragmentes entspricht. Analog zu den PVY-PLRV (PP) Konstrukten wurde der bestehende Konstruktnamen um ein X erweitert, wenn die resultierenden Konstrukte mit PVX CP Fragmenten verlängert wurden. In Abb. 4.9 sind schematisch diejenigen, die für die Pflanzentransformation verwendet wurden, dargestellt.

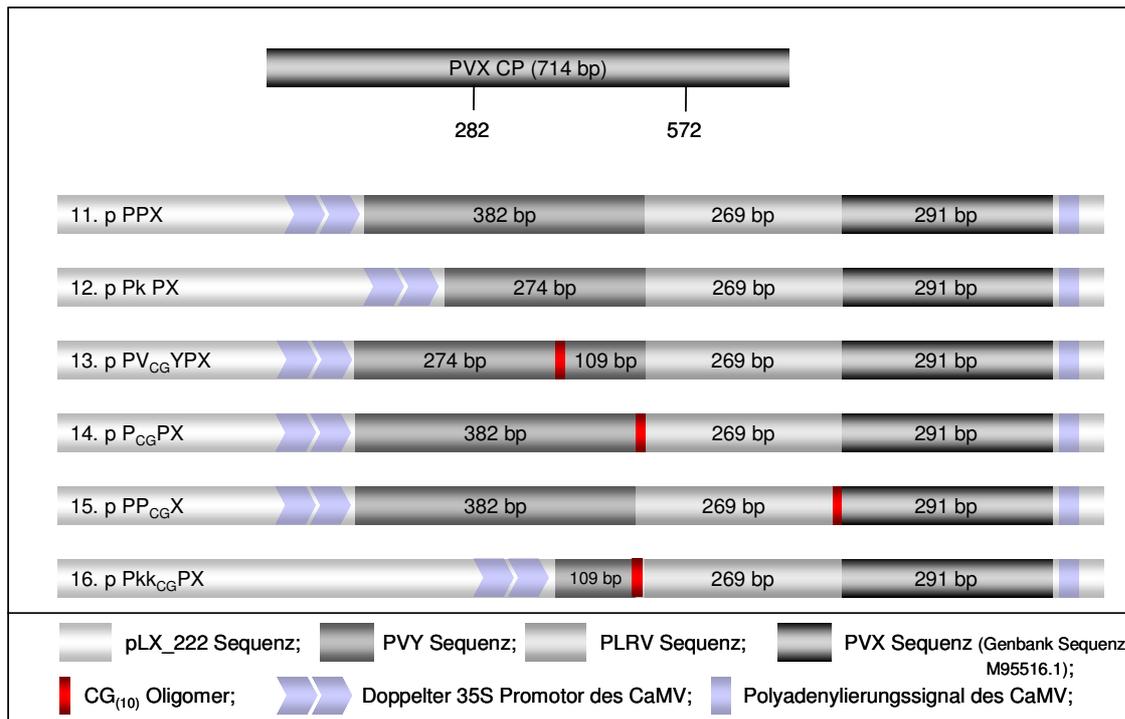


Abb. 4.9 Schematische Darstellung der zur Pflanzentransformation verwendeten PVY - PLRV - PVX Konstrukte

4.1.3 Elektroporation von *A. tumefaciens* LBA4404

Die DNA der Plasmidpräparationen aller 16 Konstrukte wurde gereinigt (s. 3.2.1.2), in *A. bidest* aufgenommen und zur Elektroporation von *A. tumefaciens* Zellen des Stammes LBA 4404 verwendet (s. 3.2.8.2).

Nach Isolation der Plasmide (s. 3.2.8.2.4) wurde mittels Restriktionsverdau überprüft, ob die *A. tumefaciens* Klone mit den binären, rekombinanten Plasmiden transformiert worden waren. Dabei zeigte sich, dass die Qualität der gereinigten Plasmide, vor allem bei den längeren Konstrukten, aus den Agrobakterien z.T. so schlecht war, dass es anhand des Kontrollverdau nicht eindeutig möglich war, positive Klone zu identifizieren. In diesen Fällen wurden die Plasmide erneut in *E. coli* transformiert (s. 3.2.8.2.4), so dass nach anschließender Plasmidpräparation und einem Kontrollverdau eindeutig festgelegt werden konnte, welche *A. tumefaciens* Klone das rekombinante Plasmid aufgenommen hatten (s. Abb. 4.10).

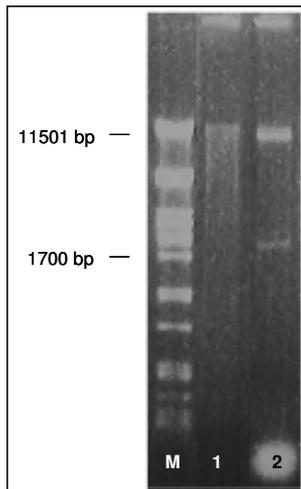


Abb. 4.10 Kontrollverdau der Plasmidpräparation aus *A. tumefaciens* und aus *E. coli* nach einer "Rück" - Transformation

M: λ -*Pst* Größenstandard;

1: Kontrollverdau (*Eco*RI, *Hind*III) einer Plasmidpräparation (Konstrukt pPP_{CGX}) aus *A. tumefaciens*;

2: Kontrollverdau (*Eco*RI, *Hind*III) der Plasmidpräparation aus *E. coli* nach der "Rück"- Transformation des Plasmids (pPP_{CGX});

4.1.4 Transformation von *N. benthamiana* - Pflanzen

Die Transformation der *N. benthamiana* - Pflanzen mit den rekombinanten Agrobakterien erfolgte wie unter 3.2.9 beschrieben. Nach der Umsetzung der vordifferenzierten Sprosse auf T2 Medium, zeigten einige Pflanzen einen veränderten Phänotyp und entwickelten nur in wenigen Fällen Wurzeln, die dann ohne Kontakt zu dem Selektionsmedium in die Luft wuchsen (s. Abb.4.11).

Von den Pflanzen die einen normalen Phänotyp sowie eine normale Wurzelentwicklung zeigten, wurden mindestens fünf pro Konstrukt an Gewächshausbedingungen adaptiert (s. 3.2.9.2.2), während die Pflanzen mit einem untypischen Phänotyp verworfen wurden.



Abb.4.11 Darstellung von transformierten Sprossen auf T₀-Medium

1-4: Pflanzen mit normalem Phänotyp und normaler Wurzelbildung;

A-C: Pflanzen mit abnormalem Phänotyp und „ohne“ Wurzelbildung;

Zur Überprüfung, ob die adaptierten Pflanzen das Transgen tatsächlich aufgenommen hatten, wurde die Gesamtnukleinsäure der T₀ - Mutterpflanzen isoliert (s. 3.2.4.1) und die viral - abgeleiteten Sequenzen in einer Standard - PCR amplifiziert (s. 3.2.5.1). Dazu wurden die Primer 35Eco und 35Hind (s. Tab. 2.11) entwickelt, welche mit der vektorialen Sequenz des pe35StuSL-MCS hybridisieren, die in allen Konstrukten identisch ist (s. Abb. 8.1). Dadurch war es theoretisch möglich, die transgenen viralen Sequenzen aller Konstrukte mit diesem einen Primerpaar nachzuweisen, wobei PCR - Produkte unterschiedlicher Größe entstehen (s. Tab. 8.7).

Bei der Kontrolle der PCR - Produkte im Agarosegel wurde allerdings eine zusätzliche Bande mit einer Größe von ca. 340 bp detektiert. Da diese nur nach Amplifikation der Nukleinsäureextraktion aus transgenen und nicht transgenen *N. benthamiana* - Pflanzen, aber nicht in der Positivkontrolle, die jeweils mit der Plasmidpräparation eines Konstruktes durchgeführt wurde, auftauchte, wurde davon ausgegangen, dass mit dem Primerpaar 35Eco/35Hind auch genomische *N. benthamiana* - DNA amplifiziert wurde (s. Abb. 4.12).

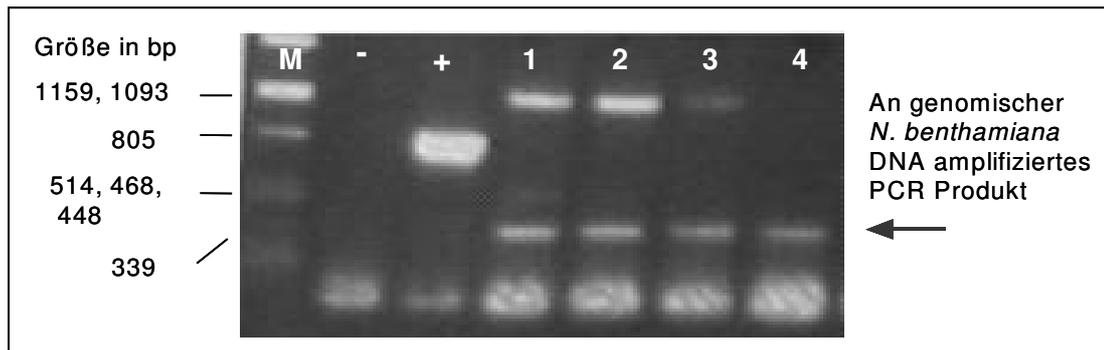


Abb. 4.12 PCR zum Nachweis des Transgens in transformierten *N. benthamiana* - Pflanzen

M: λ -*Pst* Größenstandard; -: Wasserkontrolle; +: Plasmid Kontrolle (Konstrukt pPk_{CG}P); 1 - 3: transformierte *N. benthamiana* (Konstrukt pPkPX); 4: nicht transgene *N. benthamiana*;

Da die Größe dieses Fragmentes in etwa der Größe der Amplikate der Konstrukte pPkk und pPkk_{CG} entsprach (vgl. Tab. 8.7), war durch die Kontrolle der PCR - Produkte im 1%igen Agarosegel keine eindeutige Identifizierung transgener Mutterpflanzen möglich. Darum wurden für den Nachweis der transgenen Sequenz in den Pflanzen der genannten Konstrukte die Primer 35s und Term entwickelt (Lage der Primer s. Abb. 8.1), mit denen eine eindeutige Identifikation transgener *N. benthamiana* - Pflanzen möglich war.

Die T₀ - Pflanzen, in denen das Transgen auf diese Weise eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurden zur Samenreife kultiviert (s. 3.1.2) und abgeerntet (s. 3.2.9.3). Die Anzahl der regenerierten und transgenen samentragenden Mutterpflanzen ist nach Konstrukten gegliedert Tab. 4.1 zu entnehmen. Die Zahl der abgeernteten Pflanzen ist dabei geringer, als die der regenerierten Sprosse, da einige Pflanzen steril waren und andere durch Pilzbefall nicht bis zur Samenreife kultiviert werden konnten.

Tab. 4.1 Auflistung der regenerierten und abgeernteten T₀ - Mutterpflanzen

Konstrukt - Bezeichnung	Anzahl regenerierter Sprosse	Anzahl abgeernteter T₀ - Pflanzen
P	18	16
P _{CG}	14	12
Pk	20	14
Pk _{CG}	14	12
Pkk	15	10
Pkk _{CG}	5	5
PP	21	15
PkP	16	11
Pk _{CG} P	15	12
Pkk _{CG} P	14	13
PPX	16	11
P _{CG} iPX	20	18
P _{CG} PX	14	13
PP _{CG} X	16	11
PkPX	16	16
PVYkkP _{CG} X	19	16

4.2 PVY - RESISTENZTEST

Von mindestens fünf T₁ - Linien wurden pro Konstrukt 15 Pflanzen auf eine PVY - Resistenz hin untersucht (s. 3.1.4). Um den Verlauf der Infektion bzw. der Resistenzausprägung zu dokumentieren, wurden die Pflanzen nach der PVY - Inokulation einmal wöchentlich über einen Zeitraum von mindestens sechs Wochen visuell bonitiert. Dabei wurde durch mehrere stichprobenartig durchgeführte PTA - ELISA (s. 3.2.11.1; Ergebnisse nicht dargestellt) sichergestellt, dass die beobachteten Symptome auf eine PVY Infektion zurückzuführen waren.

Das Ergebnis der PVY - Resistenztests ist in Tab. 4.2 zusammengefasst.

Tab. 4.2 Ergebnisse des PVY - Resistenztest

Konstrukt - Bezeichnung	Anzahl getesteter T ₁ - Linien	Anzahl resistenter Pflanzen pro getesteter Linie
P	11	0
P _{CG}	10	0
Pk	10	0
Pk _{CG}	10	0
Pkk	5	0
Pkk _{CG}	5	0
PP	10	0
PkP	10	0
Pk _{CG} P	10	0
Pkk _{CG} P	10	0
PPX	10	0
PP _{CG} X	11	0
P _{CG_i} PX	10	0
P _{CG} PX	10	0

Tab. 4.2 zeigt, dass es unter Verwendung von 109 - 382 bp langen Sequenzen der Kernregion des PVY Hüllproteins in Sinnstrangkonstrukten nicht möglich war, eine RNA vermittelte Resistenz in *N. benthamiana* - Pflanzen zu etablieren. Die Anfälligkeit wurde auch in den Pflanzen beobachtet, die neben der viralen Sequenz zusätzlich die (CG)₁₀ enthielten.

Auch durch die Verlängerung der PVY CP Sequenzen mit PLRV bzw. PLRV und PVX - CP Fragmenten war es nicht möglich eine RNA vermittelte PVY - Resistenz in *N. benthamiana* - Pflanzen zu etablieren. Analog zu den Pflanzen, die nur die PVY CP Sequenzen enthalten, war auch hier kein Einfluss der (CG)₁₀ auf die Resistenzausprägung erkennbar.

Da die (CG)₁₀ in diesem Fall also keinen sichtbaren Effekt auf die Resistenzausprägung hatten, wurde der Grad der DNA - Methylierung der jeweiligen transgenen Sequenz nicht untersucht.

Obwohl eines der Ziele darin bestand eine multiple Resistenz gegen die Viren zu etablieren, deren Hüllprotein - abgeleiteten Sequenzen im jeweiligen Konstrukt vorlagen, wurden infolge der nicht vorhandenen PVY - Resistenz, der

PLRV- bzw. PVX- Resistenztest mit den entsprechenden Pflanzen nicht durchgeführt.

4.3 TRANSFORMATION VON *N. BENTHAMIANA* - PFLANZEN ZUR ETABLIERUNG EINER MULTIPLER RNA VERMITTELTER VIRUSRESISTENZ MIT *INVERTED REPEAT* KONSTRUKTEN

4.3.1 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die *inverted repeat* Konstrukte

Während der Durchführung dieser Arbeit zeigten SMITH *et al.* (2000), dass es mit Konstrukten, die die NIb - kodierende Sequenz des PVY als *inverted repeat* enthalten, in 100% der untersuchten Pflanzen möglich ist, eine RNA vermittelte Resistenz zu etablieren. Sie zeigten des Weiteren, dass eine Virusresistenz in Pflanzen besonders effektiv etabliert werden kann, wenn die gegenläufigen viralen Sequenzen durch ein selbstspieißendes Intron getrennt werden.

Aus diesem Grund wurde eine Klonierungsstrategie entwickelt, mit der es möglich war die viralen Sequenzen des Konstruktes pPPX in gegenläufig gespiegelte Form zu überführen. Im direkten Vergleich sollten die invertierten Sequenzen im Rahmen dieses Ansatzes einerseits durch die synthetischen (CG)₁₀ und andererseits durch ein selbstspieißendes Intron aus Kartoffel (ST-LS1) getrennt werden (Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie s. Abb. 4.13).

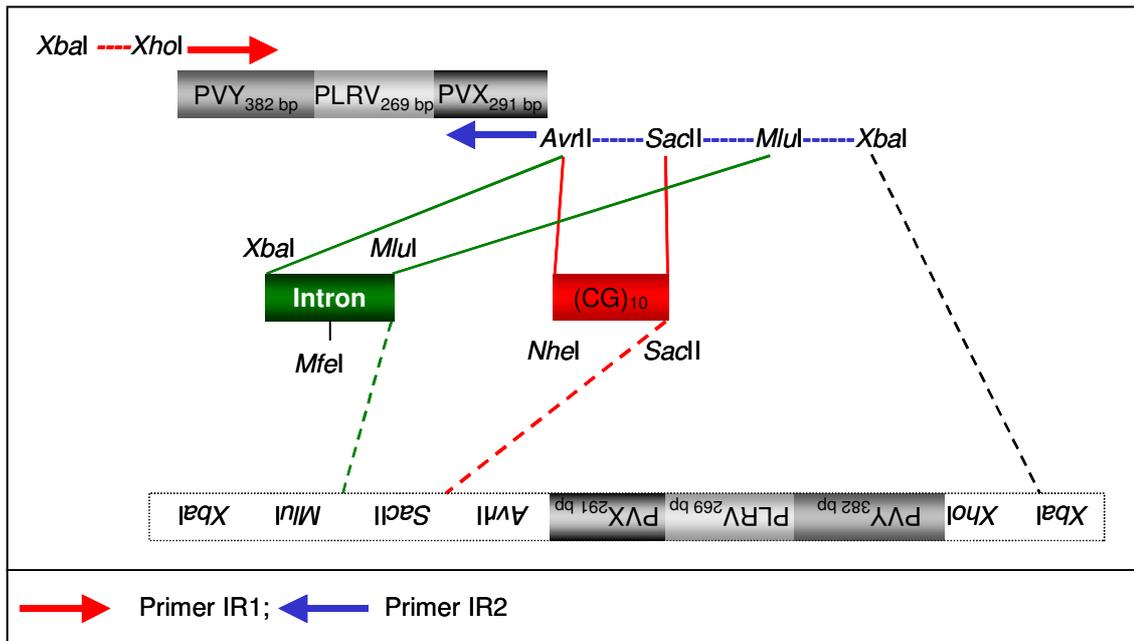


Abb. 4.13 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die *inverted repeat* Konstrukte

4.3.2 Amplifikation und Klonierung der *inverted repeat* Konstrukte

Um an den 5' - Enden die für die Klonierung notwendigen Erkennungsschnittstellen in das Konstrukt pPPPX einzufügen, wurden die Primer IR1 und IR2 (s. Tab 2.11) entwickelt und mit ihnen in einer Standard - PCR am Plasmid pPPPX ein 1020 bp großes Fragment (PPX-IR) amplifiziert.

Die Sequenz des selbstspleißenden Introns ST-LS1 aus Kartoffel lag innerhalb der Arbeitsgruppe im Plasmid V53 vor (s. Tab. 2.4.). Mit den Primern intspl1 (5'-XbaI) und intspl2 (5'-XbaI-MluI-SacI-AvrII; s. Tab. 2.11) konnte an diesem Plasmid ein 239 bp große Fragment "Intron" amplifiziert werden, das an den Enden, die für die Klonierung notwendigen Erkennungsschnittstellen enthielt. Damit die Fehlerrate während der PCR so gering wie möglich gehalten wird und so eher zu gewährleisten war, dass sich das Intron später in den Pflanzen selbst aus der mRNA herauspleißen kann, wurde die Amplifikation mit einem 10:1 Gemisch aus einer *Taq*- und *Pfu* - Polymerase durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl von Klonierungen sind die durchgeführten Schritte in Tab. 8.4 im Anhang aufgelistet.

Die schematische Darstellung der resultierenden Konstrukte pPPPX+CG-XPP und pPPPX+Intron-XPP in dem binären Vektor pLX_222 ist Abb. 4.14 zu entnehmen.

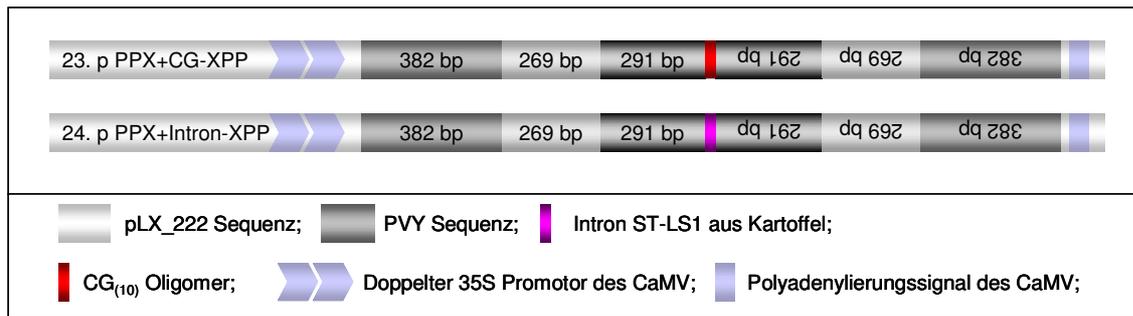


Abb. 4.14 Schematische Darstellung der *inverted repeat* Konstrukte

Zur Kontrolle, ob die Klonierungen der (CG)₁₀ und des Introns fehlerfrei stattgefunden hatten, wurde die DNA je einer Plasmidpräparation der Konstrukte pPPX+CG-XPP und pPPX+Intron-XPP nach Aufreinigung (s. 3.2.1.2) und Verkürzung (Detaillierte Auflistung der Klonierungsschritte s. Tab. 8.5) mit dem Primer M13rev sequenziert.

Die Sequenzvergleiche (s. Abb. 8.19 und Abb. 8.20), sowie die Analyse auf Spleiß - Stellen innerhalb der Sequenzen der beiden Konstrukte pPPX+CG-XPP und pPPX+Intron-XPP mit dem Programm NatGene2 der Technical University of Denmark DTU sind im Anhang in Abb. 8.2 und Abb. 8.3 dargestellt.

4.3.3 Transformation von *A. tumefaciens* LBA4404 und *N. benthamiana* - Pflanzen

Mit den Plasmiden der Konstrukte pPPX+CG-XPP und pPPX+Intron-XPP wurden Zellen des *A. tumefaciens* Stammes LBA4404 elektroporiert (s. 3.2.8.2) und anschließend *N. benthamiana* - Pflanzen mit den rekombinanten Agrobakterien transformiert (s. 3.2.9). Mindestens zehn Pflanzen mit normalem Phänotyp (vgl. Abb.4.11) wurden regeneriert und an Gewächshausbedingungen adaptiert. Wie unter 4.1.4 beschrieben wurde auch in diesem Fall das Vorhandensein des Transgens in den T₀ - Mutterpflanzen nach DNA Extraktion (s. 3.2.4.1) mittels Standard - PCR kontrolliert. Dazu wurde das Primerpaar IR2 und 35Hind verwendet.

Die Größe der erwarteten PCR - Produkte, sowie eine Übersicht über die Anzahl der regenerierten und abgeernteten T₀ - Pflanzen ist in Tab. 4.3 angegeben.

Tab. 4.3 Erwartete Produktgröße der Amplifikate für die einzelnen Konstrukte und die Ergebnisse der Regeneration

Konstrukt	Größe des PCR-Produktes in bp	Anzahl regenerierter Sprosse	Anzahl abgeernteter T ₀ - Pflanzen
PPX+CG-XPP	1106	13	12
PPX+Intron-XPP	982	18	12

4.4 UNTERSUCHUNG EINER MULTIPLER VIRUSRESISTENZ DURCH VERWENDUNG VON *INVERTED REPEAT* KONSTRUKTEN

4.4.1 PVY - Resistenztest

Alle transgenen T₀ - Mutterpflanzen wurden bis zur Samenreife kultiviert, die Samen geerntet und anschließend pro Konstrukt 15 Pflanzen von zehn T₁ - Linien angezogen und einem PVY - Resistenztest unterzogen (s. 3.1.4), dessen Ergebnis in Tab. 4.4 zusammengefasst ist.

Tab. 4.4 Ergebnisse des PVY - Resistenztests (Ansatz B)

Konstrukt - Bezeichnung	Anzahl getesteter T ₁ - Linien	Anzahl resistenter Linien
PPX+CG-XPP	10	3
PPX+Intron-XPP	10	3

In jeweils drei Linien, der mit den *inverted repeat* Konstrukten transformierten *N. benthamiana* - Pflanzen, konnte erfolgreich eine PVY - Resistenz etabliert werden, unabhängig davon, ob die invertierten viralen Sequenzen durch die (CG)₁₀ oder das selbstpleißende Intron getrennt waren. Die einzelnen Pflanzen dieser sechs Linien reagierten dabei immer mit einer PVY Immunität. Die Anzahl der jeweils resistent reagierenden Pflanzen pro Linie variierte allerdings relativ stark (s. Tab. 4.5).

Tab. 4.5 Detaillierte Auflistung der PVY - Resistenzausprägung innerhalb der T₁ - Linien der *inverted repeat* Konstrukte

Konstrukt Bezeichnung	Linien - Nummer	Anzahl Pflanzen		
		anfällig	<i>recovery</i> resistent	immun
PPX+CG-XPP	04	5	-	10
	06	5	-	10
	08	8	-	7
PPX+Intron-XPP	01	13	-	2
	03	6	-	9
	06	13	-	2

Diese Ergebnis zeigt des weiteren, dass die Trennung der invertierten viralen Sequenzen mit den (CG)₁₀ zu einer höheren Anzahl an resistenten Pflanzen pro Linie führt, als die Verwendung des selbstspleißenden Introns ST-LS1.

4.4.2 PLRV Resistenztest

Zur Untersuchung, ob mit den Konstrukten PPX+CG-XPP und PPX+Intron-XPP eine multiple Virusresistenz in *N. benthamiana* - Pflanzen etabliert werden konnte, wurden jeweils 15 Pflanzen der PVY resistent reagierenden Linien (PPX+CG-XPP: 04, 06, 08 und PPX+Intron-XPP: 01, 03 06) auf eine PLRV-Resistenz hin untersucht. Der Versuchsaufbau entsprach dabei dem des PVY - Resistenztests (s. 4.2), allerdings erfolgte die PLRV Inokulation mittels Agroinfiltration (s. 3.1.3.2).

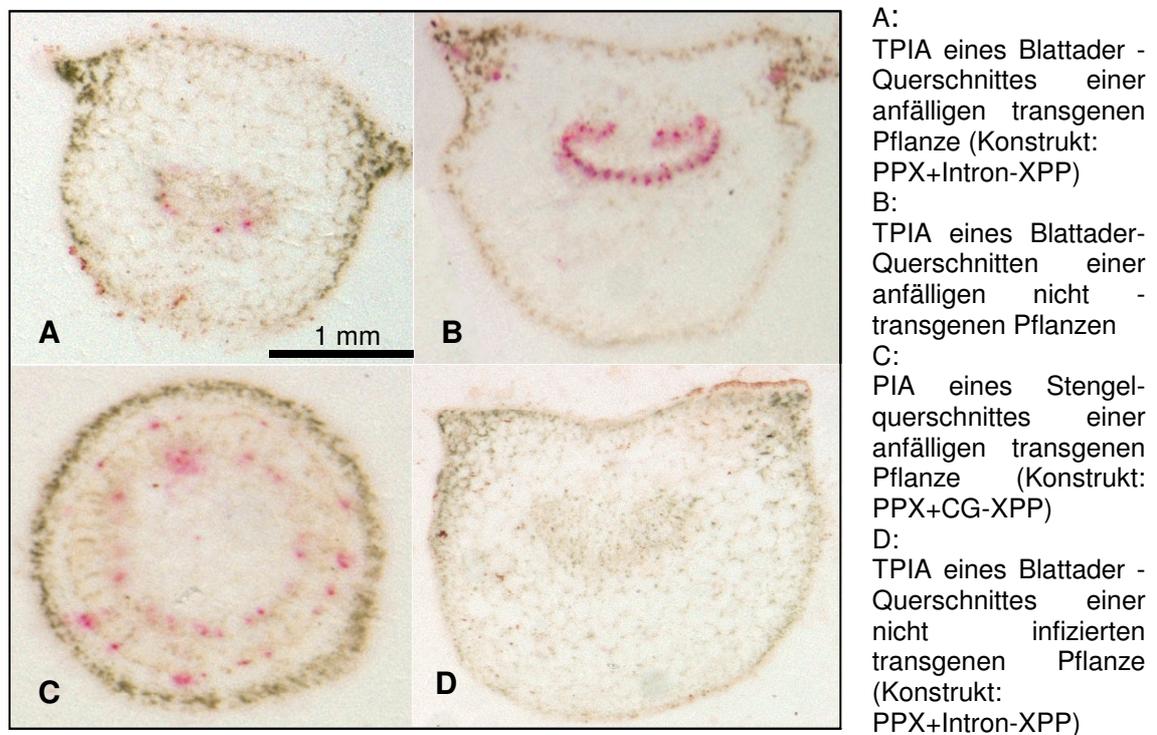
Zuerst wurden die Pflanzen wie beim PVY - Resistenztest einmal wöchentlich visuell bonitiert. Aufgrund der PLRV Symptome, die in *N. benthamiana* - Pflanzen nur sehr schwach ausgebildet werden (s. Abb. 4.15), war eine eindeutige Bonitur allerdings oft nicht möglich.



Abb. 4.15 PLRV Symptome auf *N. benthamiana* - Pflanzen

A: altes Blatt, B: mittelaltes Blatt, C: junges Blatt (erscheint symptomlos)

Darum wurden unterstützend zur visuellen Bonitur alle Pflanzen sechs und zehn Wochen nach der Agroinfiltration mit TPIAs analysiert (s. 3.2.11.3), deren Ergebnis exemplarisch in Abb. 4.16 gezeigt ist.



A:
TPIA eines Blattader -
Querschnittes einer
anfälligen transgenen
Pflanze (Konstrukt:
PPX+Intron-XPP)
B:
TPIA eines Blattader-
Querschnittes einer
anfälligen nicht -
transgenen Pflanze
C:
PIA eines Stengel-
querschnittes einer
anfälligen transgenen
Pflanze (Konstrukt:
PPX+CG-XPP)
D:
TPIA eines Blattader -
Querschnittes einer
nicht infizierten
transgenen Pflanze
(Konstrukt:
PPX+Intron-XPP)

Abb. 4.16 Nachweis von PLRV Partikeln in den Blattadern mittels TPIA

Anhand der Ergebnisse der TPIAs konnten in allen Pflanzen zweifelsfrei PLRV - Partikel nachgewiesen werden. Die Viruskonzentrationen variierten dabei zwar in einzelnen Pflanzen (vgl. Abb. 4.16 A und B), waren allerdings für keine der untersuchten Linien in allen Pflanzen konstant niedriger oder höher, so dass die Angabe der Konzentrationen in den einzelnen Pflanzen nicht detailliert dargestellt ist.

Die Ergebnisse der PLRV - Resistenztestung sind in Tab. 4.6 zusammengefasst.

Tab. 4.6 Ergebnisse des PLRV - Resistenztests

Bezeichnung	Anzahl PVY resistenter Linien	Anzahl PLRV resistenter Pflanzen pro Linien
PPX+CG-XPP	3	0
PPX+Intron-XPP	3	0

In keiner Pflanze der PVY resistent reagierenden *N. benthamiana* - Linien, die mit den *inverted repeat* Konstrukten transformiert worden waren, konnte eine PLRV - Immunität etabliert werden.

4.4.3 PVX Resistenztest

Je 15 Pflanzen der unter 4.4.2 angegebenen Linien wurden parallel auf eine PVX - Resistenz hin untersucht. Der Versuchsaufbau und die Durchführung entsprachen dabei den PVY - Resistenztests (s. 4.2). Ab dem siebten Tag nach PVX Inokulation wurden die Pflanzen sechs Wochen lang einmal wöchentlich visuell bonitiert und das Ergebnis stichprobenartig im PTA - ELISA bestätigt. Das zusammenfassende Ergebnis des PVX Resistenztests ist Tab. 4.7 zu entnehmen.

Tab. 4.7 Ergebnisse der PVX Resistenztests

Bezeichnung	Anzahl PVY resistenter Linien	Anzahl PVX resistenter Linien
PPX+CG-XPP	3	0
PPX+Intron-XPP	3	1*

* Im Verlauf des Versuchs, wurden Temperaturen von mehr als 35°C im Gewächshaus erreicht, so dass die Symptomausprägung aller Pflanzen während der Testperiode variierte und nicht mit den ELISA - Werte korrelierte. Selbst nicht - transgene inokulierte Pflanzen (Positivkontrollen) zeigten zeitweise geringe ELISA - Werte und keine Symptome (s. Tab. 8.8). Neuaustriebe abgeschnittener Pflanze zeigten, bis auf eine Pflanze der PPX+Intron-XPP Linie, die schon 7 dpi keine Symptome zeigte, alle das typische Mosaik. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass diese Pflanze PVX resistent war, wurden Samen dieser Pflanze geerntet, um eine Wiederholung des Resistenztests durchführen zu können.

Da in den Pflanzen der PVY - Resistenz zeigenden Linien weder eine PLRV -, noch eine PVX - Resistenz etabliert werden konnte, zeigen diese Ergebnisse, dass es durch die Transformation von *N. benthamiana* - Pflanzen mit einem Kombinationskonstrukt, das ca. 300 bp lange Hüllprotein abgeleitete Sequenzen des PVY, PLRV und PVX als *inverted repeat* enthält, unabhängig von dem verwendeten *spacer*, nicht möglich war eine multiple Virusresistenz in *N. benthamiana* - Pflanzen mit einem Konstrukt zu etablieren.

4.5 TRANSFORMATION VON *NICOTIANA BENTHAMIANA* - PFLANZEN ZUR ETABLIERUNG EINER RNA VERMITTELTEN PVY - RESISTENZ MIT 592 - 842 bp LANGEN PVY CP FRAGMENTEN

4.5.1 Klonierungsstrategie der Konstrukte, die 592 - 842 bp lange Sequenzen der PVY CP kodierenden Region beinhalten

Da sich mit den Konstrukten, die 109 - 382 bp lange Fragmente des PVY CP kodierenden Bereiches enthalten, keine PVY - Resistenz in *N. benthamiana* - Pflanzen etablieren ließ, wurden in einem neuen Ansatz weitere Konstrukte unter Verwendung von 592 - 842 bp umfassenden CP - Fragmenten des PVY hergestellt. Nach Transformation von *N. benthamiana* - Pflanzen sollte diese auf eine PVY - Resistenz untersucht werden und eine mögliche Korrelation zwischen der Resistenz und dem Grad der DNA Methylierung des Transgens hergestellt werden.

Um den Einfluss der $(CG)_{10}$, sowohl auf die Resistenzausprägung, als auch auf den Grad der Methylierung des Transgens untersuchen zu können, wurden analoge Konstrukte hergestellt, deren virale Sequenz am 3' Ende zum Vergleich mit den $(CG)_{10}$ verlängert wurde. Zu diesem Zweck wurden die Primer PVY_1, PVY_2, PVY_3 und PVY_4 entwickelt (schematische Darstellung s. Abb. 4.17), durch deren Kombination es möglich war, drei unterschiedlichen lange Fragmente der viralen RNA so zu amplifizieren, dass jeweils am 3' Ende der Hüllproteinsequenz die $(CG)_{10}$ lokalisiert waren. Durch den Einbau von Restriktionserkennungssequenzen, die nach einem Verdau komplementäre Enden erzeugen, konnten die $(CG)_{10}$ durch einen einfachen Klonierungsschritt entfernt werden.

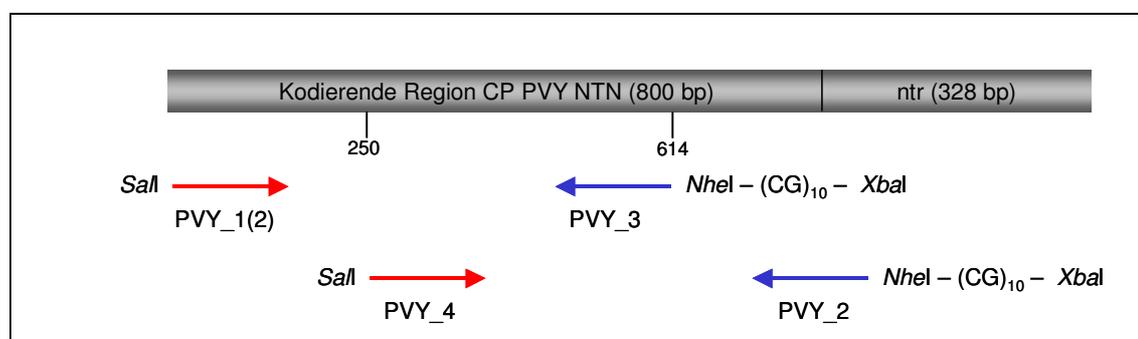


Abb. 4.17 Schematische Darstellung der Lage der Primer zur Amplifikation der längeren PVY CP - Fragmente unter Angabe der verwendeten Restriktionssequenzen

4.5.2 Amplifikation und Klonierung der viralen PVY CP Sequenzen

Nach Extraktion der Gesamt - RNA einer drei Wochen zuvor mit PVY infizierten *N. benthamiana* - Pflanze, wurden die einzelnen Fragmente in einer Einschnitt RT - PCR (s.3.2.5.2.1) mit den Primerkombinationen PVY_1(2)/PVY_2, PVY_1(2)/PVY_3 und PVY_2/PVY_4 amplifiziert und im Agarosegel kontrolliert. Dabei zeigte sich, dass nur die ca. 660 bp langen Fragmente PV und VY in der Einschnitt RT - PCR amplifiziert werden konnten (s. Abb. 4.18).

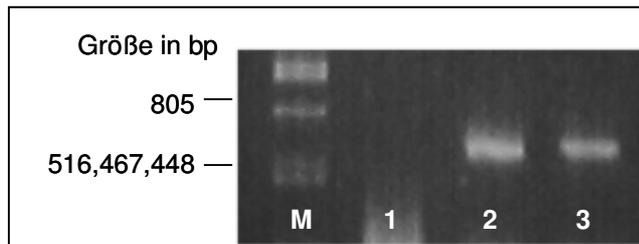


Abb. 4.18 Ergebnis der Einschnitt RT - PCR zur Amplifikation der PVY - CP Sequenzen

- 1: PVY Fragment 2: Primer: PVY_1(2) und PVY_2, erwartete Größe: 890 bp (1 nt - 841 nt, Genbank Sequenz AF321554.1, STANIC-RACMAN *et al.*(2000);
2: PV Fragment: Primer: PVY_1(2) und PVY_3, erwartete Größe: 662 bp (1 nt - 614 nt; Genbank Sequenz AF321554.1, STANIC-RACMAN *et al.*(2000)
3: VY Fragment: Primer: PVY_2 und PVY_4, erwartete Größe: 641 bp (249 nt - 841 nt; Genbank Sequenz AF321554.1, STANIC-RACMAN *et al.*(2000);
M: λ -Pst Größenstandard

Für die Amplifikation des 890 bp langen PVY CP - Fragmentes wurde deswegen das Zweischnitt Verfahren (s. 3.2.5.2) angewendet, indem mit dem antisense Primer PVY_2 die virale RNA in cDNA umgeschrieben (s. 3.2.5.2.2) und diese anschließend mit dem Temperaturprogramm "Gradient" (s. 3.2.5.1) in einer Standard PCR amplifiziert wurde. Das Ergebnis der Gradienten - PCR, sowie die unterschiedlichen *annealing* Temperaturen sind Abb. 4.19 zu entnehmen.

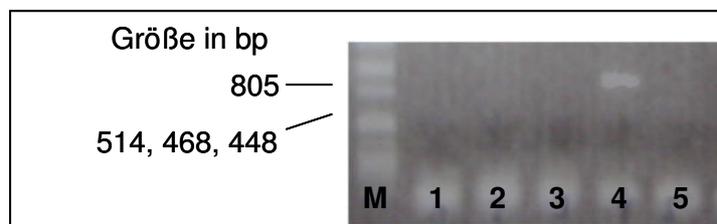


Abb. 4.19 Ergebnis der Gradienten PCR

- M: λ -Pst Größenstandard
PCR - Produkt bei untersch. Anlagerungstemperaturen
1: 46,6°C; 2: 48,3°C; 3: 49,9°C ;
4: 54,3°C ; 5: 57,8°C)

Nachdem das 890 bp lange PVY CP - Fragment in der PCR mit einer Anlagerungstemperatur von 54,3 °C amplifiziert werden konnte, wurden die drei PCR Fragmente PVY 2, PV und VY aufgereinigt (s. 3.2.6), unter Kontrolle des doppelten 35S Promotors und des Polyadenylierungssignals des CaMV gebracht

und die entstandenen Klonierungskassetten in den binären Vektor pLX_222 kloniert (Detaillierte Auflistung der Klonierungsschritte s. Tab. 8.6).

Zur Verdeutlichung der hergestellten Konstrukte sind diese in Abb. 4.20 schematisch dargestellt.

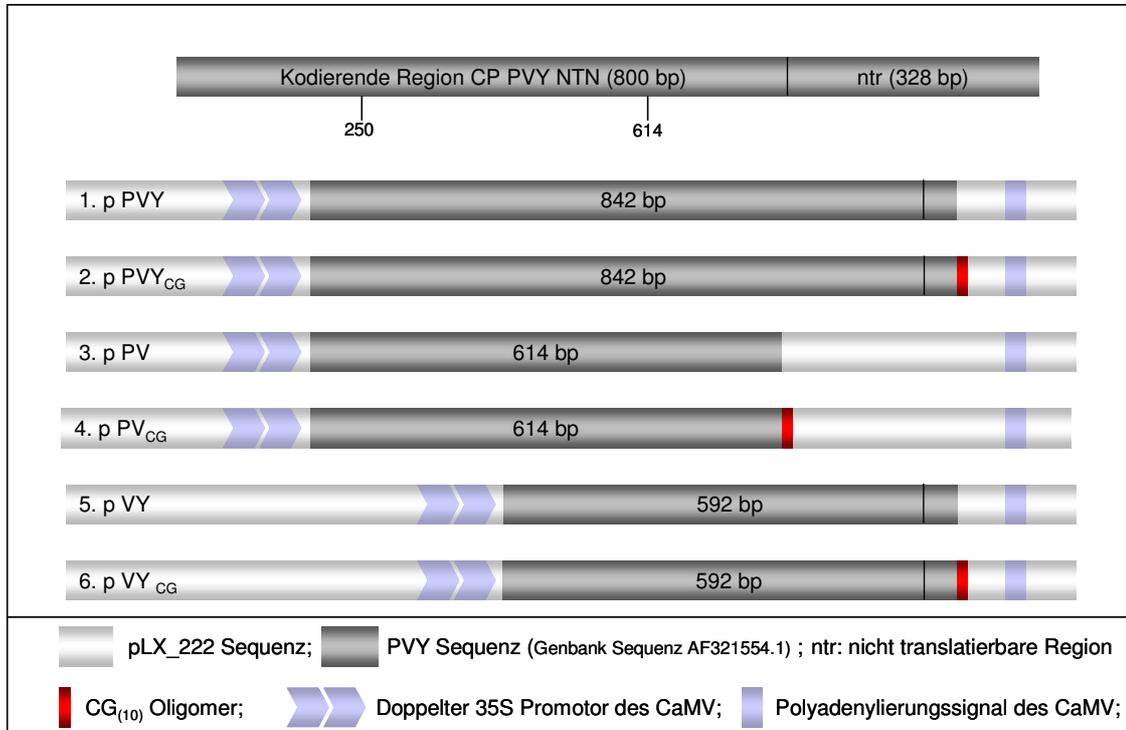


Abb. 4.20 Schematische Darstellung der PVY Konstrukte mit 592 bp, 614 bp und 842 bp langen CP Fragmenten

Die Bezeichnungen für die Konstrukte wurde auch in diesem Fall aus den verwendeten Sequenzbereichen des PVY CP - abgeleitet. Mit PVY wurden die Konstrukte bezeichnet, in denen die gesamte Länge der kodierenden Sequenz vorhanden ist. PV beschreibt die Konstrukte, die die ersten zwei Drittel der kodierenden Region und VY analog dazu diejenigen Konstrukte, die die zweiten zwei Drittel der CP Sequenz beinhalten. Der Index CG gibt analog zu den Konstrukten aus 4.1 an, dass an die viral abgeleiteten Sequenzen die synthetischen (CG)₁₀ angehängt wurden.

4.5.3 Transformation von *A. tumefaciens* LBA4404 und *N. benthamiana* - Pflanzen

Mit den Plasmiden der neuen sechs Konstrukte wurden Zellen des *A. tumefaciens* Stammes LBA4404 elektroporiert (s. 4.2.8.2), anschließend *N. benthamiana* - Pflanzen mit den rekombinanten Agrobakterien transformiert (s. 4.2.9). und mindestens zehn T0 - Pflanzen mit normalem Phänotyp

regeneriert (vgl. Abb.4.11). Nach der Adaption an die Gewächshausbedingungen wurde in den T₀ - Mutterpflanzen das Transgens mittels Standard - PCR mit dem Primerpaar 35Eco und 35Hind nachgewiesen.

Die Größe der erwarteten PCR - Produkte, sowie eine Übersicht über die Anzahl der regenerierten und abgeernteten T₀ - Pflanzen ist in Tab. 4.8 angegeben.

Tab. 4.8 Erwartete Produktgröße der Amplifikate für die einzelnen Konstrukte und die Ergebnisse der Regeneration

Konstrukt	Größe des PCR - Produktes in bp	Anzahl regenerierter Sprosse	Anzahl abgeernteter T ₀ - Pflanzen
PVY	1067	19	12
PVY _{CG}	1096	13	12
PV	839	23	18
PV _{CG}	868	17	15
VY	818	17	14
VY _{CG}	847	15	12

4.6 PVY - RESISTENZTEST

Alle transgenen T₀ - Mutterpflanzen wurden bis zur Samenreife kultiviert, die Samen geerntet und anschließend pro Konstrukt 15 Pflanzen von mindestens zehn T₁ - Linien angezogen und einem PVY - Resistenztest unterzogen (s. 3.1.4), dessen Ergebnis in Tab. 4.9 zusammengefasst ist.

Tab. 4.9 Ergebnisse des PVY - Resistenztests

Konstrukt - Bezeichnung	Anzahl getesteter T ₁ - Linien	Anzahl resistenter Linien
PVY	10	2
PVY _{CG}	10	3
PV	12	2
PV _{CG}	11	0
VY	11	6
VY _{CG}	10	0

Insgesamt zeigten die Pflanzen dieser Linien drei Reaktionen in Folge einer PVY - Inokulation, die im Rahmen dieser Arbeit wie folgt definiert werden:

A. Immunität

bezeichnet Pflanzen, die nach Virusinokulation, im Gegensatz zu den nicht transformierten Kontrollpflanzen, keine visuell bonitierbaren Symptome zeigen und deren Virustiter unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA liegen.

B. Recovery Resistenz

bezeichnet Pflanzen, die nach PVY - Inokulation zuerst mit dem typischen PVY Symptomen reagieren, aber nach ca. 3-4 Wochen symptomfreie Neuaustriebe produzieren, in denen mittels ELISA keine viralen Hüllproteine mehr nachgewiesen werden können.

C. Anfälligkeit

bezeichnet Pflanzen, die wie nicht transgene *N. benthamiana* - Pflanzen, ca. 1 Woche nach PVY - Inokulation ein PVY typisches Mosaik - Symptom zeigen und in denen PVY Partikel mit dem ELISA nachweisbar sind.

Zur Verdeutlichung sind die Symptome dieser drei Reaktionen auf eine PVY - Inokulation in Abb. 4.21 dargestellt.

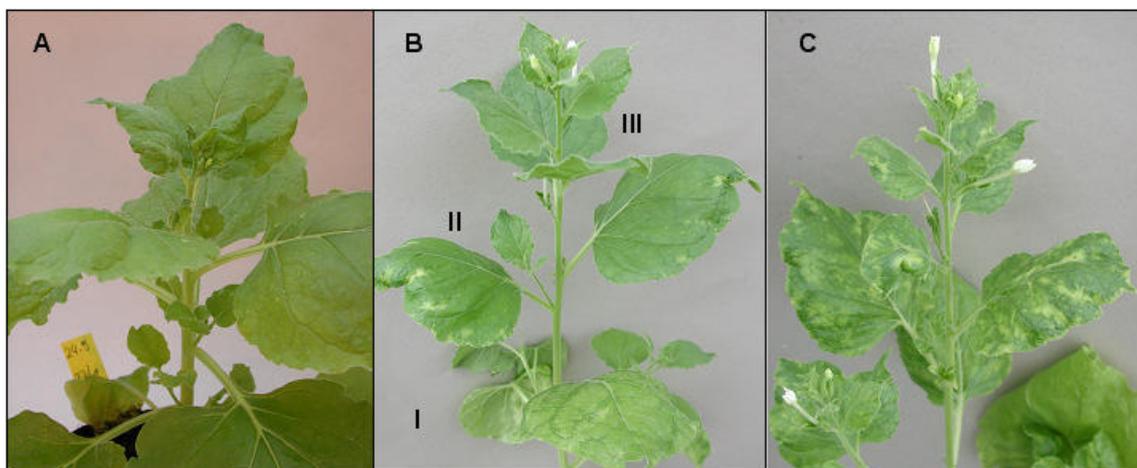


Abb. 4.21 Darstellung der PVY Symptome in *N. benthamiana* - Pflanzen

A: Immunität; B: Recovery Resistenz mit I: starkem Mosaik, II: weniger starkem Mosaik, III: gesundem Neusaustrieb; C: Anfälligkeit

Die Pflanzen der in Tab. 4.9 aufgelisteten resistenten Linien, zeigten immer eine einheitliche Reaktion auf die Virusinfektion hin, wobei unterschiedliche Linien eines Konstruktes z.T. auch verschiedene Resistenzausprägungen zeigten (s. Tab. 4.10).

Tab. 4.10 Detaillierte Auflistung der PVY - Resistenzausprägung der Pflanzen der T₁ - Linien

Konstrukt Bezeichnung	Linien - Nummer	Anzahl Pflanzen		
		anfällig	<i>recovery</i> resistent	immun
PVY	01	14	-	1
	13	12	3	-
PVY _{CG}	01	13	-	2
	02	12	-	1
	09	6	-	6
PV	14	11	-	4
	16	14	-	1
VY	01	4	8	-
	02	13	2	-
	03	13	2	-
	04	1	-	14
	05	9	6	-
	07	2	13	-

Von einzelnen Pflanzen der grau unterlegten Linien wurde der Methylierungszustand der transgenen viralen Sequenz bestimmt (s. 4.8)

Unter der Verwendung von CP - abgeleiteten Fragmenten mit einer Länge von mindestens 592 bp in Einzelstrangkonstrukten konnten durch stabile Transformation PVY resistente *N. benthamiana* - Pflanzen hergestellt werden. Dabei spielte der Bereich aus dem das PVY CP kodierende Fragment stammte eine untergeordnete Rolle, da sowohl mit dem Konstrukt PV, als auch VY eine Resistenz in den Pflanzen etabliert werden konnten. Allerdings wurden nach Transformation der Pflanzen mit dem Konstrukt VY, welches das 3' gelegenen Fragment der CP kodierenden Sequenz umfasst, dreimal so viele resistente Linien pro Konstrukt detektiert. Ein Großteil der Pflanzen dieser Linien reagierte dabei mit einer *recovery* Resistenz, die sonst nur in Pflanzen einer Linie des Konstruktes PVY beobachtet wurde.

Bei Betrachtung der Konstrukte mit den angehängten (CG)₁₀ am 3' Ende der viralabgeleiteten Sequenz fiel auf, dass nur mit dem Konstrukt PVY_{CG} eine PVY - Resistenz etabliert werden konnte, während durch die Kombination der 592 bzw. 614 bp langen CP - Sequenz mit den synthetischen (CG)₁₀ keine

Resistenz in *N. benthamiana* ausgeprägt wurde, so dass das Anfügen der (CG)₁₀ einen negativen Effekt auf die Resistenzausprägung zu haben scheint.

4.7 MOLEKULARE UNTERSUCHUNGEN DER PVY RESISTENTEN LINIEN

4.7.1 Nachweis viraler Proteine im Western - Blot

Um zu zeigen, dass die PVY - Resistenz nicht durch das Vorliegen des Hüllproteins, sondern durch die transgene mRNA vermittelt wurde, wurde exemplarisch mit den Pflanzen des Konstruktes PVY ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurden die Gesamtproteine einer PVY infizierten, nicht transgenen *N. benthamiana* - Pflanze, einer immun reagierenden Pflanze der Linie PVY.13 und einer nicht infizierten Pflanze der selben Linie extrahiert (s. 3.2.11.2.1), in einer diskontinuierlichen Polyacrylamidgel - Elektrophorese aufgetrennt (s. 3.2.3.1), auf eine Nitrocellulose Membran geblottet (s. 3.2.10.4) und das CP mit PVY spezifischen Antikörpern nachgewiesen (s. Abb. 4.22).

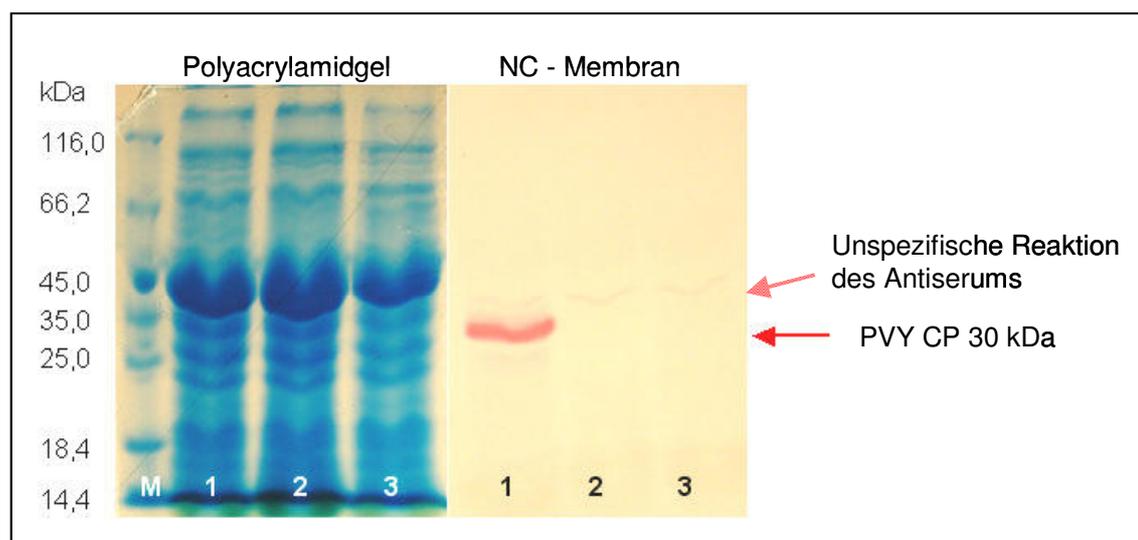


Abb. 4.22 PAGE und Western Blot

M: Protein MW Marker SM0431; 1: PVY infizierte *N. benthamiana*; 2: immun reagierende Pflanze der Linie PVY.13; 3: nicht infizierte Pflanze der Linie PVY.13; NC: Nitrocellulose

Im Polyacrylamidgel (Spuren 1 - 3, linke Seite in Abb. 4.22) ist das 30 kDa große PVY - Hüllprotein unter den Gesamtproteinen der Extraktion nicht zu erkennen. Durch den immunologischen Nachweis mittels Western Blot (NC - Membran) wurde aber eindeutig das Vorliegen des Hüllproteins in der nicht transgenen PVY infizierten *N. benthamiana* - Pflanze gezeigt (Spur 1, rechts in Abb. 4.22). In den Spuren 2 und 3 des Western Blottes ist durch den Antikörper kein PVY - CP detektierbar, da die schwache Bande in diesen Spuren ebenfalls

in Spur 1 zu erkennen ist und scheinbar auf einer Kreuzreaktion des Antiserums mit pflanzlichen Proteinen beruht.

Weder in einer immun reagierenden Pflanze, noch in einer nicht infizierten Pflanze der Linie PVY.13 konnte somit das PVY - CP nachgewiesen werden, so dass, obwohl die gesamte PVY - CP kodierenden Sequenz in dem Konstrukt PVY enthalten ist, eine Expression des CP in den Pflanzen ausgeschlossen werden konnte.

Da die viral - abgeleiteten Sequenzen der Konstrukte PV und VY an derselben Stelle in den Vektor pe35StuSL-MCS kloniert wurden wie das PVY Fragment, wurde davon ausgegangen, dass auch in diesen Pflanzen eine Expression der PVY CP Fragmente nicht möglich war. Ein Nachweis mittels Western Blot wurde nicht durchgeführt, da bei einem negativen Ergebnis nicht festzustellen gewesen wäre, ob nur das Epitop, das vom Antikörper erkannt wird, nicht exprimiert wird oder kein Hüllproteinfragment vorliegt.

4.7.2 Bestimmung der Anzahl der Integrationsorte des Transgens in das *N. benthamiana* - Genom PVY resistenter T₁ - Linien

Für alle Linien der Konstrukte PVY, PVY_{CG}, PV und VY, deren T₁ - Pflanzen mit einer Resistenz auf die PVY - Inokulation reagiert haben, wurde die Anzahl der Integrationsorte des Transgens bestimmt (s. 3.2.9.4). Dazu wurden die Samen auf kanamyzinhaltigem Medium ausgelegt und das Verhältnis der transgenen grünen und nicht transgenen chlorotischen Keimlingen (s. Abb. 4.23) bestimmt.

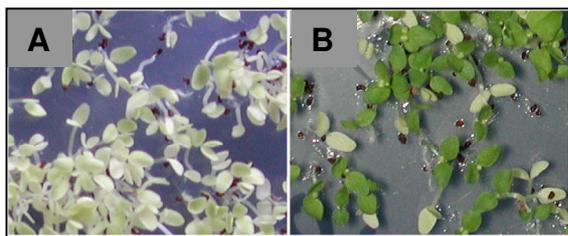


Abb. 4.23 Abbildung Kanamyzin resistenter und nicht resistenter *N. benthamiana* - Keimlinge

A: Keimlinge nicht transgener *N. benthamiana* Pflanzen;

B: Keimlinge transgener *N. benthamiana* - Pflanzen;

Eine detaillierte Auflistung der Auszählung, sowie der χ^2 - Werte und die sich daraus ergebende Anzahl der Integrationsorte für die Pflanzen der PVY - Resistenz zeigenden Linien ist in Tab. 4.11 dargestellt.

Tab. 4.11 Auflistung der Anzahl der Integrationsorte des Transgens in das *N. benthamiana* - Genom in den Linien, deren Pflanzen eine PVY - Resistenz zeigen

Bezeichnung	Linie	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R / Kan ^S	Getestetes Verhältnis	χ^2 - Wert	Anzahl der Integra- tionsorte	PVY - Resistenz
PVY	13	1218	22	55,4	63:1	0,065	3	rR
PVY _{CG}	09	518	161	3,2	3:1	0,240	1	I
PV	14	848	251	3,4	3:1	0,010	1	R
VY	04	925	87	10,6	15:1	0,209	2	I
	07	879	49	17,9	15:1	0,635	2	rR

* Kan^R: Kanamycin resistent; Kan^S: Kanamycin sensitiv; I: Immunität; rR: *recovery* Resistenz; R: Resistenz

Die transgenen Sequenzen wurden an einem bis drei Loci in das Genom der resistent reagierenden *N. benthamiana* - Pflanzen integriert. Eine Immunität der Pflanzen resultierte bei der Integration an einem oder zwei Loci, während eine *recovery* Resistenz in Linien festgestellt werden konnte, bei denen das Transgen an ein oder drei Loci inseriert worden war.

4.8 UNTERSUCHUNG DER METHYLIERUNG TRANSGENER DNA AUS *N. BENTHAMIANA* - PFLANZEN

4.8.1 Wiederholung des PVY - Resistenztests mit ausgewählten Linien

Die sechs, in der Tab. 4.10 grau hinterlegten Linien, wurden aufgrund der jeweiligen Resistenzausprägung und der Anzahl resistent reagierender Pflanzen ausgewählt, um eine Korrelation zwischen der Methylierung der transgenen DNA und der PVY - Resistenz in *N. benthamiana* - Pflanzen zu untersuchen. Dazu wurde der Resistenztest wiederholt, wobei von den Pflanzen der unterschiedlichen Linien Blattproben vor und nach der Infektion genommen wurden, um den Methylierungsstatus der transgenen Sequenz zu beiden Zeitpunkten bestimmen zu können. Die Testperiode dieses Versuchs wurde dabei auf 14 Monate ausgedehnt, um zu untersuchen, ob mit den Konstrukten eine dauerhafte Resistenz etabliert werden kann, die die Pflanzen über den gesamten Lebenszyklus vor einer PVY Infektion schützt.

Wie unter 3.1.4 beschrieben, wurden jeweils 15 Pflanzen pro Linie angezogen und alle Pflanzen auf das Vorliegen der jeweiligen viralen Sequenz mittels Standard - PCR untersucht (s. 4.1.4). Pflanzen in denen das Transgen nicht nachgewiesen werden konnte, wurden aus dem Versuch ausgeschlossen, wodurch es im Folgenden zu einer ungleichen Anzahl getesteter Pflanzen pro Linie kam (s. Tab. 4.12 bis Tab. 4.16).

Direkt vor der mechanischen PVY - Inokulation (Tag 0) wurden von allen Pflanzen Blattproben genommen und gefriergetrocknet.

Die visuelle Bonitur wurde ab Tag 12 nach Inokulation (*days post inoculation*, dpi), als die nicht transgenen Kontrollpflanzen die ersten Symptome zeigten, einmal pro Woche durchgeführt.

42 dpi zeigten die ersten *recovery* resistent reagierenden Pflanzen symptomfreie Neuaustriebe, woraufhin ein PTA - ELISA durchgeführt wurde, um die visuelle Bonitur zu bestätigen. Das verbleibende Material der getesteten Blätter wurde 44 dpi (nach Vorliegen des ELISA - Ergebnis) für die Untersuchung der Methylierung der transgenen Sequenz gefriergetrocknet. Da 55 dpi auf einigen bis dahin symptomlosen Pflanzen kleine chlorotische Flecken und zum Teil Blattdeformationen auftraten, wurde an diesem Tag ein weiterer PTA ELISA mit einzelnen Pflanzen durchgeführt, um zu analysieren, ob sich auch diese Symptome auf eine PVY Infektion zurückführen ließen (Auflistung der ermittelten Daten und Auswertung der PTA ELISA s. 8.7).

77 dpi wurden die Pflanzen zurückgeschnitten und die neu austreibenden Seitentriebe über einen Zeitraum von elf Monaten einmal monatlich visuell bonitiert.

In Tab. 4.12 bis Tab. 4.16 sind die ausführlichen Boniturlisten der Pflanzen der untersuchten Linien dargestellt. Die Boniturliste für die Pflanzen der Linie PVY.01 fehlt, da in der Wiederholung des Resistenztests alle Pflanzen anfällig auf die PVY - Inokulation reagierten und folglich diese Linie von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde.

In den Bonitur - Tabellen sind nur die Termine aufgeführt, an denen sich bei mindestens einer Pflanze die Ausprägung der Symptome verändert hatte. Die Felder sind dunkelgrau unterlegt, sofern die Pflanze nach dem ELISA - Ergebnis (s. Abb. 8.4 und Tab. 8.9) zum jeweiligen Termin als virusinfiziert angesehen werden musste und hellgrau unterlegt, sofern im ELISA kein Virus

in den Pflanzen nachgewiesen werden konnte. Keine farbliche Markierung der Felder zeigt an, dass zu dem jeweiligen Zeitpunkt ausschließlich eine visuelle Bonitur stattgefunden hat.

Tab. 4.12 Boniturergebnis der 15 transgenen Pflanzen der Linie PVY.13

Linie PVY.13	Tage nach Inokulation												Tag der letzten Boni- tur	Reak- tion der Pflan- ze
	Pflanze Nr.	12	21	30	37	42	47	51	72	183	230	309		
01	+	+	+	+	+	+	+	-	†				72	rr
02	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	358	rr
03	+	+	+	?	?	-	?	+	-	+	-	+	432	n.e.
04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	432	a
05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	432	a
06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	432	a
07	+	+	?	-	-	-	-	-	-	-	-	†	252	rr
08	+	?	?	?	?	-	-	-	-	†			183	rr
09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	358	a
10	+	?	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	432	rr
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	432	a
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	432	a
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	432	a
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	432	a
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	†		230	a

+ : Pflanze zeigt eindeutig PVY Symptome; - : Pflanze zeigt keine PVY Symptome; ? : Pflanze zeigt nicht eindeutige Symptome; a : anfällig; rr : *recovery* resistent; n.e. nicht einheitliche Reaktion; † : Pflanze abgestorben

Tab. 4.12 ist zu entnehmen, dass die Pflanzen 02, 07, 08 und 10 mit einer *recovery* Resistenz auf eine PVY - Inokulation reagierten, während die Pflanzen 04, 05, 06, 09 und 11 bis 15 anfällig waren. Eine zeitlich verzögerte *recovery* Resistenz zeigte die Pflanze 01, bei der erst ab Tag 72 nach Inokulation keine Symptome mehr auftraten.

Die Pflanze 03 reagierte mit einer nicht einheitliche Reaktion auf die PVY - Inokulation. Auf ihren Blättern wurden nur zeitweise kleine chlorotische Flecken bonitiert (s. Abb. 4.24), die aufgrund der ELISA - Werte eindeutig auf eine PVY Infektion zurückgeführt werden konnten.



Abb. 4.24 PVY - Symptom der Pflanze PVY13.03, die mit einer nicht einheitlichen Reaktion auf eine PVY Infektion reagiert

Tab. 4.13 Boniturergebnis der zehn transgenen Pflanzen der Linie PVY_{CG}.09

Linie PVY _{CG} .09	Tage nach Inokulation							Tag der letzten Bonitur	Reaktion der Pflanze
	Pflanze Nr.	12	30	37	42	47	51		
01	+	?	-	-	-	+	+	196	irr
02	+	+	+	+	+	+	+	252	a
04	-	-	-	-	-	-	-	309	i
06	-	-	-	-	-	-	-	252	i
07	+	+	+	+	+	+	+	432	a
08	-	-	-	-	-	+	+	152	ir
09	+	+	+	?	+	+	+	309	a
10	+	+	+	+	+	+	+	432	a
13	+	+	+	+	+	+	+	252	a
15	+	+	+	+	+	+	+	252	a

+: Pflanze zeigt eindeutig PVY Symptome; -: Pflanze zeigt keine PVY Symptome; ?: Pflanze zeigt nicht eindeutige Symptome; a: anfällig; irr: instabil *recovery* resistent; i: immun; ir: instabil resistent

In der Linie PVY_{CG}.09 reagierten die Pflanzen 04 und 06 mit Immunität auf die PVY - Inokulation, während die Pflanzen 02, 07, 09, 10, 13 und 15 anfällig waren.

Pflanze 08 zeigte zum ersten Mal 51 dpi Symptome in Form von chlorotischen Flecken und Blattdeformationen, die aufgrund der ELISA - Werte auf eine PVY Infektion zurückzuführen waren. Diese neue Reaktion auf die Virusinfektion wird nachfolgend als „instabile Resistenz“ bezeichnet und wie folgt definiert:

Definition der instabilen Resistenz (iR)

Die Pflanzen zeigen im Gegensatz zu den PVY infizierten Kontrollpflanzen erst nach frühestens sieben Wochen visuell bonitierbare Symptome in Form von chlorotischen Flecken und z.T. starken Blattdeformationen (s. Abb. 4.25), wobei das virale Hüllprotein im ELISA nachweisbar ist.



Abb. 4.25 PVY - Symptom der Pflanze PVY_{CG}-09.01, die mit einer instabilen Resistenz auf eine PVY Infektion reagiert

Die Pflanze 01 zeigte bis 30 dpi die typischen PVY Symptome (s. Abb 4.21 C) und war dann bis Tag 51 Symptom -, und nach dem ELISA - Wert, virusfrei. Ab diesem Zeitpunkt wurden auf der Pflanze durch PVY verursachte kleine chlorotische Flecken und Blattdeformationen (s. Abb. 4.24) bonitiert. Analog zur Definition der instabilen Resistenz wird dieses Phänomen im Folgenden als instabile *recovery* Resistenz (irR) definiert.

Tab. 4.14 Boniturergebnis der sieben transgenen Pflanzen der Linie PV.14

Linie PV.14 Pflanze Nr.	Tage nach Inokulation						Tag der letzten Bonitur	Reaktion der Pflanze
	12	42	47	117	152	183-432		
05	+	+	+	+	+	+	432	a
06	+	+	+	+	+	+	432	a
11	+	+	+	+	+	+	432	a
12	-	-	-	-	+	+	309	ir
13	-	-	-	+	+	+	196	ir
14	+	+	+	+	+	+	432	a
15	+	+	+	+	+	+	432	a

+: Pflanze zeigt eindeutig PVY Symptome; -: Pflanze zeigt keine PVY Symptome; ?: Pflanze zeigt nicht eindeutige Symptome; a: anfällig; ir: instabil resistent;

Tab. 4.14 ist zu entnehmen, dass im Gegensatz zu den sofort mit Symptomen reagierenden Pflanzen 05, 06, 11, 14 und 15, die Pflanzen 12 und 13 mit einer instabilen Resistenz reagierten. Die Resistenzbrechung erfolgte in diesen Pflanzen noch später als bei der Pflanze PVY_{CG} .09.08, da sie erst nach 117 bzw. 152 dpi, also nach knapp vier bis sechs Monaten, die in Abb. 4.25 dargestellten Symptome zeigten.

Tab. 4.15 Boniturergebnis der 15 transgenen Pflanzen der Linie VY.04

Linie VY.04 Pflanze Nr.	Tage nach Inokulation									Tag der letzten Bonitur	Reaktion der Pflanze
	12	21	30	42	47	51	72	117	152-432		
01	+	?	-	-	+	?	-	+	-	152	n.e.
02	-	-	-	-	-	-	-	†	-	72	i
03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	407	i
04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	432	i
05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	203	a
06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	309	i
07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	252	i
08	-	-	-	-	-	-	-	†	-	72	i
09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	309	i
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	358	a
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	407	i
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	203	i
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	230	i
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	152	i
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	407	i

+: Pflanze zeigt eindeutig PVY Symptome; -: Pflanze zeigt keine PVY Symptome; ?: Pflanze zeigt nicht eindeutige Symptome; a: anfällig; i: immun; n.e. nicht einheitlich; †: Pflanze abgestorben

In der Linie VY.04 reagierten die Pflanzen 02 bis 04, 06 bis 09 und 11 bis 15 mit Immunität auf die PVY - Inokulation, während die Pflanzen 05 und 10 anfällig waren.

Bei der Pflanze 01 wurde an Tag 42 ein positiver ELISA - Wert ermittelt, während bei der visuellen Bonitur noch keine Symptome beobachtet wurden. Allerdings wurden auf dieser Pflanze drei Tage später Symptome bonitiert, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Replikation des PVY eingesetzt, aber noch keine Symptomausbildung stattgefunden hatte und somit das sensitivere ELISA - Ergebnis nicht widersprüchlich zur visuellen Bonitur war. Das negative ELISA - Ergebnis an Tag 55 hingegen unterstreicht, dass diese Pflanze mit einer nicht einheitlichen Reaktion auf die PVY Infektion reagierte.

Tab. 4.16 Boniturergebnis der 15 transgenen Pflanzen der Linie VY.07

Linie VY. 07	Tage nach Inokulation															Tag der letzten Bonit- tur	Re- ak- tion
	Pflanze Nr	12	21	30	37	42	47	51	72	117	152	183	196	252	309		
01	+	?	-	-	-	?	-	?	+	+	-	+	?	-	+	432	n.e.
02	+	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	309	rr
03	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	432	rr
04	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	358	irR
05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	†				183	a
06	+	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	432	r
07	+	?	?	?	?	+	+	+	+	+	+	+	+	†		252	irR
08	+	?	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		309	irR
09	+	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	432	rr
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	†					152	a
11	+	?	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	432	irR
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	432	a
13	+	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	309	rr
14	+	?	-	-	-	+	?	?	+	+	+	+	+	+	+	432	irR
15	+	?	-	+	+	+	?	?	+	+	+	+	+	+	+	432	irR

* +: Pflanze zeigt eindeutig PVY Symptome; -: Pflanze zeigt keine PVY Symptome; ?: Pflanze zeigt nicht eindeutige Symptome; a: anfällig; rr: *recovery* resistent; n.e.: nicht einheitlich; †: Pflanze abgestorben

Tab. 4.16 ist zu entnehmen, dass die Pflanzen 02, 03, 06, 09 und 13 der Linie VY.07 mit einer *recovery* Resistenz und die Pflanzen 05, 10 und 12 anfällig auf die Inokulation mit PVY reagierten.

Bei den Pflanzen 04, 07, 08, 11 und 14 wird aufgrund der ELISA - Werte davon ausgegangen, dass sie bereits 42 dpi mit PVY infiziert waren, obwohl die Symptome erst 47 dpi visuell bonitiert wurden. Da bis zum Ende des Testzeitraumes die chlorotischen Flecken und Blattdeformationen beobachtet werden konnten, reagierten diese Pflanzen mit einer instabilen *recovery* Resistenz.

Die Pflanzen 01 und 15 zeigten, wie schon Pflanzen der Linien PVY.13.03, PVY_{CG}.09 und VY.04 keine einheitliche Reaktion auf die Virusinfektion, wobei nur für die Pflanze 15 die visuelle Bonitur durch die ELISA - Werte unterstützt wurde. Im Fall der Pflanze 01 wurden nur an Tag 42 keine Symptome bonitiert,

während sie nach dem ELISA - Wert als virusinfiziert angesehen werden musste. Dieses war der einzige Fall, in dem die visuelle Bonitur nicht mit dem ELISA - Ergebnis korrelierte.

Das Ergebnis des wiederholten PVY - Resistenztests und die Effizienz mit der die Resistenz durch die einzelnen Konstrukte vermittelt wurde, ist zusammengefasst in Tab. 4.17 dargestellt.

Tab. 4.17 Zusammenfassung der Ergebnisse des wiederholten PVY - Resistenztests mit Angaben zur Effizienz der jeweiligen Konstrukte

Konstrukt	Linien Nr.	Anzahl getestete Pflanzen	Anzahl resistente Pflanzen	Reaktion der Pflanzen im Resistenztest	Effizienz des Resistenz-Test in %
PVY	13	15	4	rR	26,7
PVY _{CG}	09	10	3 (1 iR)	I/iR	30 → 20
PV	14	7	2 (2 iR)	I/iR	28,6 → 0
VY	04	15	11	I	73,3
	07	15	13 (6 iR)	RR/irR	86,7 → 46,7

*iR: instabile Resistenz; rR: *recovery* Resistenz; I: Immunität; irR: instabile *recovery* Resistenz
 → : Abnahme der Effizienz durch das Phänomen der instabilen (*recovery*) Resistenz

Nur die Pflanzen der Linie PVY.13 und VY.04 reagierten über den gesamten Testzeitraum von 14 Monaten, mit einer stabilen Resistenzreaktion auf die PVY - Inokulation. Unabhängig von der Länge oder Lokalisation der verwendeten CP - Sequenz traten in allen anderen Linien Pflanzen auf, bei denen die Resistenz nach unterschiedlich langer Zeit gebrochen wurde. Der Anteil der Pflanzen, die mit einer Instabilen Resistenz reagierten, variierte in den einzelnen Linien von 33,3 % (PVY_{CG}), 46,1% (VY.07) bis 100 % (PV).

Das Konstrukt, mit dem am effizientesten eine Resistenz etabliert werden konnte, war das Konstrukt VY. Im Gegensatz zu diesen beiden VY Linien, die das Transgen an jeweils 2 Integrationsorten inseriert hatten, wiesen die Linien der anderen untersuchten Konstrukte im Vergleich ein oder drei Integrationsorte auf (vgl. Tab. 4.11).

Zur Analyse, ob die Ausprägung einer PVY - Resistenz mit der C - Methylierung des Transgens korreliert, wurden von den Pflanzen der T₁ - Linien (s. Tab. 4.18) je eine *recovery* resistent bzw. immun und eine anfällig - reagierende Pflanze ausgewählt, deren DNA sowohl vor der Inokulation mit PVY, als auch nach Ausbildung der Resistenz bzw. der Symptome, auf die Cytosinmethylierung

innerhalb der viral - abgeleiteten Sequenz untersucht werden sollte. Zur besseren Übersicht sind die ausgewählten Pflanzen in Tab. 4.18 aufgelistet.

Tab. 4.18 Auflistung der für die Methylierungsanalyse ausgewählten Pflanzen

Konstrukt	Linie	Pflanze	Reaktion auf PVY - Inokulation
PVY	13	10	<i>recovery</i> resistant
		15	anfällig
PVY _{CG}	09	06	immun
		15	anfällig
PV	14	13	instabil resistant
		14	anfällig
VY	04	04	immun
		10	anfällig
	07	06	<i>recovery</i> resistant
		10	anfällig

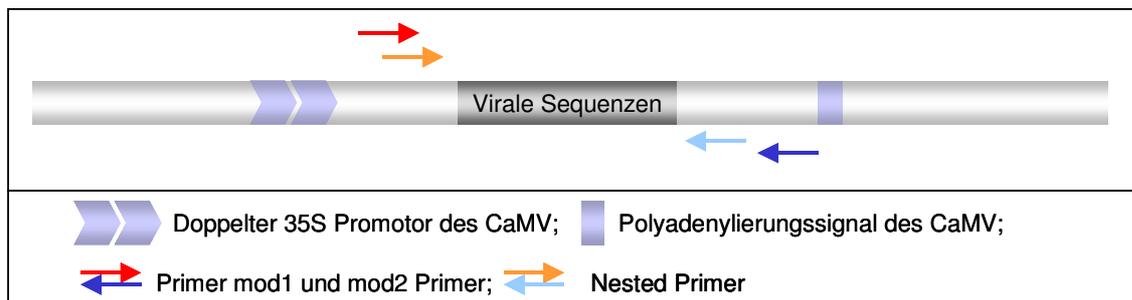
4.8.2 Entwicklung der Primer und weitere vorbereitende Arbeiten für die Modifikation transgener DNA mit Bisulfit

Um die transgene DNA vor und nach der Modifikation amplifizieren zu können, wurden die Primer mod1 und mod2 (s. Tab. 4.19) nach den unter 3.2.10.3 beschriebenen Parametern entwickelt, deren Lage so gewählt wurde, dass sie mit der Sequenz des Vektors pe35StuSL-MCS hybridisieren, die in allen Konstrukten gleich ist (s. Abb. 4.26).

Mit dem Programm Primo MSP 3.4 wurden die *nested* gelegene Primerpaare Ms/Mas und Ums/Umas entwickelt (s. Tab. 4.19, vgl. 3.2.10.3). Die Lage der entwickelten Primer ist Abb. 4.26 zu entnehmen.

Tab. 4.19 Auflistung der Primer zur Amplifikation der modifizierten DNA

Bezeichnung	Sequenz
Mod1	ATTCATTTGGAGAGGGTGG
Mod2	AAGAACCCTAATTCCCTTATCT
Mas	AAAAAAAAAACTAATAATTTTTACGAAC
Ms	GGGTGGTTATTAGTATTTTTCGAC
Umas	AAAAAAAAAACTAATAATTTTTACAAA
Ums	GGGTGGTTATTAGTATTTTTTGAT

**Abb. 4.26 Schematische Darstellung der Lage der Primer zur Amplifikation der Bisulfit modifizierten transgenen Nukleinsäure**

Zur Untersuchung, ob mit den Primerpaaren mod1/mod2, Ms/Mas und Ums/Umas nicht modifizierte Nukleinsäure amplifiziert werden kann, wurde eine Standard - PCR mit den Plasmiden (1:50_{Aq}) der einzelnen Konstrukte durchgeführt (s. 3.2.12.2). Die jeweils erwartete Produktgröße ist Tab. 4.20 zu entnehmen, Abb. 4.27 zeigt exemplarisch das Ergebnis der PCR an nicht modifizierter Plasmid DNA für das Konstrukt VY.

Tab. 4.20 Erwartete PCR - Produktgröße für die einzelnen Konstrukte

Konstrukt	Produktgröße in bp für das Primerpaar mod1/mod2	Produktgröße in bp für die Primerpaare Ums/Umas und Ms/Mas
PVY	987	901
PVY _{CG}	1016	930
PV	759	673
VY	738	652

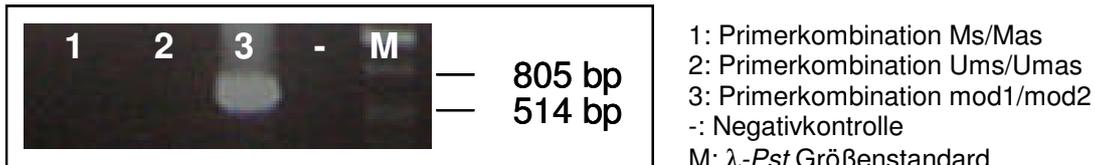


Abb. 4.27 Ergebnis der Amplifikation an nicht modifizierter Plasmid DNA des Konstruktes VY mit den Primerpaaren Ms/Mas, Ums/Umas und mod1/mod2 DNA

Die PCR wurde mit den Plasmiden aller Konstrukte durchgeführt und somit sichergestellt, dass das Primerpaar mod1/mod2 ein Amplifikat der gewünschten Größe liefert, während mit den Primerpaaren Ms/Mas und Ums/Umas nicht modifizierte Nukleinsäure nicht amplifiziert werden konnte.

Als nächstes wurde untersucht, ob es möglich war mit den Primerpaaren Ms/Mas und Ums/Umas modifizierte DNA zu amplifizieren. Vorbereitend dazu wurden die Plasmide pe35PVY, pe35PVY_{CG}, pe35PV und pe35VY in den methylierungsdefekten *E. coli* Stamm JM 110 transformiert (s. Tab. 1.3) und anschließend jeweils 1 pg Plasmid - DNA modifiziert (s. 3.2.10) und in einer Standard - PCR (s. 3.2.12.2) mit den Primerpaaren mod1/mod2, Ums/Umas und Ms/Mas amplifiziert (s. Abb. 4.28).

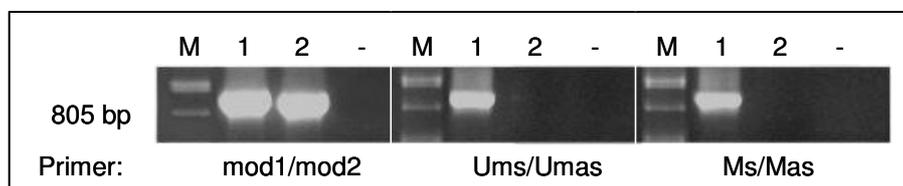


Abb. 4.28 Ergebnis der Amplifikation von Plasmid DNA nach der Bisulfit - Modifikation (exemplarisch für das Konstrukt PVY_{CG})

1: modifizierte Plasmid - DNA (Konstrukt PVY_{CG}); 2: nicht modifizierte Plasmid - DNA (Konstrukt PVY_{CG}); M: λ -Pst Größenstandard; -: Negativkontrolle

Exemplarisch für alle Konstrukte ist in Abb. 4.28 gezeigt, dass es mit den Primern mod1/mod2 möglich war, sowohl modifizierte, als auch nicht modifizierte DNA zu amplifizieren. Im Gegensatz dazu konnte mit den Primerpaaren Ums/Umas und Ms/Mas nur Bisulfit - modifizierte Plasmid DNA amplifiziert werden. Nach der Transformation in den *E. coli* Stamm JM110 liegen alle C innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz in nicht methylierter Form vor, so dass angenommen wurde, dass ein Fragment nur mit dem Primerpaar Ums/Umas regeneriert werden kann. Da aber mit beiden Primerpaaren ein PCR - Produkt gebildet wurde, scheint der

Methylierungsstatus des am 3' - Ende der Primer gelegenen C, nicht für die Hybridisierung der Primer entscheidend zu sein.

4.8.2.1 Kontrolle der Bisulfit Modifikation mit Hilfe von pBluescriptII - DNA

Zur Analyse, ob entweder die Spezifität der Primer nicht hoch genug war oder die Modifikation nicht vollständig stattgefunden hatte, wurde die Effizienz der Modifikation mit Hilfe von pBluescriptII - DNA bestimmt (s. 3.2.10.4).

Zuerst wurden die Primer amp1 und amp2 hinsichtlich ihrer Fähigkeit geprüft, ausschließlich an Bisulfit - modifizierter DNA zu binden. Dazu wurde jeweils 1 pg pBlueskriptII DNA mit Bisulfit modifiziert, aufgereinigt, in einer Standard - PCR amplifiziert (s. 3.2.12.2) und anschließend im Agarosegel kontrolliert (s. Abb. 4.29).

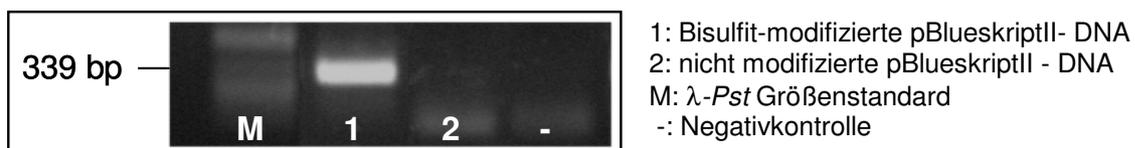


Abb. 4.29 Kontroll - PCR für die Primer amp1/amp2 zur Amplifikation Bisulfit-modifizierter DNA aus dem Ampicillinresistenz vermittelnden Gen des Plasmids pBluescriptII

Auf diese Weise wurde gezeigt, dass ausschließlich modifizierte pBlueskriptII-DNA mit den Primern amp1/amp2 amplifiziert werden konnte. Zur Bestimmung der Effizienz der Modifikation, wurde das Amplifikat der modifizierten pBlueskriptII DNA gereinigt (s. 3.2.6), kloniert (s. 3.2.12.4) und sequenziert.

Das anschließend durchgeführte Alignment ist in Abb. 4.30 dargestellt.

	* * ***** ** ***** ** ** ***** *** * **	
amp	GCTCCAGATTTATCAGCAATAAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGGAG	50
2	GTTTTAGATTTATTAGTAATAAATTAGTTAGTTGGAAGGGTTGAGTGTAG	50
ruler	1.....10.....20.....30.....40.....50	
	***** ** ** ***** * * ** *** *****	
amp	AAGTGGTCCCTGCAACTTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC	100
2	AAGTGGTTTTTGTAAATTTTATTTGTTTTTTATTAGTTTATTAATTGTTGTT	100
ruler60.....70.....80.....90.....100	
	***** ***** ***** * ***** * ** *****	
amp	GGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTGCGCAAAGTTGTT	150
2	GGAAGTTAGAGTAAGTAGTTTGTAGTTAATAGTTTGTGTAATGTTGTT	150
ruler110.....120.....130.....140.....150	
	* **** ** *** ** ***** * * ** ***** **	
amp	GCCATTGCTAAGGCATCGTGGTGTCAAGCTCGTGGTTGGTATGGTTCC	200
2	GTTATTGTTATAGGTATTGTGGTGTTATGTTTGTGTTGGTATGGTTTT	200
ruler160.....170.....180.....190.....200	
	*** ** * **** ** *** **** ***** ***** ****	
amp	ATTGAGTCCGGTTCCCAAAGATCAAGCCGAGTTACATGATCCCCATGT	250
2	ATTTAGTTTTGTTTTTTAATGATTAAGGTGAGTTATATGATTTTTTATGT	250
ruler210.....220.....230.....240.....250	
	**** ***** ***** * ** *** * *** ***** *****	
amp	TGTGCAAAAAGCGGTTAGTCCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGT	300
2	TGTGTAAAAAGTGGTTAGTTTTTTTTGGTTTTTTGATTGTTGTAGAAAGT	300
ruler260.....270.....280.....290.....300	
	***** * *****	
amp	AAGTTGGCCGAGTGTTAT	319
2	AAGTTGGTTGTAGTGTAT	319
ruler310.....	
	Summe mC = 0	

Abb. 4.30 Alignment der modifizierten sequenzierten - mit der nicht modifizierten Sequenz des Ampicillinresistenzgen - Fragmentes des pBlueskriptII

amp: Sequenzfragment der nicht modifizierten *amp^r* DNA;

2: Sequenzfragment der modifizierten *amp^r* DNA

Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass in der sequenzierten Nukleotidabfolge alle C innerhalb des amplifizierten *amp^r* Gen - Fragmentes in U und sukzessive in T konvertiert wurden, so dass in diesem Fall die Modifikation mit einer Effizienz von 100% stattgefunden hat.

4.8.2.2 Adaption der Methode der Bisulfit Modifikation nach RAIZIS an *N. benthamiana* - DNA

Zur Untersuchung der Cytosin - Methylierung der viral - abgeleiteten Sequenzen aus den transgenen *N. benthamiana* - Pflanzen, wurde die Methode der Bisulfit - Modifikation (s. 3.2.1.2) nach RAIZIS *et al.* (1995) schrittweise adaptiert. Dazu wurde die Gesamtnukleinsäure der ausgewählten transgenen *N. benthamiana* - Pflanzen extrahiert (s. 3.2.4.2) und 2 µg der Gesamt - DNA mit Bisulfit modifiziert (s. 3.2.12). Nach der Reinigung wurden die Sequenzen mit einer Standard - PCR (s. 3.2.12.2) mit den Primern mod1 und mod2 amplifiziert und im Agarosegel kontrolliert. Ein Amplifikat wurde dabei nur in der Spur der Positivkontrolle, in der modifizierte Plasmid - DNA des Konstruktes PVY_{CG} amplifiziert wurde, detektiert, während die Amplifikation der genomischen DNA keine Fragmente lieferte.

Um zu überprüfen, ob die DNA dieser Ansätze reamplifizierbar war, wurde eine weiteren Standard - PCR mit den *nested* Primepaaren Ms/Mas und Uma/Umas durchgeführt, in der 2,5 µl der oben beschriebenen PCR Ansätze als *Template* eingesetzt wurden. In der Kontrolle dieser PCR im Agarosegel wurden, unabhängig von dem verwendeten Primerpaar, die gewünschten Fragmente der modifizierten transgenen *N. benthamiana* - DNA detektiert (s. Abb. 4.31).

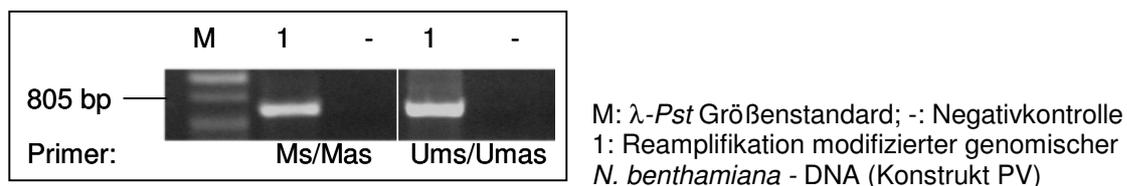


Abb. 4.31 Ergebnis der Reamplifikation modifizierter transgener *N. benthamiana* - DNA

Allerdings war es auch in diesem Fall nicht möglich, aufgrund der eingesetzten Primerkombination eine Aussage über den Methylierungszustand des C innerhalb der CpG Sequenz am 3' - Ende der Primer zu treffen (vgl. 4.8.2).

Das resultierende PCR - Produkt der Bisulfit - modifizierten transgenen DNA (s. Abb. 4.31) wurde aus dem Gel eluiert (s. 3.2.2.3), kloniert, aufgereinigt, sequenziert (s. 3.2.12.3 - 3.2.12.5) und anschließend mit der Originalsequenz verglichen (s. Abb. 4.32).

(s. 3.2.4.1) und 1 pg pBlueskriptII - DNA in einem Reaktionsgefäß mit Bisulfit modifiziert.

Um auszuschließen, dass die pflanzliche DNA die parallele Amplifikation beider Fragmente negativ beeinflusst, wurde in einem Ansatz die pBlueskriptII- DNA separat modifiziert und erst anschließend mit 2 µg nicht modifizierter Gesamtnukleinsäure einer *N. benthamiana* - Pflanze gemischt. In einer Multiplex - PCR, unter Verwendung der zwei Primerkombinationen mod1/mod2 und amp1/amp2, wurde dann versucht jeweils beide PCR - Produkte unter Standard Bedingungen (s. 3.2.12.2) zu amplifizieren.

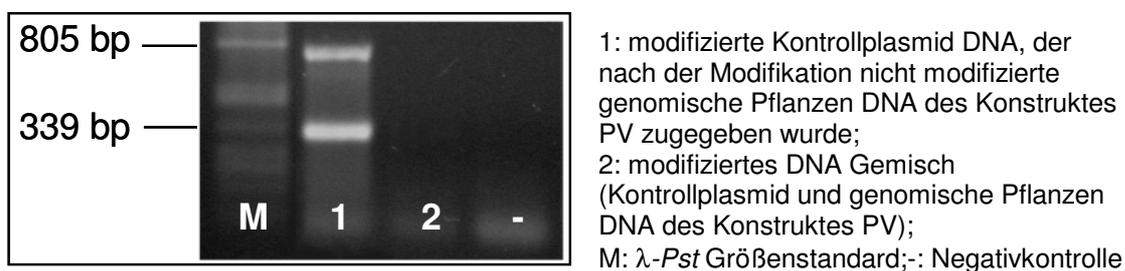


Abb. 4.33 Vergleich der Ergebnisse einer Multiplex PCR zur Amplifikation von modifizierter Kontrollplasmid DNA, die vor und nach der Modifikation mit genomischer Pflanzen DNA vermischt wurde

Da bei Kontrolle der Amplifikate im Agarosegel (s. Abb. 4.33) festgestellt wurde, dass das Kontrollfragment nur in der Probe amplifiziert werden konnte, in der die nicht modifizierte pflanzliche DNA nachträglich zugegeben worden war, wurde im Folgenden versucht, das Kontrollfragment und die DNA der transgenen Pflanze in Parallelansätzen zu amplifizieren. Das Ergebnis der PCR und der Reamplifikation ist in Abb. 4.34 dargestellt.

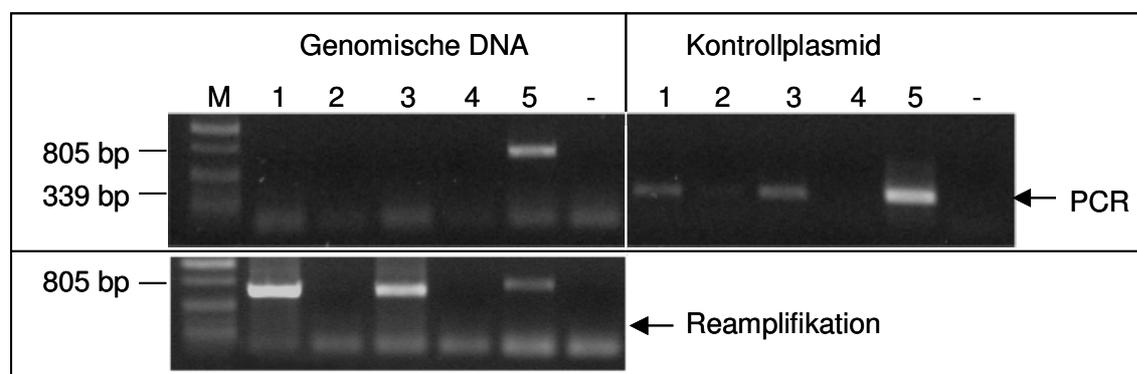


Abb. 4.34 Amplifikation und Reamplifikation der modifizierten genomischen DNA und der Kontrollplasmid DNA in Parallelansätzen

1: DNA Gemisch (Konstrukt PV + pBlueskriptII); 2: DNA Gemisch (Konstrukt PVY + pBlueskriptII); 3: DNA Gemisch (Konstrukt VY + pBlueskriptII); 4: DNA Gemisch (Konstrukt VY + pBlueskriptII); 5: Positivkontrolle; M: λ-Pst Größenstandard; -: Negativkontrolle;

Durch die getrennte Amplifikation war es möglich an dem modifizierten Gemisch aus pBlueskriptII- und genomischer DNA, sowohl das Kontrollfragment, als auch die genomische DNA zu amplifizieren bzw. zu reamplifizieren (s. Abb. 4.34). Zum Teil konnte allerdings weder die modifizierte genomische DNA, noch das Kontrollfragment amplifiziert bzw. reamplifiziert werden (vgl. Spur 2 und 4 in Abb. 4.34). In weiteren Versuchen zeigte sich, dass die genomische DNA nur dann reamplifiziert werden konnte, wenn das Amplifikat des Kontrollfragments nach der ersten PCR im Agarosegel detektierbar war.

In Spur 2 (Abb. 4.34) wurde das Reamplifikationsprodukt der modifizierten DNA des Konstruktes PVY aufgetragen, was ein Fragment mit einer Größe von 903 bp hätte liefern sollen. In einer Vielzahl von Wiederholungen zeigte sich, dass es in keinem Fall möglich war, die modifizierte genomische DNA der Konstrukte PVY und PVY_{CG} (901 bp bzw. 930 bp) mit den Primern Ums/Umas oder Ms/Mas zu reamplifizieren.

4.8.2.4 Entwicklung neuer Primerpaare für die Reamplifikation der viral - abgeleiteten Sequenzen der Konstrukte PVY und PVY_{CG}

Die DNA liegt nach der Modifikation und Aufreinigung in instabiler Form vor (s. 3.2.12). Dies wurde als Grund dafür angenommen, dass sich die Fragmente von mehr als 900 bp Größe der Konstrukte PVY und PVY_{CG}, nach der Modifikation nicht mehr amplifizieren ließen. Deshalb wurden neue Primer entwickelt, mit denen es möglich war, die viral - abgeleitete Sequenz der Konstrukte PVY und PVY_{CG} in zwei ca. 460 bp langen Fragmenten zu amplifizieren.

Der Primer Mr (s. Tab 2.11) wurde so gewählt, dass zusammen mit den Primern Ms oder Ums, die ersten 459 bp des modifizierten Sinnstranges der viral - abgeleiteten Sequenz der Konstrukte PVY und PVY_{CG} reamplifiziert werden konnten. Der Primer Mf (s. Tab 2.11) wurde entwickelt, um mit den Primern Mas oder Umas die 3' gelegenen 468 bp des Sinnstranges des Konstruktes PVY, bzw. 489 bp des Konstruktes PVY_{CG}, zu reamplifizieren.

Unter 4.7.2 wurde gezeigt, dass eine Konversion von nicht methyliertem C zu U im Sinnstrang durch die Bisulfit - Modifikation keinen Einfluss auf die Anlagerung der Primer hat, unabhängig davon, ob das C des 3' - lokalisierten CpG Paares der Primer mit TpG bzw. CpA (im antisense Primer) ausgetauscht

wurde oder nicht. Darum wurden nur zwei Primer generiert, an deren 3' - Ende das C des CG Paares nicht ausgetauscht wurde, als wäre das C an dieser Stelle der transgenen DNA immer methyliert. Für alle asymmetrischen C der Sequenz wurde hingegen der Nukleotidaustausch von C nach T bzw. G nach A vorgenommen.

Damit die Primer in Bereichen liegen, in denen relativ viele asymmetrische C vorkommen, konnten die Lage der neuen Oligomere Mf und Mr nur so gewählt werden, dass sich ihre Sequenzen komplett überschneiden (s. Abb. 4.35).

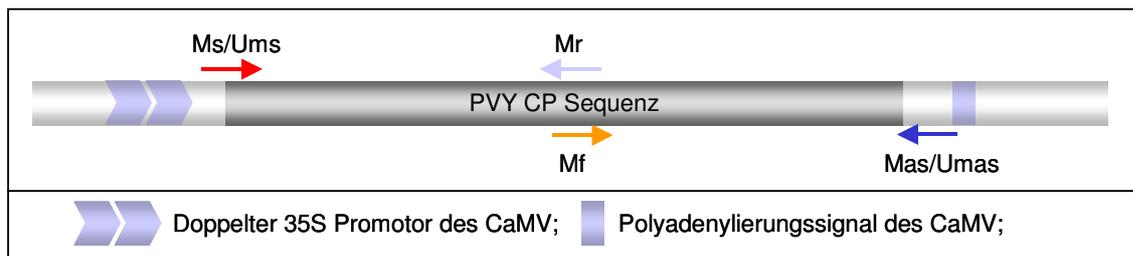


Abb. 4.35 Schematische Darstellung der Lage der Primer Mr und Mf

Dieser Umstand führte dazu, dass für zwei C der viralen Sequenz, die innerhalb dieses Bereiches liegen, keine Aussage über den Methylierungszustand getroffen werden kann, da durch die Amplifikation mit den Primern Mr und Mf immer C regeneriert werden (s. Tab. 4.21; C).

Tab. 4.21 Auflistung der Primer zur Amplifikation der modifizierten DNA der PVY Konstrukte in zwei Fragmenten

Bezeichnung	Sequenz
Mf	AGT C GAATATTTATTGAAATTAAT C GT
Mr	AC G ATTAATTTCAATAAATATT C GAC

Nachdem gezeigt wurde, dass es mit diesen Primern nicht möglich war, unbehandelte Plasmid DNA zu amplifizieren, wurde die unter 4.8.2.2 beschriebene Standard - PCR mit den Primern mod1 und mod2 durchgeführt. Nach der anschließenden Reamplifikation mit den Primerpaaren Ms/Mr (bzw. Ums/mr) oder Mas/Mf (bzw. Umas/Mf) konnten im Agarosegel die Fragmente mit einer Größe von 459 bp (5' Ende) bzw. 468 bp/489 bp (3' Ende) detektiert werden (s. Abb. 4.36), so dass nun die Möglichkeit bestand die C -Methylierung der viralen Fragmente der Konstrukte PVY und PVY_{CG} zu ermitteln.

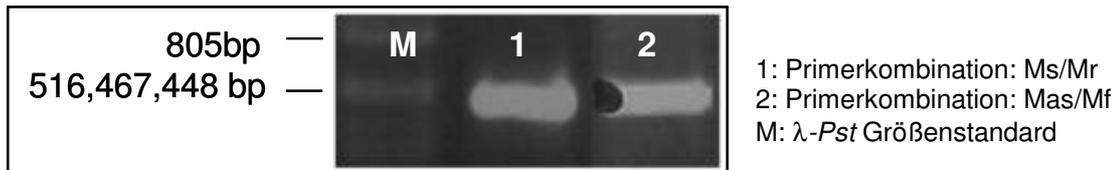


Abb. 4.36 Reamplifikation modifizierter transgener *N. benthamiana* - DNA des Konstruktes PVY mit den Primerkombinationen Ms/Mr und Mas/Mf

4.8.3 Modifikation der transgenen DNA der ausgewählten *N. benthamiana* - Testpflanzen

Zur Untersuchung, ob es eine Korrelation zwischen der PVY - Resistenz und der Methylierung der transgenen DNA Sequenz gibt, wurde der Methylierungszustand der viral - abgeleiteten Sequenzen der ausgewählten Pflanzen (s. Tab 4.19) vor und nach der Inokulation bestimmt.

Für den Tag 0 wurde dazu das Blattmaterial verwendet, dass vor der PVY - Inokulation gefriergetrocknet wurde. Für die Untersuchung des Blattmaterials nach der Inokulation ergaben sich zwei unterschiedliche Zeitpunkte, da das gefriergetrocknete Material der Pflanzen der Linien PVY.13, VY.04 und VY.07, dass 44 dpi gefriergetrocknet wurde, nach der Modifikation nicht reamplifiziert werden konnte. Von diesen sechs Pflanzen wurde darum, im Gegensatz zu den Pflanzen der Linien PVY_{CG}.09 und PV.14, bei denen gefriergetrocknetes Blattmaterial von Tag 44 dpi, der Methylierungszustand der DNA aus frischem Blattmaterial (107 dpi) analysiert .

Von den ausgewählten Pflanzen (s. Tab. 4.19) wurden die genomische DNA der einzelnen Pflanzen jeweils in einem Ansatz mit der pBlueskriptII DNA modifiziert (s. 4.8.2.3 und 4.8.2.4). Nach Amplifikation bzw. Reamplifikation der modifizierten DNA wurden sowohl die Kontrollfragmente, als auch die PCR - Produkte der viralen Sequenzen gereinigt (s. 3.2.12.2), kloniert (s. 3.2.12.3) und die rekombinanten Plasmide, nach Identifikation positiver Klone (s. 3.2.12.4), aufgereinigt und sequenziert (Fa. MWG Biotech).

4.8.4 Auswertung der Bisulfit Modifikation

Anhand der Sequenzierungen wurde die Anzahl der methylierten C innerhalb des jeweiligen Fragmentes bestimmt.

4.8.4.1 Bestimmung der unterschiedlichen Modifikations - Effizienzen mit Hilfe des Kontrollplasmides

Es war nicht möglich alle Kontrollfragmente der pBlueskriptII - DNA zu klonieren und zu sequenzieren. Da aber für alle Proben eines Versuchsansatzes die gleiche Denaturierungs - und Bisulfitlösung verwendet wurde, wurde davon ausgegangen, dass die Modifikation in allen Ansätzen mit der gleichen Effizienz stattgefunden hat, so dass repräsentativ pro durchgeführter Modifikation, jeweils ein Fragment aus einem Ansatz sequenziert wurde, um die Modifikations - Effizienz zu bestimmen.

Insgesamt wurde an 15 unterschiedlichen Zeitpunkten eine erfolgreiche Modifikation durchgeführt und dementsprechend fünfzehnmal die Modifikationseffizienz mit Hilfe des Kontrollfragmentes ermittelt (s. 3.2.12).

Bei der Auswertung dieser 15 Kontrollfragmente (ausführliches Alignment s. Abb. 8.7) wurde festgestellt, dass zehnmal alle 83 vorkommenden C modifiziert wurden. In den übrigen Kontrollfragmenten wurden dreimal je 1 C, einmal 2 C, und einmal 13 C nicht modifiziert. Die daraus resultierenden Effizienzen sind in Tab. 4.22 zusammengefasst.

Tab. 4.22 Auflistung der nicht modifizierten C in den Kontrollfragmenten und den daraus resultierenden Effizienzen

Nicht modifizierte C	Anzahl der Kontrollfragmente	Effizienz in %
0	10	100,0
1	3	98,8
2	1	97,6
13	1	84,3

4.8.4.2 Bestimmung des Methylierungsgrades der viral - abgeleiteten Sequenzen der transgenen *N. benthamiana* - Pflanzen

In Tab. 4.23 ist aufgelistet, wie viele Nukleotide insgesamt und wie viele C in den viral - abgeleiteten Sequenzen der einzelnen Konstrukte vorkommen. Für diese C ist des Weiteren angegeben, ob sie in einem symmetrischen (sC) oder asymmetrischen (aC) Kontext stehen.

Tab. 4.23 Angabe der Anzahl der C in den viral - abgeleiteten Sequenzen der einzelnen Konstrukte

Konstrukt	Länge der viral - abgeleiteten Sequenz in bp	Gesamtzahl C	Anzahl sC	Anzahl aC
PVY	842	167*	49*	118
PVY _{CG}	842	167* + (CG) ₁₀	49* + (CG) ₁₀	118
PV	614	112	32	80
VY	592	119	39	80

Die Auswertung der ^mC der viral - abgeleiteten DNA - Fragmente wurde für alle Pflanzen vor und nach der Inokulation anhand der Sequenzierungen bestimmt (Alignments s. Abb. 8.8 - Abb. 8.17) und ist detailliert in Tab. 4.24 angegeben. Neben der Gesamtsumme der ^mC des jeweiligen Konstruktes, ist in dieser Tabelle angegeben, wie viele der ^mC in einem symmetrischen bzw. asymmetrischen Kontext stehen. In Tab. 4.24 ist des Weiteren angegeben, mit welcher Effizienz das Kontrollfragment des *amp^r* Gens des pBluesriptII des jeweiligen Modifikationsdurchganges im Parallelansatz modifiziert worden war.

Tab. 4.24 Auflistung der Gesamtanzahl der methylierten C der viral - abgeleiteten Sequenzen der untersuchten Pflanzen

	Pflanze	Anzahl ^m C vor der Inokulation			Modifikations Effizienz [%]	Anzahl ^m C nach der Inokulation			Modifikations Effizienz [%]
		ΣC	ΣsC	ΣaC		ΣC	ΣsC	ΣaC	
resistente Pfl.	PVY.13.10	48	21	27	100	23	15	8	100
	PVY _{CG} .09.06	7	7	0	98,8	23	19	4	98,8
	PV.14.13	23	15	8	84,3	85	29	56	97,6
	VY.04.04.	17	14	3	84,3	32	18	14	100
	VY.07.06	4	4	0	100	17	17	0	100
anfällige Pfl.	PVY.13.15	11	11	0	98,8	0	0	0	100,0
	PVY _{CG} .09.15	26	16	10	97,6	25	16	9	97,6
	PV.14.14	78	25	53	100,0	77	26	51	98,8
	VY.04.10	18	15	3	100,0	16	15	1	84,3
	VY.07.10	15	14	1	100,0	42	27	15	100

ΣC: Anzahl aller methylierten C; ΣsC: Anzahl der methylierten C in symmetrischem Kontext; ΣaC: Anzahl der methylierten C in asymmetrischem Kontext; Pfl: Pflanze

Bei der Auswertungen der Sequenzierungen der modifizierten DNA der Pflanzen, die mit dem Konstrukt PVY_{CG} transformiert worden waren, wurde festgestellt, dass die (CG)₁₀ innerhalb der Nukleotidsequenz nicht auftauchten. Indem nicht modifizierte DNA derselben Pflanzen mit den Primern mod1 und mod2 amplifiziert, kloniert und sequenziert wurde, konnte allerdings gezeigt werden, dass die (CG)₁₀ sehr wohl in das Genom der Pflanzen integriert worden waren (Alignment s. Abb. 8.18).

4.8.4.3 Graphische Auswertung

Zum graphischen Vergleich der ermittelten Daten, wurde die Anzahl der ^mC in das Verhältnis zur Gesamtzahl der in der jeweiligen Sequenz vorkommenden C gesetzt. Auf die gleiche Weise wurde die prozentuale Methylierung der sC und aC berechnet (s. Tab. 8.11).

Für die Konstrukte PVY und PVY_{CG} wurde die Gesamtsumme aller vorkommenden C dabei auf 165 und die Summe aller symmetrischen C auf 47 reduziert, da durch die Reamplifikation mit den Primern Mf und Mr, zwei C im CpG Kontext erhalten bleiben, ohne dass eine Aussage über ihren Methylierungsstatus abgeleitet werden kann (s. 4.8.2.4). Um des Weiteren dem Umstand gerecht zu werden, dass die (CG)₁₀ des Konstruktes PVY_{CG} nach der Modifikation entweder nicht amplifiziert oder sequenziert und der Methylierungszustand der C in den (CG)₁₀ folglich nicht bestimmt werden konnten, wurden diese bei der Berechnung der prozentualen Werte nicht berücksichtigt.

Zur Analyse, ob sich der Grad der DNA - Methylierung durch die Virusinokulation verändert, wurden die berechnete prozentuale C - Methylierung (s. Tab. 8.11) der untersuchten Pflanzen vor und nach der Inokulation in Abb. 4.37 gegenübergestellt.

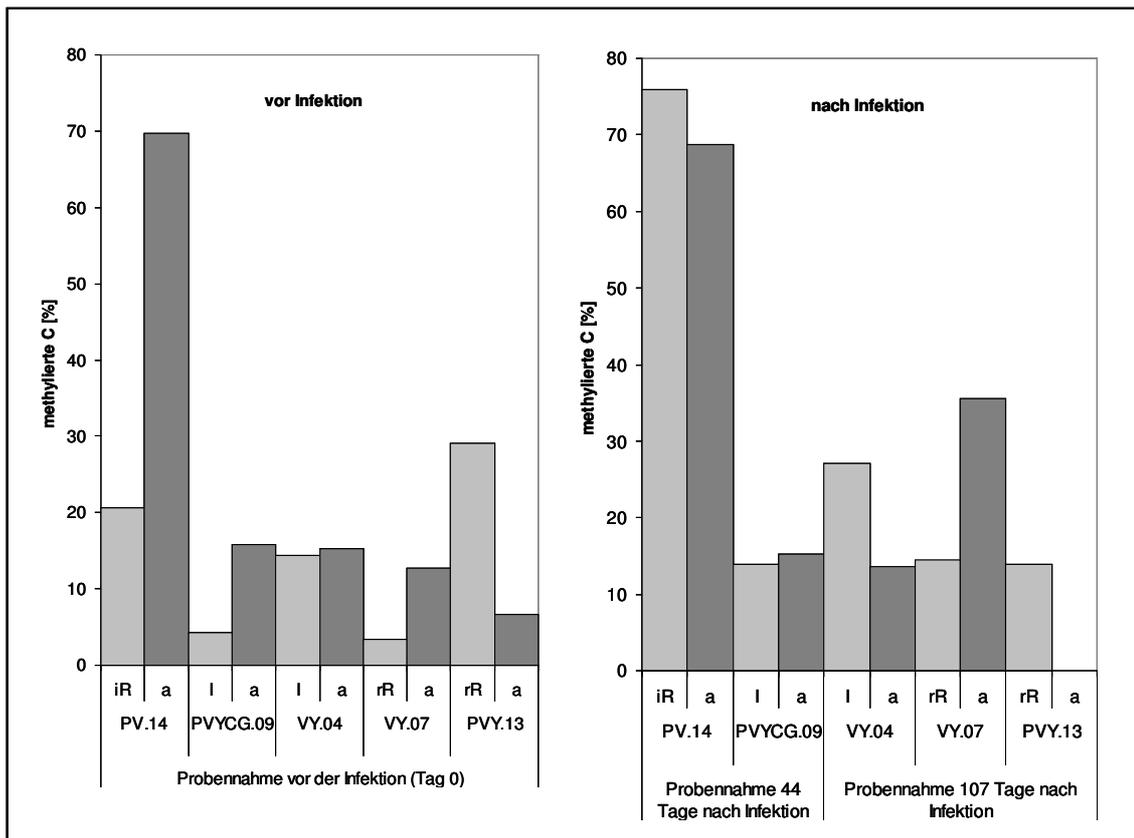


Abb. 4.37 Grafische Darstellung der prozentual methylierten C in den viral - abgeleiteten Sequenzen der untersuchten Pflanzen vor und nach der PVY - Inokulation

iR: instabile Resistenz; I: Immunität; rR: *recovery* Resistenz; a: anfällig
hellgrau: resistent reagierende Pflanzen; dunkelgrau: anfällig reagierende Pflanzen

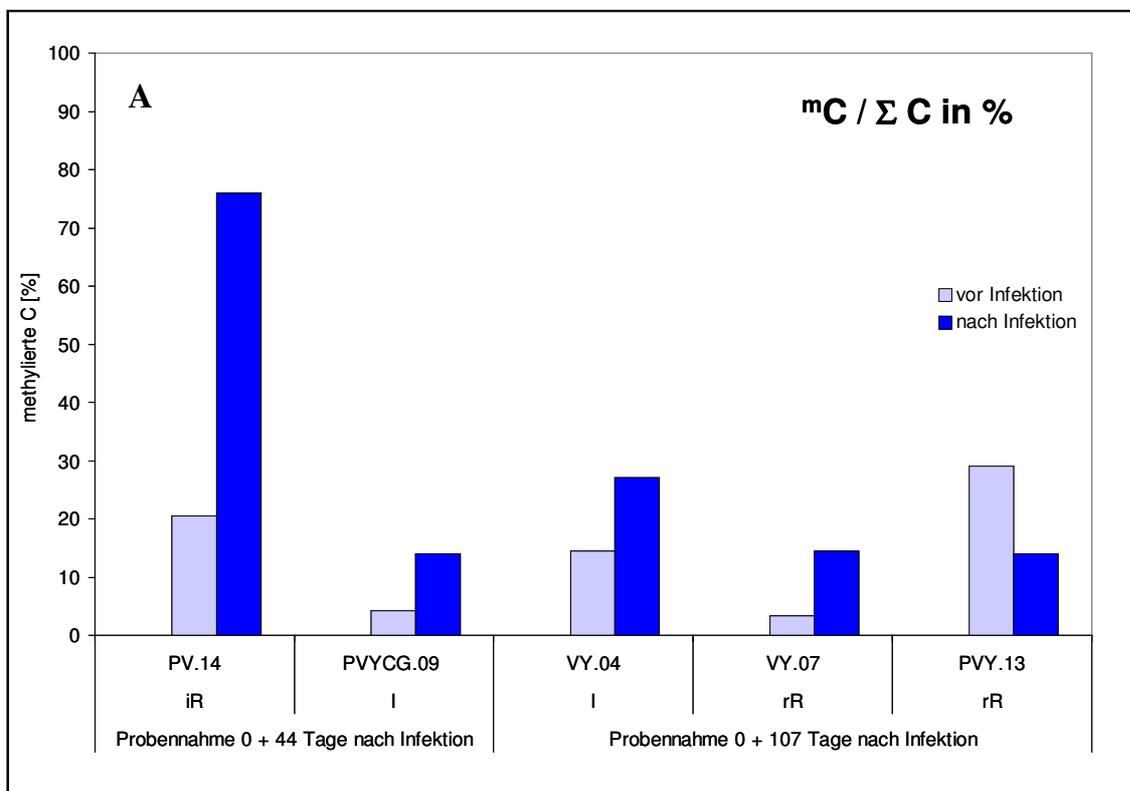
Im linken Diagramm der Abb. 4.37, in der der Methylierungsgrad der Pflanzen vor der Inokulation dargestellt ist, ist zu erkennen, dass der prozentuale Anteil der ^mC in den analysierten Pflanzen stark variiert. Beim direkten Vergleich der beiden unterschiedlich reagierenden Pflanzen einer Linie, fällt auf, dass mit Ausnahme der Pflanzen des Konstruktes PVY.13, immer mehr C in den anfällig reagierenden Pflanzen in methylierter Form vorlagen, als in den resistent reagierenden.

Der Methylierungsgrad der transgenen DNA der einzelnen Pflanzen nach der Inokulation ist im rechten Diagramm der Abb. 4.37 dargestellt. Auch nach der Ausprägung der Symptome, respektive der Resistenz, ist die ^mC in den resistent reagierenden Pflanzen der Linien PVY_{CG}.09 und VY.07 geringer, als in den anfälligen Pflanzen der gleichen Linie. Die Methylierung der DNA der Pflanzen der Linien PV.14 und VY.04 hingegen ist nach der Inokulation in den resistent reagierenden höher, als in den anfällig reagierenden Pflanzen. Für die

Pflanzen der Linie PVY.13 ist auch nach der Inokulation die C - Methylierung in der anfälligen Pflanze geringer, als in der resistent reagierenden.

4.8.4.3.1 Vergleich der ^mC der viral - abgeleiteten Sequenzen der resistent reagierenden *N. benthamiana* - Pflanzen vor und nach der Inokulation

Um beurteilen zu können, ob sich der Methylierungsgrad der C der viral abgeleiteten Sequenzen nach der Ausprägung der Resistenz in den Pflanzen der einzelnen Linien verändert, sind in den Abbildungen 4.38 A, B und C die prozentualen ^mC - Werte der resistent reagierenden Pflanzen im direkten Vergleich vor und nach der Inokulation gegenübergestellt.



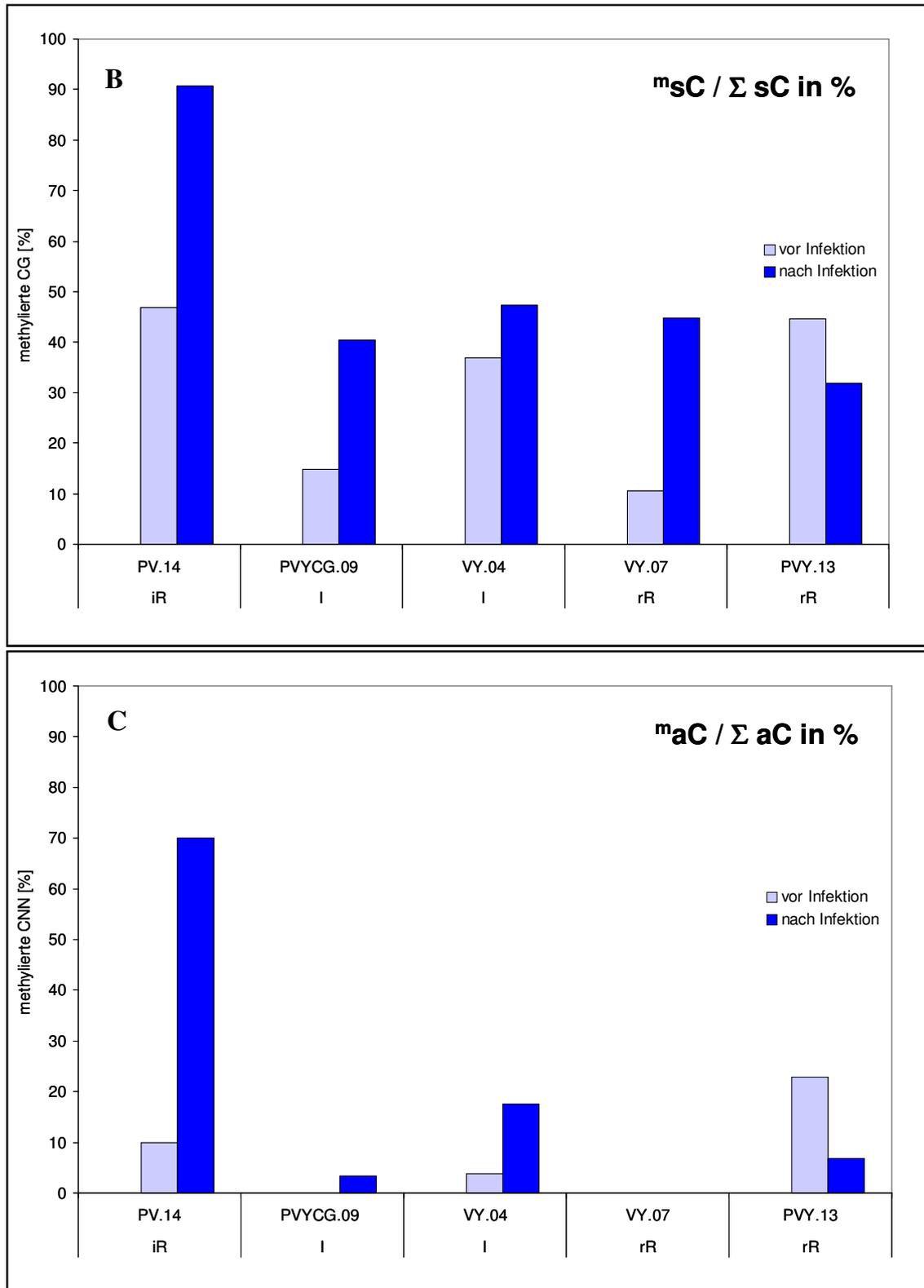


Abb. 4.38 Grafische Darstellung der prozentualen Anteile der m^C in den viral - abgeleiteten Sequenzen der resistenten Pflanzen
iR: instabile Resistenz; I: Immunität; rR: *recovery* Resistenz; a: Anfälligkeit

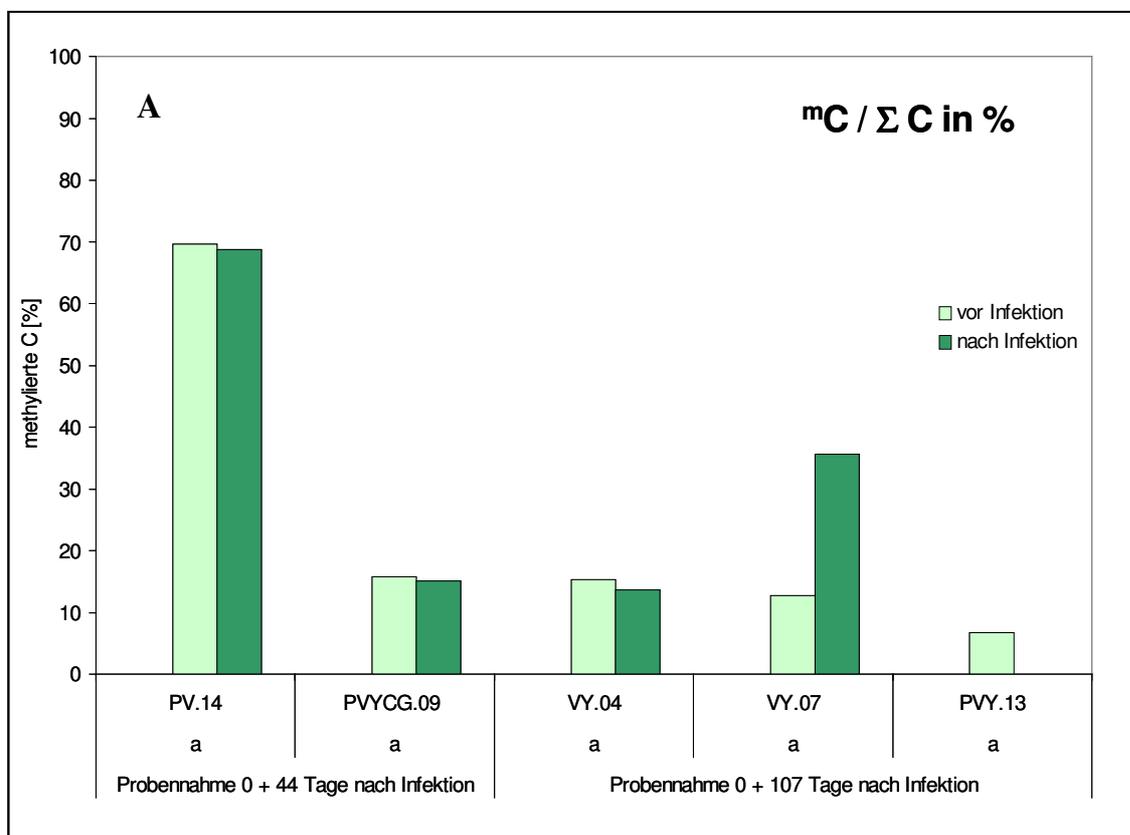
Durch diese Form der Darstellung ist gut zu erkennen, dass in den vier resistent reagierenden Pflanzen unterschiedlicher Konstrukte die m^C nach der Inokulation

zunahm. In allen Fällen nahm dabei sowohl die Methylierung der sC, als auch der aC zu (s. Abb. 4.38 B und C). Eine Ausnahme bildete die *recovery* resistent reagierende Pflanze VY.07.06, bei der nach der Ausbildung der PVY - Resistenz keine Zunahme der Methylierung asymmetrischer C beobachtet werden konnte. Bei der anderen *recovery* resistent reagierenden Pflanze PVY.13.10 wurde als einzige eine Abnahme der Methylierung nach der Ausprägung der PVY - Resistenz festgestellt.

Betrachtet man die Mittelwerte der prozentualen C - Methylierung vor und nach der Inokulation wird in den resistent reagierenden Pflanzen eine Zunahme von 14,3 % auf 29,0 % festgestellt.

4.8.4.3.2 Vergleich der Methylierung der viral - abgeleiteten Fragmente anfällig reagierender transgener *N. benthamiana* - Pflanzen vor und nach der Inokulation

Analog zu 4.8.4.3.1 wird in den folgenden Abbildungen (s. Abb. 4.39 A, B und C) das Ergebnis der Methylierungsanalyse für die C der viral - abgeleiteten Sequenz der anfällig reagierenden Pflanzen vor und nach der Inokulation gegenübergestellt.



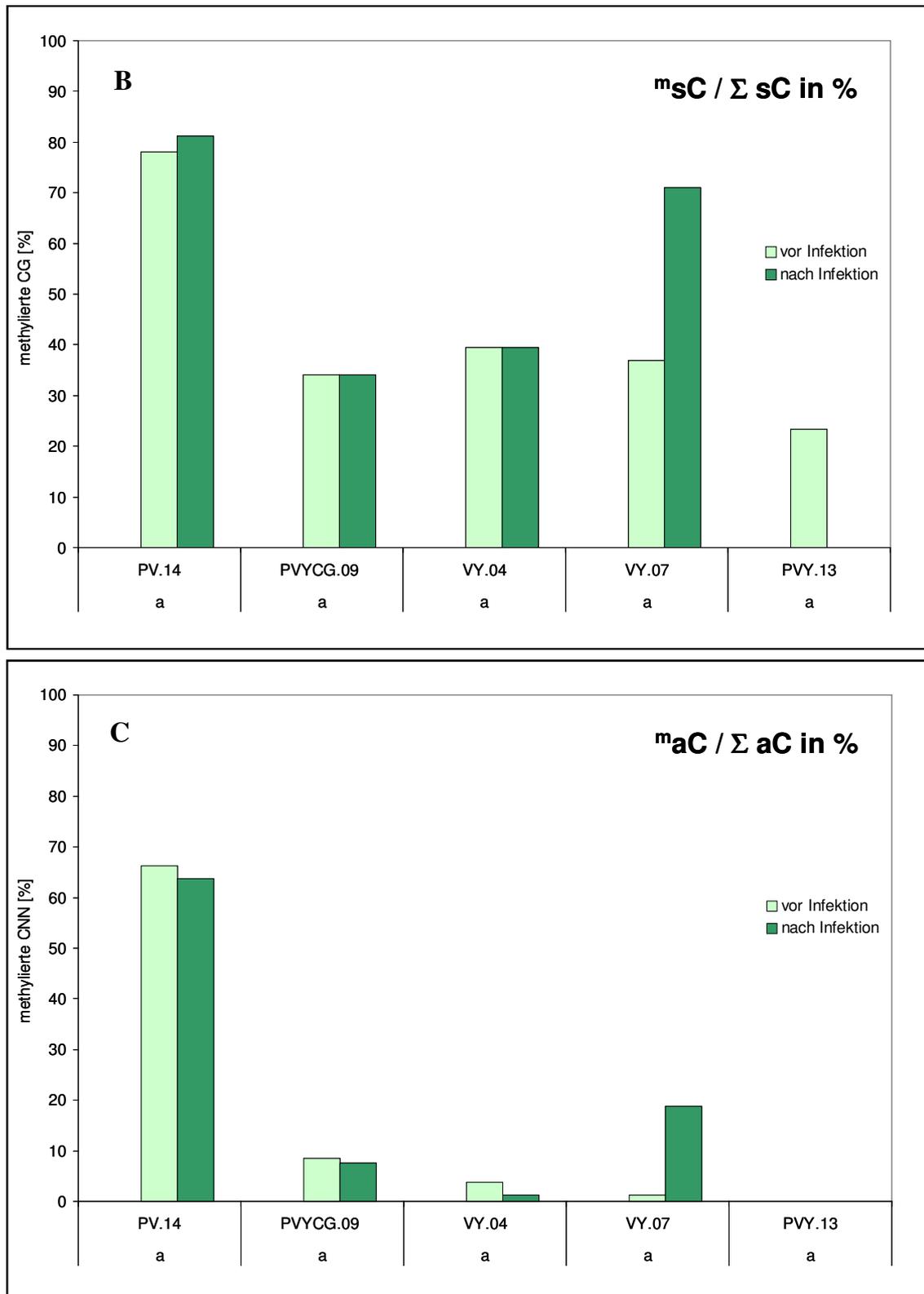


Abb. 4.39 Grafische Darstellung der prozentualen Anteile der m^C in den viral-abgeleiteten Sequenzen der anfälligen Pflanzen
iR: instabile Resistenz; I: Immunität; rR: *recovery* Resistenz; a: anfällig

Im Fall der PVY anfälligen Pflanzen der Linien PVY_{CG}.09, PV.14 und VY.04, blieb die C - Methylierung vor und nach der Inokulation nahezu konstant, wobei sich auch die prozentualen Anteile der sC- und aC- Methylierung kaum veränderten.

Bei der Pflanze der Linie VY.07 wurde in allen Kontexten eine Zunahme der C - Methylierung beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden in der anfälligen Pflanze der Linie PVY.13 die anfänglich ausschließlich in symmetrischem Kontext vorliegenden C nach Ausprägung der Symptome demethyliert.

Durch die konträre Reaktion der Pflanzen der Linien VY.07 und PVY.13 kann erklärt werden, dass die Mittelwerte der prozentualen C - Methylierung mit Werten von 24,8 % und 24,5% vor und nach der Inokulation nahezu konstant sind.

4.8.4.3.3 Korrektur der Anzahl der methylierten C unter Einbeziehung der ermittelten Modifikations - Effizienzen

Zur Berücksichtigung der unterschiedlichen Modifikationseffizienzen, wurde die in Tab. 4.24 absolute Anzahl der ^mC der viral - abgeleiteten Sequenzen, wie folgt korrigiert:

Die Effizienz, mit der das Kontrollfragment modifiziert wurde, ist abhängig davon, wie viele C der 83 in der Sequenz vorkommenden nicht durch Bisulfit konvertiert wurden (s. Tab. 4.22). Mit der folgenden Formel wurde X berechnet, das angibt, wie viele C der wesentlich längeren viral - abgeleiteten Sequenzen nicht modifiziert wurden, obwohl sie nicht methyliert waren.

$$X = \frac{C_v * C_{K;n.mod.}}{C_K}$$

C_v gibt dabei die Anzahl C der viral - abgeleiteten Sequenz, C_K die Anzahl C des Kontrollfragmentes und C_{K;n.mod} die Anzahl der nicht modifizierten C des Kontrollfragmentes an.

Berechnet man des Weiteren die Häufigkeit der C in den einzelnen Fragmenten, so stellt man fest, dass in den viral - abgeleiteten Sequenzen weniger C vorkommen, als in dem Kontrollfragment (s. Tab. 4.25), wodurch potenziell weniger C modifiziert werden können.

Tab. 4.25 Auflistung der Häufigkeiten der C in den untersuchten Fragmenten

Konstrukt	Länge des Fragmentes	Anzahl der C	Häufigkeit der C
Ampicillinresistenzgen	319	83	3,84
PVY	842	167	5,04
PV	614	112	5,48
VY	592	118	5,02

Um diesem Umstand gerecht zu werden, wurde X mit Hilfe eines Korrekturfaktors (KF), der wie folgt berechnet wurde, korrigiert:

$$KF = \frac{\text{Häufigkeit } C_K}{\text{Häufigkeit } C_V}$$

Die Anzahl der fälschlicherweise nicht modifizierten, aber in nicht methyliertem Zustand vorliegenden C der viral - abgeleiteten Sequenzen (X_{kor}), ergeben sich somit aus folgendem Zusammenhang:

$$X_{\text{kor}} = \frac{C_V * C_{K;n.mod.}}{C_K} * KF$$

Mit Hilfe dieser Gleichung wurde X_{kor} für alle Fragmente berechnet, bei denen die Modifikation des Kontrollfragmentes nicht mit 100% stattgefunden hatte. Anschließend wurde die Anzahl der ursprünglich ermittelten ${}^m\text{C}$ um diesen Wert korrigiert und die resultierende absolute Anzahl der ${}^m\text{C}$ in Prozent umgerechnet. Das Ergebnis dieser Berechnung ist dem ursprünglich ermittelten Wert (vgl. Tab. 8.11) in Tab. 4.26 gegenübergestellt.

Tab. 4.26 Angabe der korrigierten Daten der C - Methylierung

	Pflanze	% ${}^m\text{C}$	Σ ${}^m\text{C}$ korrigiert	% ${}^m\text{C}$ korrigiert
vor Inokulation	PVY _{CG} 09.06	4,2	5	3,3
	PVY _{CG} .09.15	15,8	23	13,9
	PV.14.13	20,5	11	9,6
	VY.04.04	14,4	3	2,4
	PVY.13.15	6,7	9	5,8

	Pflanze	% ^m C	Σ ^m C korrigiert	% ^m C korrigiert
nach Inokulation	PVY.13.15	0,0	0	0
	PVY _{CG} .09.15	15,2	22	13,3
	PVY _{CG} .09.06	13,9	21	13,0
	PV.14.13	75,9	83	74,2
	PV.14.14	68,8	76	67,9
	VY.04.10	13,6	18	1,6

Da es nicht möglich war den Kontext, in dem die falsch methyliert erscheinenden C standen aus diesen Berechnungen abzuleiten, wurde diese Werte nicht korrigiert.

Der Vergleich der korrigierten prozentualen C - Methylierung der einzelnen Pflanzen vor und nach der Inokulation, sowie die getrennte Betrachtung der Methylierung in den resistent bzw. anfällig reagierenden Pflanzen ist in Abb. 4.40 dargestellt.

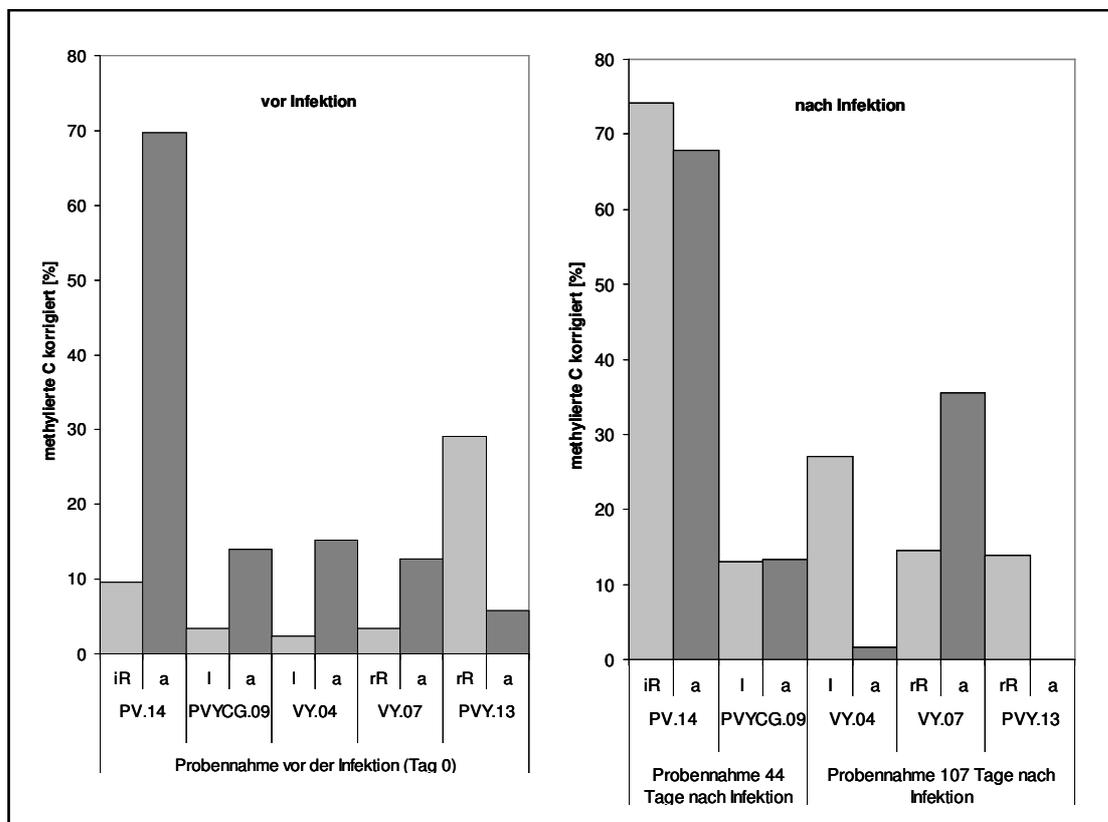


Abb. 4.40 Grafische Darstellung der korrigierten prozentualen Anteile der ^mC in den viral - abgeleiteten Sequenzen der Pflanzen vor und nach der Inokulation

iR: instabile Resistenz; l: Immunität; rR: *recovery* Resistenz; a: anfällig

Die Darstellung der korrigierten Werte unterstreicht den unter 4.7.4.3 gewonnenen Eindruck, dass die C - Methylierung der viral abgeleiteten Sequenzen in den anfälligen Pflanzen, mit Ausnahme der Pflanze der Linie PVY.13, vor der Inokulation höher ist, als in den resistent reagierenden.

Auch bei Betrachtung der C - Methylierung der einzelnen Pflanzen nach der Inokulation wird das vorher gewonnene Bild bestätigt und im Fall der Pflanzen der Linie VY.04 noch verstärkt.

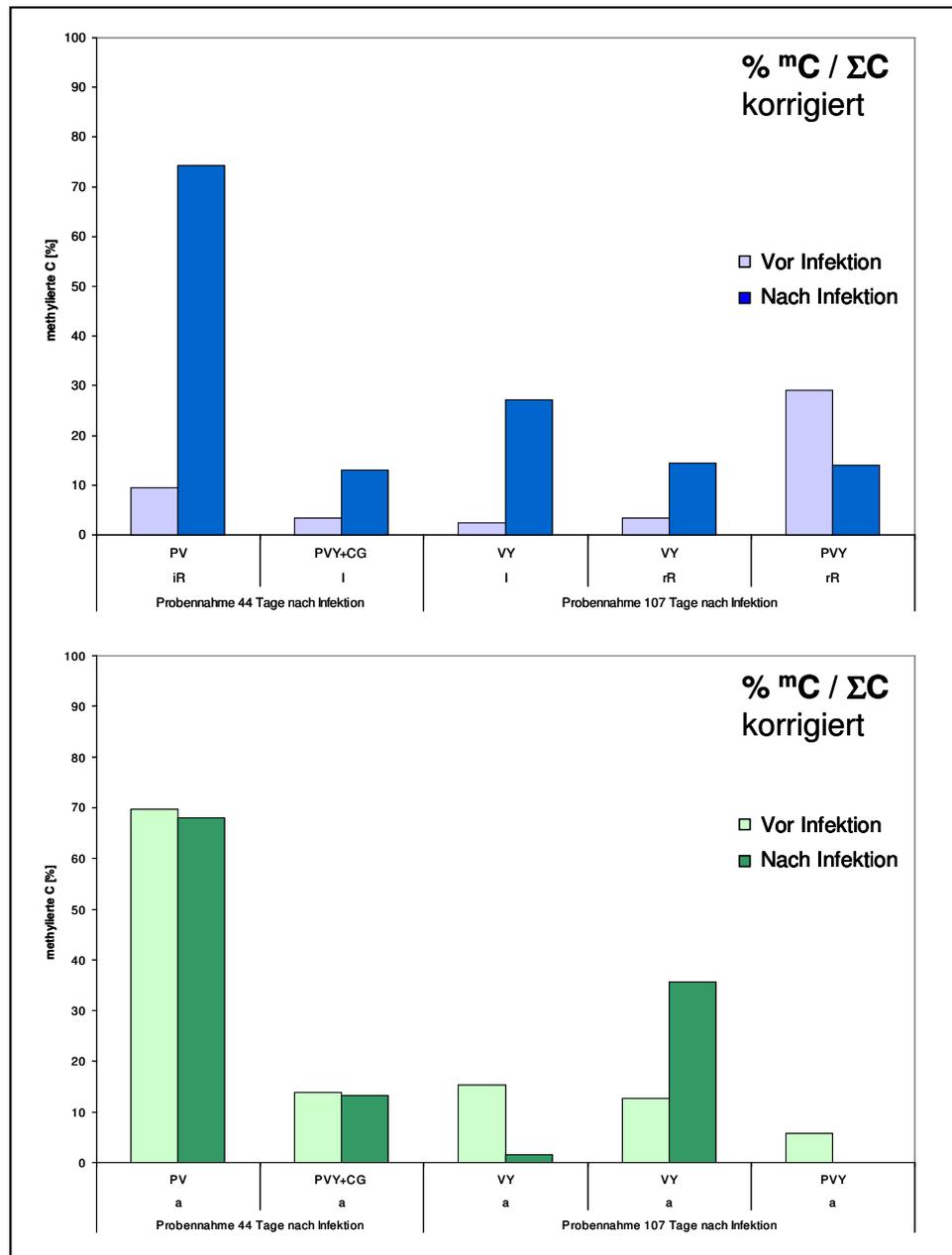


Abb. 4.41 Grafische Darstellung der korrigierten prozentualen Anteile der ^mC in den viral - abgeleiteten Sequenzen der resistenten und anfälligen Pflanzen

iR: instabile Resistenz; I: Immunität; rR: *recovery* Resistenz; a: anfällig

Im direkten Vergleich der resistent - (s. Abb. 4.41; oberes Diagramm) bzw. der anfällig reagierenden Pflanzen (s. Abb. 4.41; unteres Diagramm) derselben Linie vor und nach der Inokulation, wird durch die Korrektur der prozentualen mC Werte ebenfalls der unter 4.7.4.3 gewonnene Eindruck bestätigt. Während im Mittel die Methylierung in den resistent reagierenden Pflanzen von 9,6 % auf 28,5 % ansteigt, bleibt sie in den anfällig reagierenden Pflanzen mit 24,4 % vor und 22,1 % nach der Ausprägung der Symptome nahezu konstant.

Im Einzelnen nimmt die C - Methylierung in den resistenten Pflanzen der Linie PV.14, PVY_{CG}.09 und VY.04 nach der Inokulation stark zu, während sie in den anfälligen Pflanzen der gleichen Linien abnimmt. Innerhalb der *recovery* resistent reagierenden Linie VY.07 wurden in beiden Pflanzen nach der Inokulation mehr mC detektiert, während in der ebenfalls *recovery* resistent reagierenden Linie PVY.13 die C - Methylierung nach der Inokulation in beiden Pflanzen abnahm.

4.8.4.4 Analyse der Verteilung der mC innerhalb der viral - abgeleitenden Sequenzen

Zur Untersuchung, der Korrelation zwischen der Methylierung der C der viral - abgeleiteten Sequenz und der Resistenz, wurde neben der Anzahl auch die Verteilung der mC analysiert.

In Abb. 4.42 ist maßstabsgetreu die PVY - Sequenz des Konstruktes PVY (PVY) dargestellt. Insgesamt sind alle 167 C, die in der Sequenz auftreten, mit je einem Balken dargestellt.

Alle sC werden durch längeren Balken dargestellt, während die kurzen Balken die aC repräsentieren. Die leeren Felder stehen für die Nukleotide G, T und A.

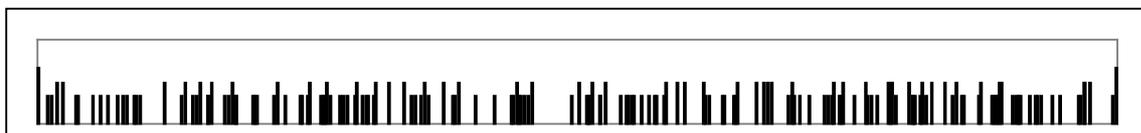


Abb. 4.42 Darstellung aller in der Sequenz vorkommenden Cytosin - Reste (Konstrukt PVY)

In den Abb. 4.43 bis Abb. 4.47 sind die Verteilungen der mC der viral - abgeleitenden Sequenzen der einzelnen untersuchten Pflanzen in derselben Form dargestellt. Die magentafarbenen Balken repräsentieren in diesen Grafiken jeweils den Anfang und das Ende der PVY abgeleiteten Sequenz im jeweiligen Konstrukt.

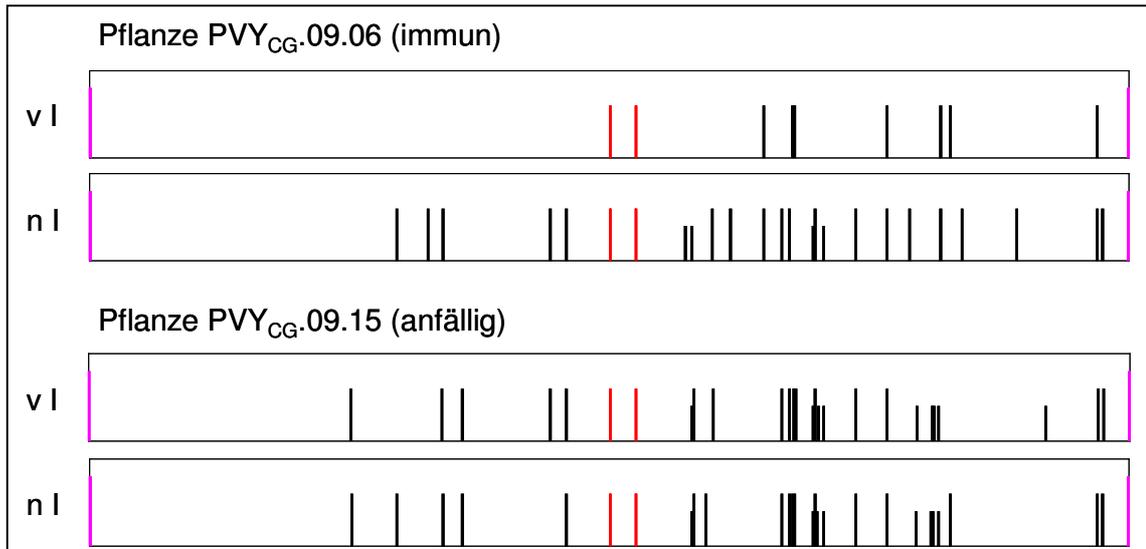


Abb. 4.43 Grafische Darstellung der Verteilung der ^mC innerhalb der viral-abgeleiteten Sequenz des Konstruktes PVY_{CG}
 v l: vor Inokulation; n l: nach Inokulation
 rote Balken repräsentieren die, durch die Primer methyliert erscheinenden C;
 Darstellung ohne die angefügten synthetischen (CG)₁₀, da diese nach der Modifikation nicht mehr detektierbar waren;

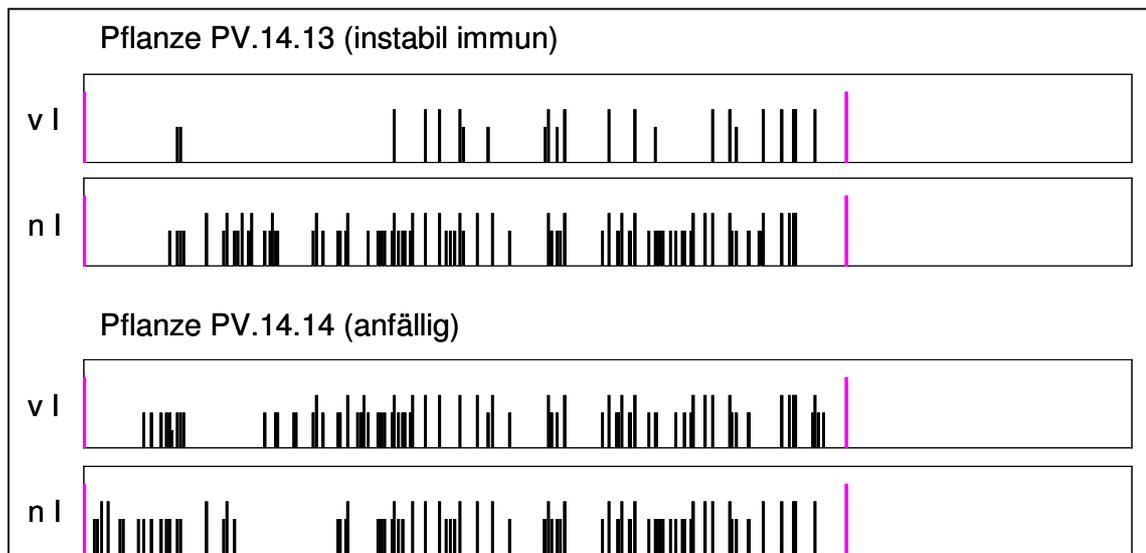


Abb. 4.44 Grafische Darstellung der Verteilung der ^mC innerhalb der viral-abgeleiteten Sequenz des Konstruktes PV
 v l: vor Inokulation; n l: nach Inokulation

Bei den dargestellten Verteilungen der ^mC in den Abbildungen Abb. 4.43 und Abb. 4.44 konnte bei den resistent reagierenden Pflanzen nach der Inokulation eine Ausbreitung der Methylierung vom 3' - in Richtung 5' - Ende beobachtet werden, während die Verteilung der ^mC in der anfälligen Pflanze nahezu konstant blieb.

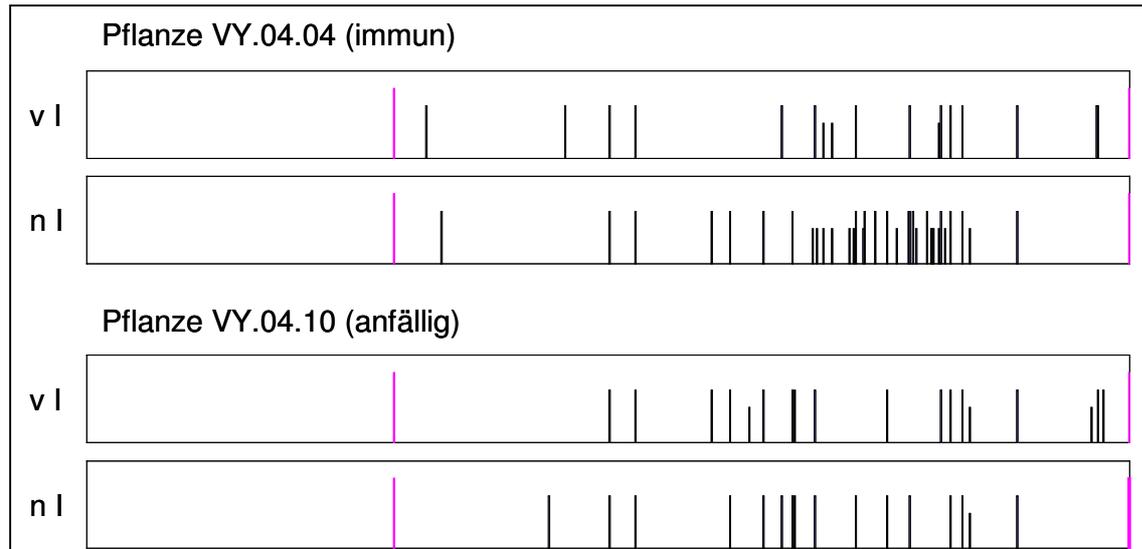


Abb. 4.45 Grafische Darstellung der Verteilung der ^mC innerhalb der viral-abgeleiteten Sequenz der Linie VY.04
v l: vor Inokulation; n l: nach Inokulation

Die ^mC der immun reagierenden Pflanze VY.04.04 (s. Abb. 4.45) ist nach der Ausprägung der Resistenz auf die 3' - gelegenen Hälfte der viral - abgeleiteten Sequenz konzentriert, während sich die Position der ^mC in der anfälligen Pflanze zum gleichen Zeitpunkt leicht in Richtung 5' - Ende verschiebt.

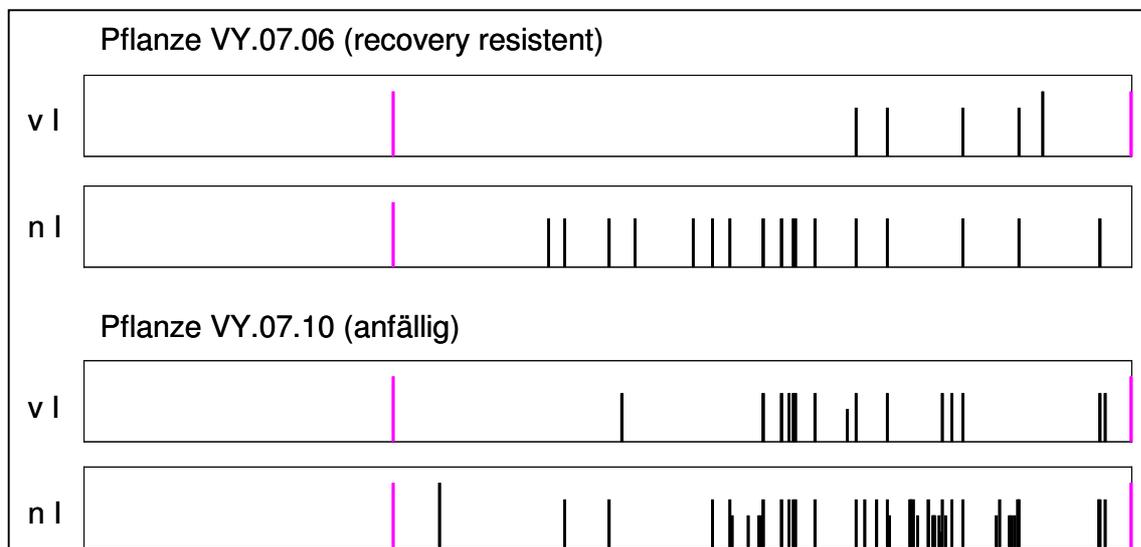


Abb. 4.46 Grafische Darstellung der Verteilung der ^mC innerhalb der viral-abgeleiteten Sequenz der Linie VY.07
v l: vor Inokulation; n l: nach Inokulation

Die Methylierung breitet sich in beiden Pflanzen der Linie VY.07 nach der Inokulation in 5' - Richtung aus. In der anfälligen Pflanze nahm allerdings auch im 3' - Bereich die C - Methylierung stark zu (s. Abb. 4.46)

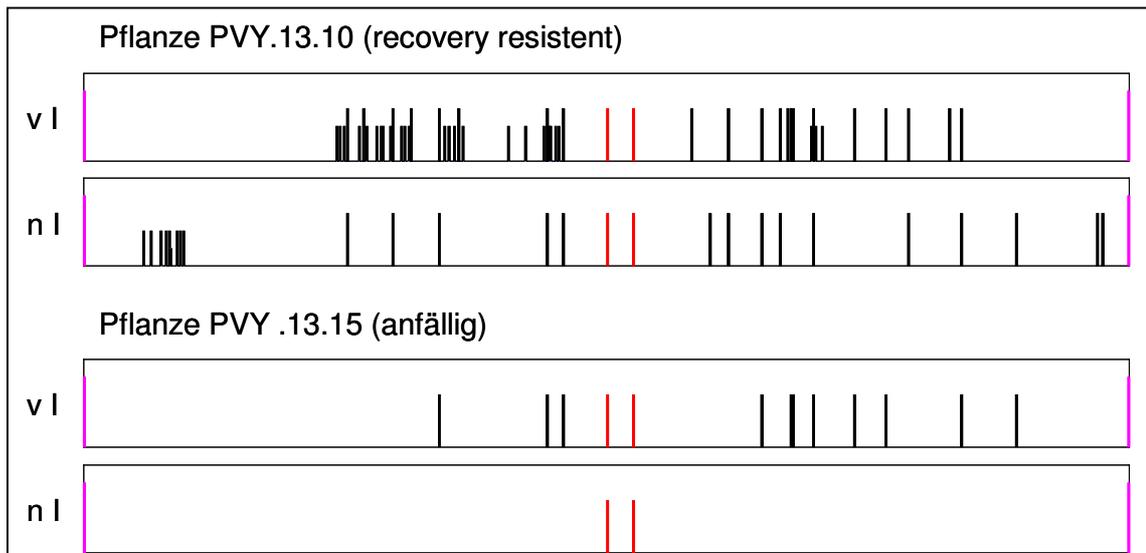


Abb. 4.47 Grafische Darstellung der Verteilung der ^mC innerhalb der viral - abgeleiteten Sequenz des Konstruktes PVY

v l: vor Inokulation; n l: nach Inokulation;

rote Balken repräsentieren die durch die Primer methyliert erscheinenden C;

Bei der *recovery* resistent reagierenden Pflanze der Linie PVY.13 waren die ^mC nach der Inokulation über die gesamte viral - abgeleitete Sequenz verteilt, während bei der anfälligen Pflanze keine methylierten C mehr detektiert werden konnten (s. Abb. 4.47).

4.8.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Ermittlung einer Korrelation zwischen der DNA Methylierung und einer PVY - Resistenz

In den Pflanzen der Linien PVY_{CG}.09, PV.14 und VY.04, die mit Immunität und einer instabilen Resistenz auf die Inokulation mit PVY reagierten, konnte eine Korrelation der DNA Methylierung mit der Resistenz nachgewiesen werden.

Die bei Testbeginn höhere DNA Methylierung in den anfälligen Pflanzen nahm nach der PVY - Inokulation und der Ausprägung der Symptome ab, während sie in den resistent reagierenden Pflanzen nach Etablierung der Resistenz stark zunahm (vgl. Abb. 4.40). Die Methylierung breitete sich dabei in den resistent reagierenden Pflanzen der Linien PV.14 und PVY_{CG}.09 vom 3' - zum 5' - Ende aus, in der Pflanze der Linie VY.04 konzentrierte sie sich in der C - terminalen Hälfte. Allerdings wurde der Methylierungsgrad der DNA der Pflanze VY.04.04 erst 63 Tage später untersucht, als in den zuerst genannten Pflanzen.

In den anfälligen Pflanzen dieser drei Linien blieb das C - Methylierungsmuster nach der Infektion hingegen nahezu unverändert erhalten.

Für die Pflanzen der Linien VY.07 und PVY.13, die mit einer *recovery* Resistenz auf die PVY - Inokulation reagierten, konnte keine Korrelation zwischen der Methylierung und der PVY - Resistenz nachgewiesen werden. Während in beiden Pflanzen der Linie VY.07 die Methylierung nach der Inokulation zunahm und sich in 5' - Richtung ausbreitete, nahm die Methylierung in den beiden Pflanzen der Linie PVY.13 ab.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen der DNA Methylierung viral abgeleiteter Sequenzen und der RNA vermittelten Resistenz in transgenen *N. benthamiana* Pflanzen besteht. Zur Etablierung der Virusresistenz in den Pflanzen, wurden verschiedene Ansätze gewählt, um weitergehende Kenntnisse zur gentechnischen Erzeugung einer RNA vermittelten Resistenz gegen Kartoffelviren zu erarbeiten.

Verschiedene Autoren haben für PVY gezeigt (s. Tab. 1.2), dass unter Verwendung der gesamten CP kodierenden Sequenz eine RNA vermittelte Resistenz, sowohl in Tabak-, als auch Kartoffelpflanzen etabliert werden kann. Bei der RNA vermittelten Resistenz, deren Grundlage das PTGS bildet (s. Einleitung), liegen in der Regel im Zytoplasma der transgenen Pflanzen keine vom Transgen exprimierte viralen Proteine vor. Unter dem Aspekt der Biologischen Sicherheit führt ein Fehlen von nicht exprimierten viralen CP zur Unterdrückung einer heterologen Enkapsidierung und kann ev. auch das Auftreten synergistischer Effekte minimieren. Durch Verwendung von kurzen viralen Sequenzen zur Resistenzherstellung, wird die Wahrscheinlichkeit von Rekombinationsereignissen reduziert. Zudem liegen beim PTGS nur sehr wenig RNA Transkripte im Zytoplasma vor (TEPFER, 2002; MISSIOU *et al.*, 2004). Dass nicht die gesamte kodierende Sequenz eines Transgens zur Erzeugung einer RNA vermittelten Resistenz vorliegen muss, zeigten PANG *et al.* (1997), die unter Verwendung der Hälfte der kodierenden Sequenz des N-Gens (387 bp) eine TSWV Resistenz in Tabak etablieren konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde geprüft, inwieweit sich die oben genannten Ergebnisse auf das Wirts - Virus - System: PVY - *N. benthamiana* übertragen ließen. Dazu wurde zunächst der Einfluss der Transkriptlänge von sechs nicht translatierbaren Einzelstrang - Konstrukten auf die Etablierung einer RNA vermittelten Virusresistenz in *N. benthamiana* untersucht. Die PVY CP Sequenzfragmente weisen hierfür Längen von 109 bp, 274 bp, 382 bp, 592 bp, 614 bp und 842 bp auf. Diese Sequenzen wurden unter Kontrolle des doppelten CaMV 35S Promotors gebracht und mit einem CaMV Poly(A) - Signal versehen. Nach Klonierung in den binären Vektor pLX_222 wurden *N. benthamiana* Pflanzen mittels Agrobacterium vermitteltem Gentransfer stabil

transformiert. Das Hüllprotein wurde in diesen Pflanzen nicht exprimiert, was exemplarisch mittels Western Blot überprüft wurde (s. 4.7). Der anschließende Resistenztest zeigte, dass nur mit drei Konstrukten eine RNA vermittelte PVY Resistenz in den Pflanzen erreicht werden konnte (s. 4.2, s. 4.6 und Übersicht in Abb. 5.1).

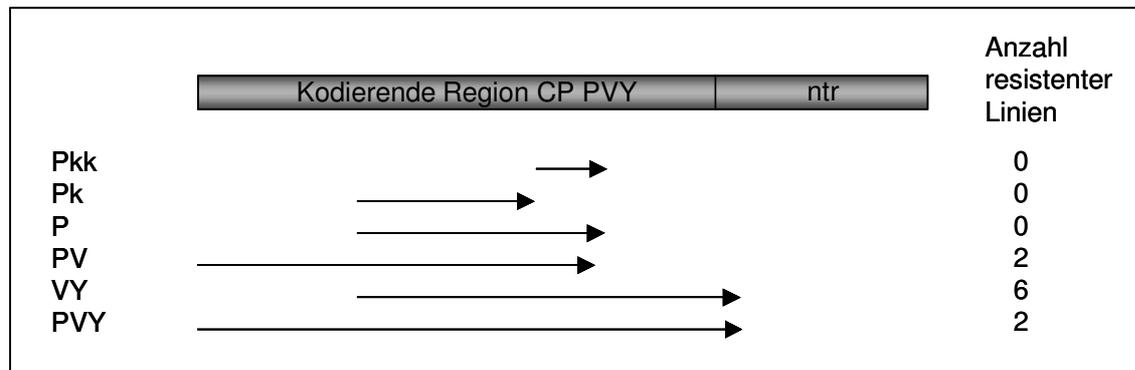


Abb. 5.1 Schematische Darstellung der verwendeten CP - Fragmente des PVY und Angabe der Anzahl der resistenten Linien

Mit 109 bp - 382 bp langen Fragmenten aus der zentralen Region des PVY CP konnte keine RNA vermittelte Virusresistenz in den *N. benthamiana* Pflanzen etabliert werden. Erst CP - Sequenzen von ≥ 600 bp erzeugten eine PVY Resistenz. Ein ähnliches Ergebnis wurde von ZHU *et al.* (2004) berichtet, die drei unterschiedlich lange PVY CP - Fragmente (202 bp, 417 bp und 603 bp) vom 3' Ende der kodierenden Sequenz auf ihre Fähigkeit eine Resistenz in *N. tabacum* (var NC89) vermitteln zu können, untersucht haben. Sie detektierten in 8 bzw. 10% der untersuchten Linien immune Pflanzen, sofern 417 bp respektive 603 bp der viralen Sequenz im Transgen vorlagen. Im Gegensatz dazu wurden mit den ≥ 600 bp Fragmenten im Rahmen dieser Arbeit in 16 - 54% der getesteten Linien resistente Pflanzen erzeugt. Innerhalb der VY - Linien, die den 3' kodierenden CP Bereich enthalten, traten dabei in mehr als der Hälfte der untersuchten Linien resistente Pflanzen auf. Die Effizienz war damit mehr als doppelt so hoch, wie in der Literatur beschrieben, da unterschiedliche Autoren eine effiziente Ausprägung der Resistenz nur in 5% bis 20% der Linien unter Verwendung vergleichbarer Konstrukte beobachteten (BAULCOMBE, 1996; SIJEN *et al.*, 1996; WATERHOUSE *et al.*, 1998; ZHU *et al.*, 2004).

Aus dem hohen Prozentsatz resistenter Linien des VY Konstruktes, ist abzuleiten, dass das 3' Ende der Protein kodierenden Sequenz besser

geeignet ist eine Resistenz zu vermitteln, was auch ZHU *et al.* (2004) aus ihren Ergebnissen folgern. Diese Effizienz wird überraschender Weise verringert, wenn die gesamte translatierbare CP Sequenz wie im Konstrukt PVY vorliegt. Dieser Effekt wurde auch von PANG *et al.* (1997) beobachtet, wenn die gesamte N - Gen Sequenz in den Pflanzen vorlag.

Das generell nicht alle Linien resistente Pflanzen zeigen, liegt möglicherweise daran, dass in unabhängigen Transformanden unterschiedlich viele Kopien des Transgens an verschiedenen Stellen im Genom integriert werden (VAUCHERET *et al.*, 1998), die positiv mit dem PTGS korrelieren (PANG *et al.*, 2000).

Auch innerhalb der Linien ist die Effizienz der Resistenzausprägung unterschiedlich. Während in den Linien der Konstrukte PV und PVY 6 - 26% der getesteten Pflanzen eine Resistenz zeigten, waren es in Linie VY 13 - 93%. Da heterozygote T1 Pflanzen getestet wurden, konnte nicht erwartet werden, dass alle Pflanzen eine PVY Resistenz zeigen. Auch SMITH *et al.* (1994) fanden in genotypisch gleichen Pflanzen resistente und anfällige Individuen, was sie in dem inhomogenen Transkript - Gehalt begründet sehen.

GOODWIN *et al.* (1996), BITKO UND BARIK (2001) und CARRINGTON (2001) vermuten, dass die virale Sequenz bestimmte Sekundärstrukturen aufweist, die sie vor einer Degradation schützt. Sofern diese Sequenzen im Transgen enthalten sind, würden in der Pflanze ineffektive siRNAs entstehen, die keine Degradation des Virus bewirken würden. Diese These wird durch Untersuchungen von PRINS *et al.* (1997) untermauert, die gezeigt haben, dass nicht mit allen Sequenzbereichen der N - und M - RNA und mit keinem Fragment der L - RNA des TSWV eine Resistenz in *N. tabacum* etabliert werden konnte. Die Transkriptionseffizienz der pflanzlichen RdRp, die zur Produktion der dsRNA in Pflanzen essentiell ist, hängt ebenfalls stark von der Sequenz des *Templates* ab (SCHIEBEL *et al.*, 1993).

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse dieser Arbeit, da es mit beiden ca. 600 bp langen Fragmenten, sowohl aus dem 5' - (PV) als auch dem 3' - gelegenen Bereich (VY) der CP kodierenden Sequenz, möglich war, resistente Pflanzen herzustellen. Genauso konnten PANG *et al.* (1997) jeweils mit beiden Hälften des TSWV N - Gens erfolgreich resistente Pflanzen produzieren.

Demnach wäre nicht die Sekundärstruktur der Sequenz, sondern vor allem die Länge der Pathogen abgeleiteten Sequenz für die Resistenzausprägung

entscheidend. Aufgrund der Ergebnisse der zitierten Arbeiten, kann abgeleitet werden, dass eine minimale Länge der Pathogen abgeleiteten Sequenz von 400 - 500 bp im transgenen Einzelstrangkonstrukt, unter Kontrolle eines starken Promotors, wie des verdoppelten CaMV 35S, vorliegen muss, damit erfolgreich eine Virusresistenz in Tabak Pflanzen etabliert werden kann. Nach der Untersuchung von PRINS *et al.* (1997), dass es mit Sequenzen der L - RNA des TSWV nicht möglich war eine Virusresistenz zu etablieren, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte Sequenzen überhaupt nicht in der Lage sind Resistenzen in Pflanzen zu vermitteln.

Es gibt mehrere Erklärungsansätze, warum eine bestimmte Länge der viralen Sequenz zur Erzeugung einer Resistenz notwendig ist. Zu den Voraussetzungen für das Auslösen des PTGS muss eine hohe Transkriptionsrate vorliegen, da mit promotorlosen Konstrukten keine Resistenz in Pflanzen etabliert werden kann (PANG *et al.*, 1993; DOUGHERTY *et al.*, 1994; SIJEN *et al.*, 1996; PALAUQUI *et al.*, 1997). Die Ausprägung des PTGS reagiert dabei schon auf geringe Änderungen der Transkript - Menge (ENGLISH UND BAULCOMBE, 1997). Da diese positiv mit der Länge der transgenen Sequenz korreliert (PRINS *et al.*, 1997), könnten von kurzen transgenen Sequenzen, nur wenig Transkripte entstehen, so dass keine Induktion des PTGS stattfindet.

Einen weiteren Einfluss auf die Transkription hat der Grad der DNA - Methylierung, da dicht methylierte Gene oft inaktiv sind, durch Demethylierung aber reaktiviert werden (MURFETT *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang könnte die Position der Transgen - Insertion in das Genom eine Rolle spielen, da die Integration in hypermethylierte Regionen zu einer Hypermethylierung des Transgens führt, wobei die Insertion in eine hypomethylierte Region auch in einem hypomethylierten transkriptionell aktiven Transgen resultiert (PRÖLS UND MEYER, 1992; MEYER UND HEIDMANN, 1994). Hypermethylierte Regionen sind transkriptionell inaktiv, was vermutlich darauf beruht, dass sich methylbindende Proteine an die methylierte DNA anlagern, wodurch eine kompakte, kondensierte Chromatinstruktur entsteht, von der bekannt ist, dass sie transkriptionell weniger aktiv ist (HOHN *et al.*, 1996; AGRAWAL *et al.*, 2003).

Neben der differentiellen Transkriptproduktion, kann auch der Verbleib der mRNA im Zytoplasma einen Einfluss auf die Ausbildung des PTGS haben. QUE *et al.* (1997) und VAUCHERET *et al.* (1997) vermuten, dass die geringe Stabilität

von kurzen Transkripten dazu führt, dass sie im Zytoplasma schnell abgebaut werden und deshalb das PTGS nicht ausgelöst werden kann.

Auch die Lokalisierung der Transkripte könnte einen Einfluss auf das PTGS haben. So müssen mRNAs 5'-(cap) Strukturen aufweisen und polyadenyliert sein, um effizient ins Zytoplasma exportiert zu werden. Im Zusammenhang mit dem PTGS, sowohl transgener (GOODWIN *et al.*, 1996; ENGLISH *et al.*, 1996; TANZER *et al.*, 1997), als auch endogener Gene (SMITH *et al.*, 1994), wird jedoch immer wieder das Auftreten verkürzter depolyadenylierter Transkripte festgestellt (DEPICKER UND MONTAGU, 1997; METZLAFF *et al.*, 1997), so dass die geringe Anzahl von Transkripten im Zytoplasma auch durch einen ineffizienten Transport aus dem Kern resultieren könnte (CAPONIGRO UND PARKER, 1996). In diesem Fall würden die Transkripte nicht mit der im Zytoplasma lokalisierten RdRp in Kontakt kommen, so dass die dsRNA als Auslöser des PTGS nicht gebildet werden kann. TENLLADO (2004) gibt zu bedenken, dass kurze mRNAs nicht erkannt werden und/oder nicht als Substrat für die RdRp markiert werden können. Welcher Faktor nun explizit dazu führt, dass keine bzw. ineffiziente Transkripte gebildet werden, bleibt fraglich. Durchaus vorstellbar ist eine Kombination der oben aufgeführten Punkte.

Transgene Pflanzen mit den PV, VY und PVY Konstrukten einer Linie zeigten immer eine einheitliche Resistenzreaktion, allerdings reagierten unterschiedliche Linien eines Konstruktes zum Teil verschieden. Neben anfälligen und resistenten, wurden auch *recovery* resistente Pflanzen beobachtet (Definition s. 4.6).

Das Phänomen der *recovery* Resistenz kann am besten mit dem *Threshold* Modell von BAULCOMBE (1996) erklärt werden. Darin beschreibt BAULCOMBE, dass die Akkumulation von abRNAs über einen bestimmten, aber nicht definierten Schwellenwert, das PTGS auslöst. Betrachtet man das Phänomen der Prämunisierung, bei der nach Infektion mit einem leichten Stamm eines Virus eine Resistenz gegen eine folgende Infektion eines schweren Virusstammes vorliegt, scheint eine entscheidende Rolle eher den siRNAs zuzukommen, die durch die Primärinfektion entstanden sind (COVEY *et al.*, 1997; RATCLIFF *et al.*, 1999; XIN UND DING, 2003). Bei der Sekundärinfektion mit einem homologen Virus, können die vorliegenden siRNAs (WANG UND METZLAFF, 2005), zur sofortigen Degradation der viralen RNA beitragen und die

Überwindung des pflanzeigenen Abwehrmechanismus durch das Virus erfolgreich unterdrücken.

Mutmaßt man, dass die Virusdegradation nicht durch die Überschreitung einer bestimmten abRNA Konzentration, sondern durch die Akkumulation der siRNAs über einen gewissen Schwellenwert ausgelöst wird, könnte man das Phänomen der *recovery* Resistenz wie folgt erklären:

Liegen die siRNAs des Transgens bereits vor einer Infektion mit dem homologen Virus vor, wird das Virus sofort degradiert und die Pflanze wird nicht systemisch infiziert (MUELLER *et al.*, 1995; SIJEN *et al.*, 1996; ENGLISH *et al.*, 1996, KALANTIDIS *et al.*, 2002). Liegen zum Zeitpunkt der Infektion nur wenige siRNAs vom Transgen vor, besteht zum einen die Möglichkeit, dass durch einen viralen Suppressor, wie HCPro, alle siRNAs eliminiert werden (LLAVE *et al.*, 2000; MALLORY *et al.*, 2001) und das Virus die Pflanze erfolgreich infizieren kann. Liegen allerdings so viele siRNAs in der Zelle vor, dass sie einerseits nicht durch HCPro eliminiert werden können, andererseits aber auch nicht die vollständige Degradation des Virus bewirken, könnten die bei der Replikation des Virus entstehenden sekundären siRNAs zur Überschreitung des siRNA - Schwellenwertes führen. Durch den folgenden zyklischen Amplifikationsprozess, in dem die zelluläre RdRp existierende siRNAs als Primer nutzt und auf diese Weise den Grad des PTGS verstärkt (SIJEN *et al.*, 2001), kann erfolgreich die gesamte virale RNA abgebaut werden, so dass symptomfreie Neuaustriebe gebildet werden, die phänotypisch eine *recovery* Resistenz charakterisieren.

Diese These wird dadurch unterstützt, dass ein Grossteil der *silencing* assoziierten endogen gebildeten siRNAs in Tabak am 2' Hydroxyl - Rest der terminalen Ribose durch eine Methylgruppe modifiziert sind (YU *et al.*, 2005), wodurch sie nicht als Primer für die RdRp fungieren und die virale RNA nicht amplifiziert werden kann (EBHARDT *et al.*, 2005). Eine Modifikation der am viralen Genom entstehenden siRNAs hingegen, wird durch HCPro unterbunden, so dass eine Ausbreitung des Silencing über das virale Genom durch die RdRp ermöglicht wird und das Virus degradiert werden kann (EBHARDT *et al.*, 2005). Die Zunahme der siRNAs nach einer Virusinfektion könnte möglicherweise nicht ausschließlich durch die Synthese sekundärer siRNAs ansteigen, sondern auch aus der gesteigerten Aktivität der RdRp

resultieren. YANG *et al.* (2004) haben gezeigt, dass in *N. tabacum* eine RdRp existiert, die durch Salicylsäure, die in der Pathogenabwehr eine entscheidende Rolle einnimmt, induziert werden kann, was für die Virusabwehr von entscheidender Bedeutung ist (VAZQUEZ-ROVERE *et al.*, 2002).

Eine völlig andere Erklärung der *recovery* Resistenz liefern die Untersuchungen von PANG *et al.* (2000), die in *Squash mosaic Virus* transgenen Kürbispflanzen ein *recovery* nach 20-40 Tagen beobachteten. Erfolgte die Inokulation erst zu diesem Zeitpunkt, reagierten die Pflanzen mit einer Immunität, was nahe legt, dass die Resistenz auch durch die Entwicklungsstadien der Pflanze und nicht durch die Virusinfektion ausgelöst wird (PANG *et al.*, 2000). Eine entwicklungsabhängige Resistenz wurde auch in transgenem Salat beobachtet, bei dem spät inokulierte Pflanzen resistent reagierten, im Gegensatz zu früh inokulierten, die anfällig waren (PANG *et al.*, 1996).

Eine Verbindung der beiden Mechanismen liegt in der entwicklungsabhängigen Expression der siRNAs. MISSIOU *et al.* (2004) zeigten, dass in Pflanzen in denen später viele siRNAs vorliegen, in der Gewebekultur noch keine siRNAs nachweisbar sind, aber die Konzentration im Lauf der Zeit kontinuierlich ansteigt. Zu diesem Ergebnis passt die Kenntnis, dass das PTGS - gemessen am Vorliegen der siRNAs - während bzw. durch die Meiose zurückgesetzt wird (DEHIO UND SCHELL, 1994; DORLHAC DE BORNE *et al.*, 1994; VAUCHERET *et al.*, 1995; BALANDIN UND CASTRESANA, 1997). Laut BALANDIN UND CASTRESANA (1997) taucht es ein paar Wochen nach der Keimung wieder auf und bleibt während der gesamten vegetativen und generativen Entwicklung in allen Blättern erhalten.

In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pflanzen, wurde die Menge der vorliegenden siRNAs nicht bestimmt, so dass das Auftreten der siRNAs und die Ausprägung der *recovery* Resistenz nicht in Korrelation gesetzt werden konnten. Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt allerdings auf, dass die *recovery* resistent reagierenden Pflanzen alle 20-40 dpi symptomlose Neuaustriebe zeigten (s. Tab. 4.12 und Tab 4.16), so dass eine entwicklungsabhängige *recovery* Resistenz zu vermuten ist.

Bei der Resistenztestung über 14 Monate, zeigte sich, dass die Resistenz in einigen Pflanzen nach sieben Wochen durch PVY gebrochen werden konnte. Auch TENLLADO (2004) beschreibt in transgenen Pflanzen eine Verzögerung

der Symptom Expression von mehreren Wochen und vermutet, dass eine reduzierte Anzahl kompetenter Infektionsherde in den inokulierten Blättern erhalten bleibt, deren Virusgehalte unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA oder Northern - Blot liegen. Guo *et al.* (1999) gelang es allerdings mittels RT-PCR geringe Spuren viraler RNA in *recoverten* Pflanzen nachzuweisen.

Ein anschaulicheres Beispiel lieferten VAN DEN BOOGAART *et al.* (2004) durch Pfropfungsversuche mit Erbse. Nach Pfropfung eines nicht transgenen Reis auf eine *recoverte* transgene Erbsenunterlagen wurde das Reis infiziert. Da diese Infektion nur aus dem *recoverten* Gewebe erfolgt sein kann, müssen darin infektiöse Viruspartikel - ev. nur in extrem kleine Mengen - vorliegen. Es wird vermutet, dass die Viren zum Schutz vor der Degradation nicht deassemblieren und/oder sich durch Lokalisierung in bestimmten Geweben oder Gewebsstrukturen dem Abbau entziehen.

Für die Zukunft sollte aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden, dass ein Resistenztest transgener Pflanzen über 4-8 Wochen, wie er normal durchgeführt wird, zu kurz sein kann, um die Resistenzreaktion einer Pflanze nach einem Virusbefall dauerhaft bewerten zu können.

Die gebildeten Symptome in Form kleiner chlorotischer Flecken (s. Abb. 4.24), die in diesen Pflanzen auftraten waren eindeutig auf eine PVY Infektion zurückzuführen. Heute ist bekannt, dass virale Suppressoren mit dem miRNA *Pathway* interagieren und so eine deregulierte Expression von Wirtsgenen verursachen, da Ziele der miRNAs meist Transkriptionsfaktoren sind, die für die Meristemidentität, Zellteilung, Organentwicklung und -polarität nötig sind (CARRINGTON UND AMBROS, 2003). Deren Beeinflussung führt zur Veränderung des Phänotyps von Pflanzen, die in ihrer Erscheinung oft denen virusinfizierter symptomtragender Pflanzen gleichen (LLAVE *et al.*, 2002; MALLORY *et al.*, 2002; CARRINGTON UND AMBROS, 2003; KASSCHAU *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2004;). Die kleinen chlorotischen Flecken entstehen also scheinbar, wenn nach der Replikation des PVY in einigen Zellen, durch die deregulierende Wirkung der HCPro auf endogene miRNAs, eine Symptomausbildung stattfindet. Dieses geschieht nur in einem begrenzten Bereich und eine systemische Infektion des Virus, einhergehend mit einer vollständigen Unterdrückung des pflanzlichen Abwehrmechanismus und Ausbildung systemischer Symptome, scheint nicht möglich zu sein.

Dieser Umstand wirft die Idee auf, dass Proteine, die an der Ausbreitung des PTGS über kurze Distanzen (ca. 15 Zellen) beteiligt sind, eine Rolle spielen. Zu diesen Enzymen gehört die als RDR6 bezeichnete RdRp (ehemals als SDE1/SGS3 bezeichnet) aus *A. thaliana* (BAULCOMBE, 2004). In Pflanzen, in denen die Funktion der RDR6 durch Mutation unterbunden wurde, fand keine Ausbreitung des Kurzstreckensignals statt, das vermutlich durch die 21 nt langen siRNAs gebildet wird (HIMBER *et al.*, 2003). Das legt die Vermutung nahe, dass die RDR6 durch die Replikation des Virus aktiviert wird, wodurch in der nachfolgenden Prozessierungskaskade 21nt lange siRNAs entstehen, die sich in nahegelegene Zellen ausbreiten. Das Auftreten der 21 nt langen siRNAs könnte diesen Zellen signalisieren, dass in direkter Nachbarschaft das PTGS aktiviert wurde. Über die Rückkoppelung der siRNA mit dem homologen Transgen könnte das PTGS in diesen Zellen aktiviert werden, so dass eine schnelle Degradation des Virus gewährleistet ist. Auch unter energetischen Gesichtspunkten scheint dies für die Pflanze sinnvoll zu sein, da nicht kontinuierlich große Mengen von siRNAs produziert werden müssen, aber die Pflanze auf zellulärer Ebene schnell auf eine Virusinfektion reagieren kann.

Nachdem untersucht wurde, welche Abhängigkeit zwischen der Länge der PVY CP Sequenz und einer RNA vermittelten Resistenz in *N. benthamiana* - Pflanzen besteht, sollte in einem zweiten Ansatz untersucht werden, ob durch die Kombination von nicht translatierbaren CP Sequenzfragmenten des PVY, PLRV und PVX eine multiple Virusresistenz in *N. benthamiana* - Pflanzen mit nur einem Konstrukt etabliert werden kann.

Die RNA vermittelte Virusresistenz wirkt hoch spezifisch ausschließlich gegen sequenzhomologe Viren. Durch Infektion einer resistenten Pflanze mit einem heterologen Virus, kann durch die Wirkung des viralen Suppressors das PTGS in der Pflanze unterdrückt werden, wodurch ein Verlust der Resistenz gegen das homologe Virus resultiert (SAVENKOV UND VALKONEN, 2002; TENLLADO, 2004). Dieser Vorgang wurde von MITTER *et al.* (2001, 2003) in PVY resistenten Pflanzen gezeigt, die zum Zeitpunkt der PVY Infektion bereits mit CMV infiziert waren. Durch die Wirkung des Suppressor 2b wurde in den nach der CMV Infektion neu entwickelten Blättern das PTGS unterdrückt (BRIGNETI *et al.*, 1998; LI UND DING, 2001; LUCY *et al.*, 2000), so dass in den vorher PVY resistenten Pflanzen eine PVY Infektion von diesen Blättern aus erfolgen

konnte. SAVENKOV UND VALKONEN (2001) zeigten, dass PVA resistente Pflanzen nach vorangegangener PVY Infektion nicht mehr PVA resistent waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass Viren aus derselben oder einer unterschiedlichen Familie in der Lage sind eine Resistenz zu unterdrücken. Dieses Risiko würde in Pflanzen mit einer multiplen Virusresistenz minimiert werden.

Die Etablierung einer Resistenz gegen mehrere Viren wurde durch Kombination translatierbarer viraler Gene, die jeweils unter Kontrolle eines eigenen Promotors standen, bereits mehrfach gezeigt. Durch die Kombination von N-Genen der Tosspoviren TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* und *Groundnut ringspot virus* wurde z.B. eine multiple Resistenz in Tabakpflanzen etabliert (PRINS *et al.*, 1995). Durch Expression der CP Gene des CMV, *Watermelon mosaic virus 2* und *Zucchini yellow mosaic virus* wurde eine Resistenz in Kürbis und Melone erzeugt (FUCHS UND GONSALVES, 1995 ; TRICOLI *et al.*, 1995; FUCHS *et al.*, 1997; FUCHS *et al.*, 1998) und auch die Expression der CP Sequenzen der Kartoffelviren PVY und PVX führten zum Auftreten resistenter Kartoffelpflanzen (LAWSON *et al.*, 1990; KANIEWSKI *et al.*, 1990). Aus den Experimenten von LAWSON *et al.* (1990) und KANIEWSKI *et al.* (1990) wurde abgeleitet, dass durch die Expression von CP Fragmenten des PVY und PVX eine Resistenz gegen diese beiden Viren etabliert werden kann.

Einen weiteren Einfluss auf das Konstruktdesign hatten Arbeiten von JAN *et al.* (2000 a, b), in denen gezeigt wurde, dass virale N - Gen Sequenzfragmente des TSWV mit einer Länge von ≥ 218 bp, die für sich allein exprimiert keine Resistenz bewirken, durch die transkriptionelle Fusion an ein Reporter-gen oder das translatierbare CP des TuMV, Resistenz vermitteln. Die vorangestellte Proteinsequenz übernimmt in diesen Konstrukten die Funktion einer *silencer* DNA und stabilisiert wahrscheinlich das Transkript.

Um zu untersuchen, ob die Verlängerung der 109 - 382 bp langen PVY CP - Sequenz ebenfalls Transkript stabilisierend wirkt und diese Sequenzen dadurch in der Lage sind eine Resistenz zu vermitteln, wurden unterschiedliche, der unter 5.1. beschriebenen Konstrukte mit CP Sequenzen des PLRV (269 bp) und des PVX (291 bp) verlängert (s. Abb. 4.9).

In keiner der 26 getesteten Linien wurde eine PVY Resistenz beobachtet. Da JAN *et al.* (2000b) in einem Versuch, in dem sie Teile der N - Gen Sequenz des TSWV an die kodierende CP Sequenz des TuMV fusioniert hatten,

Resistenzen gegen TuMV, TuMV + TSWV, aber nie ausschließlich gegen TSWV beobachten konnten, wurde die Resistenztestung gegen PLRV und PVX in den hergestellten Linien nicht durchgeführt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Verlängerung ≤ 382 bp langer PVY CP Sequenzen mit viralen CP Fragmenten heterologer Viren, nicht positiv auf die Etablierung einer PVY Resistenz in *N. benthamiana* Pflanzen auswirkt.

Die proteinkodierende Sequenz wirkt offensichtlich anders, als eine Kombination nicht translaterbarer Sequenzen. Entweder hat die proteinkodierende Sequenz einen stärker stabilisierenden Effekt, oder sie enthält Sequenzelemente, die für die Aktivierung des PTGS nötig sind (JAN *et al.*, 2000b).

Von SMITH *et al.* (2000) wurde berichtet, dass durch invertierte Spiegelung der N1a Sequenz des PVY eine Resistenz gegen PVY in *N. tabacum* etabliert werden kann. Diese Information wurde auf das Kartoffelvirus - *N. benthamiana* System übertragen, indem das Konstrukt PPX (s. Abb. 4. 9) als *inverted repeat* Konstrukt hergestellt wurde und entweder ein selbstspleißendes Intron oder (CG)₁₀ als Zwischenstück verwendet wurden. (s. Abb. 4.14). Nach stabiler Transformation in *N. benthamiana* Pflanzen wurden Nachkommen der T1 Generation auf eine PVY Resistenz untersucht, wobei in jeweils drei der zehn pro Konstrukt untersuchten Linien PVY resistente Pflanzen beobachtet wurden (s. Tab. 4.5.). Durch invertierte Anordnung der kombinierten viralen Sequenzen war es also möglich, mit dem 382 bp langen PVY CP Fragment eine PVY Resistenz zu etablieren.

Auffällig dabei war, dass innerhalb der resistenten PPX+Intron-XPP Linien weniger resistente Pflanzen detektiert wurden als in den PPX+CG-XPP Linien. In anderen Beispielen wurde durch den Einbau von Intron Sequenzen als *Spacer* die Effizienz der Konstrukte eine Resistenz zu vermitteln auf bis zu 100% gesteigert (CHUANG UND MEYEROWITZ, 2000; SMITH *et al.*, 2000), was darauf zurückgeführt wird, dass nach dem Spleißen des Introns die beiden Enden des Transkriptes leichter miteinander hybridisieren können und dadurch die PTGS auslösende dsRNA bilden (SMITH *et al.*, 2000). MITTER *et al.* (2003) stellten zudem fest, dass die dsRNA eines IR Konstruktes effektiver degradiert wird, als die einzelsträngige Intron Sequenz.

Pflanzen der PVY resistent reagierenden Linien wurden im Folgenden auf eine PLRV bzw. PVX Resistenz hin untersucht, wobei in keinem Fall eine Resistenz etabliert werden konnte. In den PLRV infizierten Pflanzen war der Virustiter allerdings variabel (TPIA, s. Abb. 4.16) was darauf hindeutet, dass in einzelnen Pflanzen die Replikation oder Ausbreitung des PLRV leicht gehemmt wurde.

Im Rahmen der PVX Resistenztestung kam es im Frühsommer 2003 im Gewächshaus zu Temperaturen von über 35°C. In Folge dieser hohen Temperaturen war die Symptomausprägung der Pflanzen nicht eindeutig, da sie wiederholt verschwanden und ausgebildet wurden. Selbst nicht transgene Kontrollpflanzen erschienen zeitweise symptomlos und zeigten im ELISA keine erhöhte Absorption (s. 8.7). Aufgrund der negativen ELISA Werte für die Kontrollpflanzen und die wechselnde Symptomatik, ist das Ergebnis dieses Tests nicht aussagekräftig. Da aber alle Pflanzen 7 dpi und im Neusaustrieb nach einem Rückschnitt Symptome zeigten, wird davon ausgegangen, dass alle PVX infiziert waren, mit Ausnahme der einen Pflanze des Konstruktes PPX+Intron-XXP, die 7dpi keine Symptome zeigte.

Diese Ergebnisse überraschten, da angenommen wurde, dass die gesamte Länge der invertierten Sequenzen hybridisiert, so dass dsRNA der drei CP Sequenzfragmente vorliegt und durch PTGS eine Resistenz gegen PVY, PLRV und PVX resultiert. Da mit diesen Konstrukten einzig eine Resistenz gegen PVY etabliert werden kann, wird vermutet, dass die invertierten Sequenzen nur im Bereich der PVY CP Sequenz hybridisieren. Im Bereich der PLRV und PVX abgeleiteten Sequenzen wird die dsRNA Bildung ev. durch Vorliegen besonderer Sekundärstrukturen verhindert. Ob die Sekundärstruktur oder die Position der CP Sequenz in dem Konstrukt einen Einfluss auf die Bildung der dsRNA hat, kann aus diesem Ergebnis nicht abgeleitet werden. Einen Hinweis darauf würden transgene Pflanzen liefern, bei denen die Reihenfolge der viralen CP Sequenzen innerhalb des *inverted repeats* vertauscht wäre. Grundsätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch in diesem Fall ausschließlich durch die Länge der PVY CP Sequenz, die ca. 100 bp länger ist als die der anderen beiden Viren, die Resistenz etabliert wird.

Zum Nachweis der transgenen Sequenz in den T₀ Pflanzen wurden die Primer IR2 und 35Hind eingesetzt, mit denen die 3' gelegene invertierte Sequenz des Konstruktes nachgewiesen wird. Die Amplifikation beider Wiederholungen mit

den Primern 35Eco und 35Hind lieferte kein Fragment und es wurde angenommen, dass innerhalb der DNA PCR hemmende Sekundärstrukturen ausgebildet sind. Da aber nicht ausgeschlossen werden kann, dass die PCR nicht erfolgreich verlief, weil das Konstrukt unvollständig inseriert wurde, war die Möglichkeit der dsRNA Bildung u.U. gar nicht gegeben.

Des Weiteren wurde nicht untersucht, ob das Intron ST-LS1 aus dem Transkript tatsächlich herausgeschnitten wird. Die Analyse der Sequenzen (s. 8.6) ergab, dass theoretisch die erforderlichen Bereiche vorhanden waren, wodurch aber kein Beweis für ein reales Spleißen des Introns erbracht wird. Die Tatsache, dass die Anzahl der Linien, in denen resistente Pflanzen beobachtet werden, für beide Konstrukte gleich sind, ist möglicherweise ein Indiz dafür, dass das Intron nicht effizient herausgeschnitten wird und die dsRNA Bildung folglich nicht effektiv stattfand.

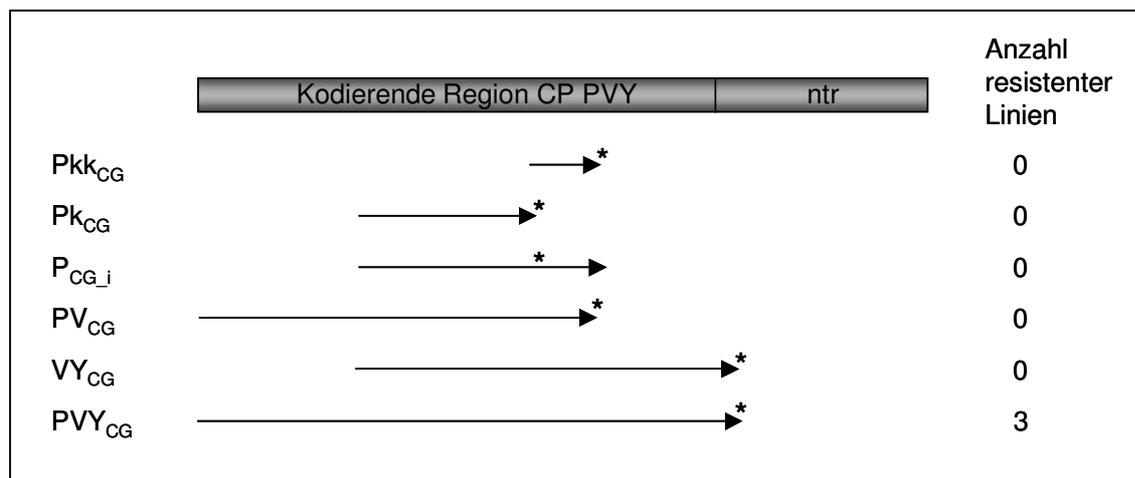
In Prokaryonten verursachen *inverted repeats* eine genomische Instabilität und werden deswegen zerstört (COLLINS, 1980; LILLEY, 1981; LEACH UND STAHL, 1983). Die Deletion könnte entweder durch Nukleasen erfolgen, die palindromische Strukturen erkennen oder durch ein so genanntes Replikations - *Slipping* über kreuzförmige Strukturen, die von *inverted repeats* aufgrund der Strang internen komplementären Sequenzen ausgebildet werden können (MUSKENS *et al.*, 2000). Auf diese Weise könnte ein Transkript entstehen, das die außen gelegenen Sequenzen des *inverted repeats* enthält, während die näher am Zwischenstück lokalisierten Sequenzen fehlen. In diesem Fall würde dsRNA nur im Bereich der PVY - Sequenzen entstehen.

Gegen diese Theorie sprechen die Ergebnisse von BUCHER *et al.* (2005), die durch invertierte Anordnung eines nicht translatierbaren chimären N - Gens, das aus 150 bp langen N - Gen Fragmenten von vier unterschiedlichen Tospoviren regeneriert wurde eine multiple Tospovirusresistenz in Pflanzen etablieren konnten. Auch die Verwendung eines chimären Nepoviren Gens aus ca. 220 bp langen CP Fragmenten dreier unterschiedlicher Nepoviren führte zur Ausbildung einer multiplen Resistenz (KRZCAL, pers. Komm.).

Im Vergleich zu den Arbeiten von BUCHER *et al.* (2005) und KRZCAL wurden im Rahmen dieser Arbeit längere CP Fragmente von Viren aus unterschiedlichen Familien kombiniert, die möglicherweise eher zur Ausbildung von kreuzförmigen Strukturen führen als kürzere Sequenzen. Der Einfluss der DNA

Methylierung, die besonders im Zentrum der *inverted repeats* auftritt und zur Transkriptionshemmung dieses Bereiches führen soll, stammt im Gegensatz zu den Konstrukten dieser Arbeit, aus Analysen von invertiert inserierten T - DNAs (SIJEN *et al.*, 1996; STAM *et al.*, 1998; SELKER, 1999) und wird deswegen nicht näher diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte des weiteren untersucht werden, ob durch Erweiterung viraler Sequenzen mit synthetisch hergestellten (CG)₁₀, eine RNA vermittelte PVY Resistenz verbessert werden kann. CG Sequenzen sind klassische Ziele der DNA Methylierung (GRUENBAUM *et al.*, 1981) und durch Einbau von (CG)₁₀ in unterschiedliche Konstrukte (s. Abb. 5.2) sollte die DNA Methylierung künstlich gesteigert werden, um zu untersuchen, ob die DNA Methylierung eine Voraussetzung für das PTGS und damit die Virusresistenz ist.



* repräsentiert Stellen, an denen synthetische (CG)₁₀ eingefügt wurden

Abb. 5.2 Schematische Darstellung der PVY - Konstrukte, die mit synthetischen (CG)₁₀ kombiniert wurden und Angabe der Anzahl resistenter Linien

Mit den Konstrukten Pkk_{CG}P, Pk_{CG}P, PV_{CG}YPX und P_{CG}PX (s. Abb. 4.8 und Abb. 4.9) konnte, wie mit den Konstrukten Pkk_{CG}, Pk_{CG}, P_{CG}, PV_{CG} und VY_{CG}, keine PVY Resistenz in *N. benthamiana* Pflanzen etabliert werden. Ausschließlich einige Pflanzen in drei PVY_{CG} Linien zeigten eine Resistenz. Da mit den analogen Konstrukten PV und VY ohne (CG)₁₀ (s. Abb. 5.1) eine Resistenz in Pflanzen etabliert werden konnte, scheint die Kombination viraler PVY CP Sequenzen mit synthetischen (CG)₁₀ die Resistenzausbildung negativ zu beeinflussen.

Zur Klärung, ob die Methylierung durch den Einbau der (CG)₁₀ gesteigert wurde, sollte der Methylierungsgrad dieser Sequenzen analysiert werden. Zunächst wurde durch Amplifikation nicht modifizierter DNA zweier Pflanzen der Linie PVY_{CG.09} gezeigt, dass (CG)₁₀ in der transgenen Sequenz enthalten waren (s. Abb. 8.19). Allerdings waren diese nach der Bisulfitmodifikation, die zur Detektion von ^mC eingesetzt wurde, nicht mehr nachweisbar, so dass der Grad der C - Methylierung nicht bestimmt werden konnte (s. Abb. 8.13).

Nach Untersuchungen von TUSNÁDY *et al.* (2005) werden stark T haltige Sequenzen, die durch die Modifikation nicht methylierter C entstehen, von Polymerasen schlecht amplifiziert. Das legt die Vermutung nahe, dass die C der (CG)₁₀ nicht methyliert waren. Eine Methylierung der C in diesem Bereich würde zur Ausbildung stabiler Doppelbindungen führen, die die Konversion negativ beeinflussen könnten, da diese nur an vollständig denaturierter DNA stattfindet; ein Einfluss auf die Amplifikation, die an nicht modifizierter DNA problemlos durchgeführt werden konnte, wird hingegen gering eingeschätzt. Da auch die angrenzenden Sequenzen keine erhöhte C - Methylierung zeigten (s. Abb. 4.43), kann davon ausgegangen werden, dass durch den Einbau der (CG)₁₀ die Methylierung nicht künstlich erhöht wird.

Aus den vorliegenden Untersuchungen ist nicht abzuleiten, ob der Einbau der (CG)₁₀ die Methylierung des Transgens tatsächlich beeinflusst, da der Methylierungsgrad der C der (CG)₁₀ nicht bestimmt werden konnte. Die Auswirkungen auf die Resistenzausprägung durch die Erweiterung viraler Sequenzen mit (CG)₁₀ hingegen ist negativ.

In einem letzten Ansatz sollte untersucht werden, ob die RNA vermittelte Resistenz mit der DNA Methylierung der transgenen Sequenz korreliert. Dazu wurde der Methylierungsgrad in anfälligen und resistent reagierenden transgenen Pflanzen der Linien PV, VY, PVY und PVY_{CG} vor und nach Inokulation mit PVY analysiert. Dabei wurde die Methylierung der C der viralen Sequenzen der transgenen DNA bestimmt, da beim PTGS ausschließlich homologe Sequenzen methyliert werden (JONES *et al.*, 1999; PELISSIER *et al.*, 1999).

Zur Detektion der ^mC wurde die Bisulfitmodifikation gewählt, die neben der Ermittlung der prozentualen Anteile der methylierten sC und aC, auch die Verteilung der methylierten C innerhalb der Sequenz ermöglicht. Um die

Modifikationseffizienz der Konversion bestimmen zu können, wurde die Methode von FROMMER *et al.* (1992; s. 4.8.2.1) übernommen. Die starke DNA Fragmentierung durch die Modifikation (RAIZIS *et al.*, 1995; GRUNAU *et al.*, 2001) hat keinen Einfluss auf die Amplifikation des 319 bp langen Kontrollfragmentes (s. Abb. 4.29). Die Amplifikation der maximal 800 bp langen Fragmente der modifizierten transgenen DNA der *N. benthamiana* Pflanzen konnte allerdings nur mit der *Taq*_{AGMaiss} erfolgreich durchgeführt werden (s. Abb. 3.8) und erforderte eine Reamplifikation der ersten Amplifikate mit *nested* Primern (s. Abb. 4.34). Die Unterscheidung von methylierten und nicht methylierten C durch die Verwendung differenzierender Primer, wie sie im Rahmen von Methylierungs - spezifischer PCR eingesetzt werden (KOSAKI *et al.*, 1997), war hier nicht möglich (s. Abb. 4.31).

Eine Korrelation des Methylierungsgrades der viralen CP Sequenz und der Resistenz wurde in den Pflanzen der Linien PV.14 und PVY_{CG.09} nachgewiesen, bei denen die Methylierung in den resistent reagierenden Pflanzen durch Ausbreitung in 5' - Richtung stark zunahm (s. Abb. 4.42 und Abb. 4.44), während sie in den anfälligen Pflanzen nahezu konstant blieb. 44 dpi entsprach die prozentuale C - Methylierung der resistent reagierenden Pflanzen ungefähr der, der anfälligen Pflanze der gleichen Linie. Allerdings waren die Methylierungsgrade mit 70% (PV.14) und 13% (PVY_{CG.09}) stark unterschiedlich. In den Pflanzen der Linien VY.04, VY.07 und PVY.13, die 107 dpi untersucht wurden, wurde keine Korrelation zwischen der Methylierung und der Resistenz beobachtet.

Es ist bekannt, dass auch das Alter der Pflanzen (VANYUSHIN, 2004) oder die Veränderung der Phytohormon - Konzentration (BASHKITE *et al.*, 1980; VANYUSHIN *et al.*, 1988), die Methylierung beeinflussen. Dies kann ein Grund dafür sein, dass die Korrelation, die 44 dpi festgestellt wurde, 107 dpi nicht messbar war. Bei der Analyse der Daten muss des weiteren berücksichtigt werden, dass nur ein Klon pro Pflanze und Zeitpunkt sequenziert wurde. Die Sequenzanalyse geht somit auf die DNA einer Zelle zurück und gibt nur deren Methylierungsgrad an. Durch Versuche von PELISSIER UND WASSENEGGER (2000), die Methylierungsgrade von mindestens sechs Klonen pro Pflanze analysiert haben, wird deutlich, dass die Methylierung der C in den einzelnen Zellen variiert. Analysen mittels methylierungssensitiven RE zeigen ebenfalls,

dass die Methylierung unterschiedlicher Zellen nicht einheitlich ist (JONES *et al.*, 1999).

Die dunkelgrünen Bereiche eines Mosaiksymptoms werden auch als *dark green islands* bezeichnet. Diese Gewebsbereiche sind virusfrei (ATKINSONS UND MATTHEWS, 1970) und umgeben von chlorotischen systemisch infizierten Zellen (HULL, 2002). Das heißt, dass in den anfälligen Pflanzen, die nach der PVY Infektion ein starkes Mosaik ausbilden, wahrscheinlich ein Zellgemisch von infizierten und virusfreien resistenten Zellen vorliegt. Sofern also die Methylierung mit der Resistenz korreliert, müssten deren Methylierungsgrade stark variieren. Die Analyse der DNA einer einzigen Zelle kann also nicht den Methylierungsgrad von Geweben oder ganzen Pflanzen anzeigen. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten spiegeln aufgrund der geringen Wiederholungszahl also nicht den Methylierungszustand der gesamten Pflanze wieder. Eine Aussage über eine Korrelation zwischen der DNA Methylierung und der RNA vermittelten Resistenz ist damit nicht gesichert.

Es wird allerdings angenommen, dass die Silencing induzierte DNA Methylierung und Resistenz durch den gleichen Faktor ausgelöst werden, aber nicht eng korrelieren. Dass ein direkter Zusammenhang zwischen der DNA Methylierung und der Etablierung einer Resistenz unwahrscheinlich ist, deuteten Untersuchungen von WASSENEGGER *et al.* (1998) an, die zeigten, dass durch replizierende PSTVd RNA zwar die Methylierung homologer transgener DNA ausgelöst, jedoch keine Viroid - Resistenz etabliert wird. Arbeiten mit rekombinanten viralen Vektoren, die Fragmente von Reportergenen enthalten, die transgen in Pflanzen vorlagen, lösen ein Silencing der Reportergene und eine Methylierung homologer Sequenzen aus, führen aber ebenfalls nicht zu einer Resistenz gegen den viralen Vektor (INGELBRECHT *et al.*, 1994; ENGLISH *et al.*, 1996; THOMAS *et al.*, 2001).

Aus anderen Untersuchungen, in denen eine Korrelation der Methylierung mit der Resistenz nachgewiesen wurde (SMITH *et al.*, 1994; SIJEN *et al.*, 1996; JONES *et al.*, 1998; NEVES-BORGES *et al.*, 2001), geht einheitlich hervor, dass die Methylierung der transgenen Sequenz erst nach Virusreplikation erfolgt und nur an homologen Sequenzen stattfindet, die aktiv transkribiert werden. In Pflanzen, deren Transkription durch Promotor Methylierung, also TGS

unterbunden ist, wird keine Virusresistenz ausgebildet und eine Methylierung homologer Sequenzen findet nicht statt.

Die Kenntnis, dass durch das Vorliegen von dsRNA im Zytoplasma eine Methylierung homologer Transgene hervorgerufen werden kann (METTE *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2001) und dass der Grad der Methylierung mit dem Auftreten von siRNAs korreliert (LLAVE *et al.*, 2000; METTE *et al.*, 2001), legt die Vermutung nahe, dass die siRNAs mit homologen DNA Sequenzen paaren und so ein Substrat für Methyltransferasen darstellen (KNIGHT UND BASS, 2001; VASTIJ *et al.*, 2002), wodurch die DNA methyliert wird. Durch Mutationsanalysen wurde ermittelt, dass AGO4 (ZILBERMAN *et al.*, 2003), SDE4 (CHAN *et al.*, 2004), RDR2 (HAMILTON *et al.*, 2002), DCL3 (XIE *et al.*, 2004) und HEN1 (BOUTET *et al.*, 2003) an der Ausbildung der Silencing gesteuerten Methylierung beteiligt sind. Damit kann folgendes Modell abgeleitet werden, das den Stand der derzeitigen Erkenntnisse darstellt:

Die bei der Replikation eines Virus im Zytoplasma entstehende dsRNA, wird von DCL2 erkannt und in virale siRNA mit 21bp Länge prozessiert (XIE *et al.*, 2004). Diese 21 bp siRNAs sind wie oben beschrieben für die Bildung sekundärer siRNAs an der viralen RNA verantwortlich, so dass es unter bestimmten Voraussetzungen zur Ausbildung einer Resistenz kommt. Da AGO4 sowohl die siRNA Akkumulation als auch die DNA Methylierung (ZILBERMAN *et al.*, 2003) kontrolliert, wird angenommen, dass einige dieser viralen 21 bp siRNAs mit AGO4 in den Kern transportiert werden. SDE4 bildet eine Untereinheit einer DNA abhängigen RNA Polymerase (POLIV), die Pflanzen spezifisch mit AGO4 assoziiert und in die DNA Methylierung involviert ist (HERR *et al.*, 2005; ONODERA *et al.*, 2005). Es ist vorstellbar, dass die 21 bp siRNAs an homologe Bereiche der transgenen DNA binden und so der POLIV, die an der genomischen DNA RNA amplifiziert, als Primer dienen. Diese RNA könnte von der RDR2 erkannt und ebenfalls unter Verwendung der 21 bp siRNA als Primer amplifiziert werden. Die Nutzung der viralen siRNAs als Primer würde sicherstellen, dass nur homologe Sequenzen amplifiziert würden. Durch DCL3, der mit RDR2 assoziiert ist (MATZKE *et al.*, 2004), entstehen nuklear 25bp lange siRNAs, die am 3' Ende durch HEN1 methyliert werden (EBHARDT *et al.*, 2005). Diese 25 bp siRNAs bilden zum einen das Langstreckensignal, sind aber auch an der epigenetischen Modifikation des

Genoms beteiligt, was die Methylierung homologer Sequenzen im apikalen Meristem (JONES *et al.*, 1998) erklärt.

Sofern die DNA transkribiert wird und an der Replikationsgabel kurzzeitig einzelsträngig vorliegt, könnten die methylierten 25 bp siRNAs mit der DNA interagieren, wodurch unübliche Strukturen entstehen, die von Methyltransferasen erkannt werden (BESTOR, 1987; SMITH *et al.*, 1991; CHEN *et al.*, 1995), so dass durch DRM1 oder DRM2 CG Sequenzen de novo methyliert werden könnten (CAO UND JACOBSEN, 2002a; b). Durch zufälliges Vorliegen eines 3' - methylierten C der siRNA, würde hemimethylierte DNA entstehen, die bevorzugte Ziele von Erhaltungsmethyltransferasen wie MET1 sind (PELLISSIER *et al.*, 1999; KISHIMOTO *et al.*, 2001). Methylierte CG werden anschließend von MBD erkannt werden, wodurch eine Deacetylierung (durch HDAC) und Methylierung (durch KYP) von H3K9 ermöglicht wird, in dessen Folge nicht - CG Methylierung durch DDM1 und CMT3 erfolgt und schlussendlich kondensiertes Chromatin entsteht.

Die Pflanze wäre durch den beschriebenen Mechanismus in der Lage auf das Auftreten von dsRNA im Zytoplasma, die die Replikation invasiver Nukleinsäure kennzeichnet, zu reagieren und die Gefahr genomischer Umbauten (*genome rearrangement*), die von transkribierten homologen Transposons ausgeht, zu verhindern, da durch DNA Methylierung die Excision von Transposons unterbunden wird (ROS UND KUNZE, 2001). Die Tatsache, dass Transposons meist in heterochromatischen Regionen vorliegen, die stark methyliert sind und wenig transkribiert werden (ESCOBAR UND DANDEKAR, 2003), würde mit dem Modell ebenso erklärt werden.

Die Silencing induzierte Methylierung würde demnach, wie die Silencing induzierte Resistenz, durch das Vorliegen nicht methylierter siRNAs im Zytoplasma ausgelöst werden, deren Wirkungsweise durch die Beteiligung unterschiedlicher Wirtsenzyme gesteuert wird.

Die beschriebene Korrelation der siRNAs mit der DNA Methylierung wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht experimentell erarbeitet. Erst ein Nachweis spezifischer siRNAs im Zytoplasma würde das beschriebene Modell belegen.

Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann abgeleitet werden, dass nicht jede viral abgeleitete Sequenz einen effizienten Auslöser für eine Silencing induzierte Resistenz darstellt, sondern z.B. eine Minimallänge aufweisen muss. PTGS ist Gegenstand vieler aktueller Forschungen und nahezu täglich werden neue Erkenntnisse über den Ablauf und die beteiligten Enzyme gewonnen. Die Vielzahl der beteiligten Wirtsenzyme und Enzymkomplexe zeigt, wie diffizil die Wirt - Pathogen Interaktionen sind. Erst wenn diese Zusammenhänge vollständig verstanden werden, ist es möglich das optimale Konstrukt zur Erstellung resistenter Kulturpflanzen abzuleiten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- M. Adams. Cleavage sites in the family *Potyviridae* by virus species. Part of the project on virus genome analysis done in collaboration with John Antoniow; <http://www.rothamstedd.bbsrc.ac.uk/ppi/staff/ijfa.html> using all sequences available on February 6th, 2005: Rothamsted Research, 2005.
- N. Agrawal, P. V. Dasaradhi, A. Mohammed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar, and S. K. Mukherjee. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 67 (4):657-685, 2003.
- R. Anandalakshmi, G. J. Pruss, X. Ge, R. Marathe, A. C. Mallory, T. H. Smith, and V. B. Vance. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (22):13079-13084, 1998.
- R. Anandalakshmi, R. Marathe, X. Ge, J. M. Herr, Jr., C. Mau, A. Mallory, G. Pruss, L. Bowman, and V. B. Vance. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 290 (5489):142-144, 2000.
- S. M. Angell, C. Davies, and D. C. Baulcombe. 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 (1):197-201, 1996.
- A. Appiano and S. Pennazio. Electron microscopy of potato meristem tips infected with potato virus X. *J.Gen.Virol.* 14:273-276, 1972.
- K. Arai, Y. Doi, K. Yora, and H. Asuyama. Distribution of bacilliform virus particles in Masaki mosaic disease and Cymbidium ring spot disease. *Ann.Phytopath.Soc.Japan* 35:10, 1969.
- A. Ashoub, W. Rohde, and D. Pruffer. In planta transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome. *Nucleic Acids Res.* 26 (2):420-426, 1998.
- F. F. Assaad, K. L. Tucker, and E. R. Signer. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant Mol.Biol.* 22 (6):1067-1085, 1993.
- J. G. Atabekov, N. P. Rodionova, O. V. Karpova, S. V. Kozlowsky, and V. Yu. Poljakov. The Movement Protein-Triggered in Situ Conversion of Potato Virus X Virion RNA from a Nontranslatable into a Translatable Form. *Virology* 271 (2):259-263, 2000.
- P. L. Atreya, C. D. Atreya, and T. P. Pirone. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88 (17):7887-7891, 1991.
- I. Bahner, J. Lamb, M. A. Mayo, and R. T. Hay. Expression of the genome of potato leafroll virus: readthrough of the coat protein termination codon in vivo. *J.Gen.Virol.* 71 (Pt 10):2251-2256, 1990.
- T. Balandin and C. Castresana. Silencing of a beta-1,3-glucanase transgene is overcome during seed formation. *Plant Mol.Biol.* 34 (1):125-137, 1997.
- H. Barker. Potato leafroll. edited by H. S. Chaube, U. S. Singh, A. N. Mukhopadhyay, and J. Kumar, New Jersey:Prentice Hall, p. 124-147, 1992.
- O. W. Barnett. *Potyvirus Taxonomy*, Vienna:Springer Verlag, 1992.
- D. C. Baulcombe. RNA silencing in plants. *Nature* 431 (7006):356-363, 2004.
- D. C. Baulcombe. RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol.Biol.* 32 (1-2):79-88, 1996.

- D. C. Baulcombe. RNA silencing. Diced defence. *Nature* 409 (6818):295-296, 2001.
- D. L. Beck, P. J. Guilford, D. M. Voot, M. T. Andersen, and R. L. Forster. Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. *Virology* 183 (2):695-702, 1991.
- C. Beclin, R. Berthome, J. C. Palauqui, M. Tepfer, and H. Vaucheret. Infection of tobacco or Arabidopsis plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans)genes. *Virology* 252 (2):313-317, 1998.
- A. B. R. Beemster and J. A. de Bokx. Survey of properties and symptoms. In: *Viruses of potatoes and seed potato production.*, edited by J. A. de Bokx and J. P. H. van der Want, Wageningen:Pudoc, 1987, p. 88-91.
- P. H. Berger, A. G. Hunt, L. L. Domier, G. M. Hellmann, Y. Stram, D. W. Thornbury, and T. P. Pirone. Expression in transgenic plants of a viral gene product that mediates insect transmission of potyviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:8402-8406, 1989.
- E. Bernstein, A. M. Denli, and G. J. Hannon. The rest is silence. *RNA* 7 (11):1509-1521, 2001.
- T. Bestor. Supercoiling-Dependent Sequence Specificity of Mammalian Dna Methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 15 (9):3835-3843, 1987.
- Bundesgesetzblatt (BGBL) Jahrgang 2004 Teil 1 Nr. 61, Bekanntmachung der Neufassung der Pflanzkartoffelverordnung (§5 Abs. 1, Nr. 1, 1944)
- H. C. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 (6):1513-1523, 1979.
- V. Bitko and S. Barik. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC.Microbiol.* 1:34, 2001.
- S. Blanc, E. D. Ammar, S. Garcia-Lampasona, V. V. Dolja, C. Llave, J. Baker, and T. P. Pirone. Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J.Gen.Virol.* 79 (Pt 12):3119-3122, 1998.
- B. Blanco-Urgoiti, F. Sanchez, Roman C. Perez de San, J. Dopazo, and F. Ponz. Potato virus Y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. *J.Gen.Virol.* 79 (Pt 8):2037-2042, 1998.
- J. Bode and M. Klinkowski. Einführung in die allgemeinen Probleme. In: *Pflanzliche Virologie, Vol. II, part 1: 457 pp.*, edited by M. Klinkowski, Berlin:Akademie-Verlag, 1968, p. 161.
- S. Boutet, F. Vazquez, J. Liu, C. Beclin, M. Fagard, A. Gratias, J. B. Morel, P. Crete, X. Chen, and H. Vaucheret. Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Curr.Biol.* 13 (10):843-848, 2003.
- R. H. E. Bradley and D. W. Rideout. Comparative transmission of potato virus Y by four aphid species that infest potatoes. *Can.J.Zool.* 31:333-341, 1953.
- J. Brandes. Identifizierung von gestreckten pflanzenpathogenen Viren auf morphologischer Grundlage. *Mitt.Biol.Bundesanst.Land- Forstwirtschaft* (Heft 110):5-130, 1964.
- J. D. Brantley and A. G. Hunt. The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus tobacco vein mottling virus is an RNA-binding protein. *J.Gen.Virol.* 74 (Pt 6):1157-1162, 1993.

- V. Brault, J. F. van den Heuvel, M. Verbeek, V. Ziegler-Graff, A. Reutenauer, E. Herrbach, J. C. Garaud, H. Guilley, K. Richards, and G. Jonard. Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *EMBO J.* 14 (4):650-659, 1995.
- C. J. Braun and C. L. Hemenway. Expression of Amino-Terminal Portions or Full-Length Viral Replicase Genes in Transgenic Plants Confers Resistance to Potato Virus X Infection. *Plant Cell* 4 (6):735-744, 1992.
- G. Brigneti, O. Voinnet, W. X. Li, L. H. Ji, S. W. Ding, and D. C. Baulcombe. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 17 (22):6739-6746, 1998.
- S. Brinkmann. Untersuchungen zur Geninaktivierung innerhalb einer Generationsanalyse transgener homozygoter *Vicia narbonensis* -Linien . *Dissertation* Freien Universität Berlin; Institut für Angewandte Genetik, 2003.
- L. E. Bryan. Antimicrobial drug resistance. *Academic press*:191-240, 1984.
- E. Bucher, T. Sijen, P. de Haan, R. Goldbach, and M. Prins. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J.Virol.* 77 (2):1329-1336, 2003.
- E. Bucher, R. Goldbach, and M. Prins. High Frequency Silencing of Multiple Targets Using a Single Inverted Repeat Construct. *Fourth joint meeting of dutch and german plant virologists WICC, Wageningen, March 10 and 11, 2005*, 2005.
- X. F. Cao and S. E. Jacobsen. Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 (90004):16491-16498, 2002.
- X. F. Cao and S. E. Jacobsen. Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.* 12 (13):1138-1144, 2002.
- X. S. Cao, P. Zhou, X. M. Zhang, S. F. Zhu, X. H. Zhong, Q. Xiao, B. Ding, and Y. Li. Identification of an RNA silencing suppressor from a plant double-stranded RNA virus. *J.Virol.* 79 (20):13018-13027, 2005.
- N. J. Caplen, S. Parrish, F. Imani, A. Fire, and R. A. Morgan. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (17):9742-9747, 2001.
- G. Caponigro and R. Parker. mRNA turnover in yeast promoted by the MATalpha1 instability element. *Nucleic Acids Res.* 24 (21):4304-4312, 1996.
- J. C. Carrington and W. G. Dougherty. Processing of the tobacco etch virus 49K protease requires autoproteolysis. *Virology* 160:355-362, 1987a.
- J. C. Carrington and W. G. Dougherty. Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *J.Virol.* 61:2540-2548, 1987b.
- J. C. Carrington, S. M. Cary, and W. G. Dougherty. Mutational analysis of tobacco etch virus polyprotein processing: cis and trans proteolytic activities of polyproteins containing the 49-kilodalton proteinase. *J.Virol.* 62:2313-2320, 1988.
- J. C. Carrington, S. M. Cary, T. D. Parks, and W. G. Dougherty. A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J.* 8 (2):365-370, 1989a.
- J. C. Carrington, D. D. Freed, and T. C. Sanders. Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. *J.Virol.* 63 (10):4459-4463, 1989b.

- J. C. Carrington and D. D. Freed. Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J.Virol.* 64 (4):1590-1597, 1990.
- J. C. Carrington and S. A. Whitham. Viral invasion and host defense: strategies and counter-strategies. *Curr.Opin.Plant Biol.* 1 (4):336-341, 1998a.
- J. C. Carrington, P. E. Jensen, and M. C. Schaad. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell- to-cell movement. *Plant J.* 14 (4):393-400, 1998b.
- J. C. Carrington and V. Ambros. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301 (5631):336-338, 2003.
- A. A. Caudy, M. Myers, G. J. Hannon, and S. M. Hammond. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.* 16 (19):2491-2496, 2002.
- S. W. Chan, D. Zilberman, Z. Xie, L. K. Johansen, J. C. Carrington, and S. E. Jacobsen. RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* 303 (5662):1336, 2004.
- S. Chapman, T. Kavanagh, and D. Baulcombe. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J.* 2 (4):549-557, 1992.
- J. Chelly, J. P. Concordet, J. C. Kaplan, and A. Kahn. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any celltype. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:2617-2621, 1989.
- J. Chen, W. X. Li, D. Xie, J. R. Peng, and S. W. Ding. Viral Virulence Protein Suppresses RNA Silencing-Mediated Defense but Upregulates the Role of MicroRNA in Host Gene Expression. *Plant Cell* 16 (5):1302-1313, 2004.
- X. A. Chen, S. V. S. Mariappan, P. Catasti, R. Ratliff, R. K. Moyzis, A. Laayoun, S. S. Smith, E. M. Bradbury, and G. Gupta. Hairpins Are Formed by the Single DNA Strands of the Fragile-X Triplet Repeats - Structure and Biological Implications *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (11):5199-5203, 1995.
- R. G. Christie and J. R. Edwardson. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. *Fla.Agric.Exp.Stn.Monogr.Ser.9*, 155, 1977.
- M. Chrzanowska. New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVYN) found recently in Poland. *Potato Res* 34: 179-182, 1991.
- M. Chrzanowska. Differentiation of Potato virus Y (PVY) isolates. *Phytopathol.Pol.* 8:15-20, 1994.
- M. Chu, J. J. Lopez-Moya, C. Llave-Correas, and T. P. Pirone. Two separate regions in the genome of the tobacco etch virus contain determinants of the wilting response of Tabasco pepper. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 10 (4):472-480, 1997.
- C. F. Chuang and E. M. Meyerowitz. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (9):4985-4990, 2000.
- J. M. Clark, C. M. Joyce, and G. P. Beardsley. Novel blunt-end addition reactions catalyzed by DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* 198 (1):123-127, 1987.
- J. M. Clark. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16 (20):9677-9686, 1988.
- M. F. Clark and A. N. Adams. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J.Gen.Virol.* 34 (3):475-483, 1977.
- J. Cline, J. C. Braman, and H. H. Hogrefe. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 24 (18):3546-3551, 1996.

- G. Cockerham. *Strains of potato virus X.*, Wageningen, The Netherlands:H. Veenman & Zonen, 1955. 92 pages.
- G. Cockerham. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity* 25:309-348, 1970.
- U. Commandeur and R. Martin. Investigations into the molecular biology of Potato leafroll virus by means of agroinfection. *Phytopathology* 83:1426, 1993.
- Industry and Enterprise development Committee for Trade, France, the Netherlands, and the United Kingdom. Superficial necrosis caused by virus (PTNRD). *Economic and Social Council, Item 7 of the Provisional Agenda, United Nations (Trade/WP.7/GE.6/2004/12)*, 2004.
- S. D. Cosloy and M. Oishi. The nature of the transformation process in Escherichia coli K12. *Mol.Gen.Genet.* 124 (1):1-10, 1973.
- S. N. Covey, N. S. Al-Kaff, A. Langara, and D. S. Turner. Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 385 (6619):781-782, 1997.
- S. Cronin, J. Verchot, R. Haldeman-Cahill, M. C. Schaad, and J. C. Carrington. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7 (5):549-559, 1995.
- J. H. Crowe, F. A. Hoekstra, and L. M. Crowe. Anhydrobiosis. *Annu.Rev.Physiol.* 54:579-599, 1992.
- S. S. Cruz, A. G. Roberts, D. A. M. Prior, S. Chapman, and K. J. Oparka. Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X: The role of virions. *Plant Cell* 10 (4):495-510, 1998.
- M. Czubayko. Herstellung der Thermus aquaticus DNA-Polymerase und Untersuchung ihrer dNTP-Substrataffinität. *Dissertation*, TU Braunschweig: 2000,
- C. J. D'Arcy, L. Domier, and M. A. Mayo. Family Luteoviridae. In: *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, edited by M. H. V. Van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. Carstens, M. Estes, S. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner, New York, San Diego:Academic Press., 2000, p. 775-784.
- G. F. Davenport and D. C. Baulcombe. Mutation of the GKS motif of the RNA-dependent RNA polymerase from potato virus X disables or eliminates virus replication. *J.Gen.Virol.* 78 (Pt 6):1247-1251, 1997.
- C. Davies, G. Hills, and D. C. Baulcombe. Sub-cellular localization of the 25-kDa protein encoded in the triple gene block of potato virus X. *Virology* 197 (1):166-175, 1993.
- J. Davies and D. I. Smith. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annu.Rev.Microbiol.* 32:469-518, 1978.
- J. A. de Bokx. Het toetsen van aardappelknollen op de aanwezigheid van YN virus. *Tijdschrift over Plantenziekten* 67:273-277, 1961.
- J. A. de Bokx and H. Huttinga. Potato virus Y. In: *Descriptions of plant viruses, Commonwealth Mycological Institute, Kew and Association of Applied Biologists, Wellesbourne, No. 242*, edited by B.D.Harrisin & A.F.Murant, 1981.
- P. de Haan, J. J. Gielen, M. Prins, I. G. Wijkamp, A. van Schepen, D. Peters, M. Q. van Grinsven, and R. Goldbach. Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. *Biotechnology (N.Y.)* 10 (10):1133-1137, 1992.

C. Dehio and J. Schell. Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (12):5538-5542, 1994.

A. Depicker and M. V. Montagu. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9 (3):373-382, 1997.

V. V. Dolja, R. Haldeman, N. L. Robertson, W. G. Dougherty, and J. C. Carrington. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J.* 13 (6):1482-1491, 1994.

V. V. Dolja, R. Haldeman-Cahill, A. E. Montgomery, K. A. Vandenbosch, and J. C. Carrington. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206 (2):1007-1016, 1995.

F. Dorlhac de Borne, M. Vincentz, Y. Chupeau, and H. Vaucheret. Co-suppression of nitrate reductase host genes and transgenes in transgenic tobacco plants. *Mol.Gen.Genet.* 243 (6):613-621, 1994.

W. G. Dougherty and T. D. Parks. Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology* 183 (2):449-456, 1991.

W. G. Dougherty, J. A. Lindbo, H. A. Smith, T. D. Parks, S. Swaney, and W. M. Proebsting. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 7 (5):544-552, 1994.

W. G. Dougherty and T. D. Parks. Transgenes and gene suppression: telling us something new? *Curr.Opin.Cell Biol.* 7 (3):399-405, 1995.

J. E. Duffus, G. C. Wisler, H.-Y. Liu, R. H. Li, G. W. Simone, and R. C. Hochmuth. Whitefly-transmitted tomato leaf yellowing viruses-A disease complex. *Proc.Annu.Tomato Dis.Workshop, 12th.Ohio State University, ORADC, Columbus.,* 1997.

P. Dunoyer, S. Pfeffer, C. Fritsch, O. Hemmer, O. Voinnet, and K. E. Richards. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J* 29 (5):555-567, 2002.

A. Duprat, C. Caranta, F. Revers, B. Menand, K. S. Browning, and C. Robaglia. The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J.* 32 (6):927-934, 2002.

G. D. Easton, R. H. Larson, and R. W. Hougas. Immunity to virus Y in the genus Solanum. *Res.Bull.Univ.Wisc.* 205:31, 1958.

H. A. Ebhardt, E. P. Thi, M. B. Wang, and P. J. Unrau. Extensive 3' modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102 (38):13398-13403, 2005.

K. Edwards, C. Johnstone, and C. Thompson. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19 (6):1349, 1991.

J. R. Edwardson. Some properties of the potato virus Y group. *Fla.Agric.Exp.Stn.Monogr.Ser.4,* 1974.

N. Ehrenfeld, E. Romano, C. Serrano, and P. Arce-Johnson. Replicase mediated resistance against potato leafroll virus in potato Desiree plants. *Biol.Res.* 37 (1):71-82, 2004.

S. M. Elbashir, W. Lendeckel, and T. Tuschl. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15 (2):188-200, 2001.

- T. Elmayan, S. Balzergue, F. Beon, V. Bourdon, J. Daubremet, Y. Guenet, P. Mourrain, J. C. Palauqui, S. Vernhettes, T. Vialle, K. Wostrikoff, and H. Vaucheret. Arabidopsis mutants impaired in cosuppression. *Plant Cell* 10 (10):1747-1758, 1998.
- S. Elnagar and A. F. Murant. Relations of carrot red leaf and carrot mottle viruses with their aphid vector, *Cavariella aegopodii*. *Ann.appl.Biol.* 89:237-244, 1978.
- J. J. English, E. Mueller, and D. C. Baulcombe. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8 (2):179-188, 1996.
- M. E. Escobar and A. M. Dandekar. Post-transcriptional Gene Silencing in Plants. In: *Non-Coding RNA*, edited by J. Barciszewski and V. Erdmann, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003,
- M. Fagard and H. Vaucheret. Systemic silencing signal(s). *Plant Mol.Biol.* 43 (2-3):285-293, 2000.
- L. Farinelli and P. Malnoe. Coat protein gene-mediated resistance to potato virus Y in tobacco: examination of the resistance mechanisms--is the transgenic coat protein required for protection? *Mol.Plant-Microbe Interact.* 6 (3):284-292, 1993.
- M. J. Foxe. Breeding for viral resistance: conventional methods. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98 (Suppl. 2):13-20, 1992.
- M. Frommer, L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, and C. L. Paul. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5- methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (5):1827-1831, 1992.
- M. Fuchs and D. Gonsalves. Resistance of Transgenic Hybrid Squash ZW-20 Expressing the Coat Protein Genes of Zucchini Yellow Mosaic Virus and Watermelon Mosaic Virus 2 to Mixed Infections by Both Potyviruses. *Bio/Technology* 13:1466-1473, 1995.
- M. Fuchs, J. R. McFerson, D. M. Tricoli, J. R. McMaster, R. Z. Deng, M. L. Boeshore, J. F. Reynolds, P. F. Russell, H. D. Quemada, and D. Gonsalves. Cantaloupe line CZW-30 containing coat protein genes of cucumber mosaic virus, zucchini yellow mosaic virus, and watermelon mosaic virus-2 is resistant to these three viruses in the field. *Mol.Breed.* 3 (4):279-290, 1997.
- M. Fuchs, D. M. Tricoli, K. J. Carney, M. Scheesser, J. R. McFerson, and D. Gonsalves. Comparative virus resistance and fruit yield of transgenic squash with single and multiple coat protein genes. *Plant Dis.* 82 (12):1350-1356, 1998.
- J. A. Garcia, S. Lain, M. T. Cervera, J. L. Riechmann, and M. T. Martin. Mutational analysis of plum pox potyvirus polyprotein processing by the N1a protease in *Escherichia coli*. *J.Gen.Virol.* 71 (Pt 12):2773-2779, 1990.
- J. A. Garcia, M. T. Martin, M. T. Cervera, and J. L. Riechmann. Proteolytic processing of the plum pox potyvirus polyprotein by the N1a protease at a novel cleavage site. *Virology* 188 (2):697-703, 1992.
- D. J. Garfinkel, R. B. Simpson, L. W. Ream, F. F. White, M. P. Gordon, and E. W. Nester. Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27:143-153, 1981.
- A. Garret, C. Kerlan, and D. Thomas. The intestine is a site of passage for potato leafroll virus from the gut lumen into the haemocoel in the aphid vector, *Myzus persicae* Sulz. *Arch.Virol.* 131 (3-4):377-392, 1993.
- F. E. Gildow, M. A. Mayo, G. H. Duncan, J. A. T. Woodforf, J. W. Lamb, and R. T. Hay. Aphid Acquisition and Cellular Transport of Potato leafroll virus-like Particles Lacking P5 Readthrough Protein. *Virology* 90:1153-1161, 2000.

- L. Glais, M. Tribodet, and C. Kerlan. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY(N)W and PVY(NTN) variants are single to multiple recombinants between PVY(O) and PVY(N) isolates. *Arch.Virol.* 147 (2):363-378, 2002.
- D. B. Golemboski, G. P. Lomonosoff, and M. Zaitlin. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 (16):6311-6315, 1990.
- P. Gonzáles-Jara, F. Tenllado, B. Martínez-García, F. A. Atencio, D. Barajas, M. Vargas, and J. R. Díaz-Riuz. Host-dependent differences during synergistic infection by Potyviruses with Potato virus X. *Mol.Plant Pathol.* 5:35-39, 2004.
- J. Goodwin, K. Chapman, S. Swaney, T. D. Parks, E. A. Wernsman, and W. G. Dougherty. Genetic and Biochemical Dissection of Transgenic RNA-Mediated Virus Resistance. *Plant Cell* 8 (1):95-105, 1996.
- G. Graf. Die Weltkartoffelernte 2000. *Kartoffelbau* 52:474-476, 2001.
- F. Granier, M. Durand-Tardif, F. Casse-Delbart, H. Lecoq, and C. Robaglia. Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. *J.Gen.Virol.* 74 (Pt 12):2737-2742, 1993.
- N. Grimsley. Agroinfection. *Methods Mol.Biol.* 44:325-342, 1995.
- Y. Gruenbaum, T. Naveh-Many, H. Cedar, and A. Razin. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* 292 (5826):860-862, 1981.
- R. Grumet. Genetic engineering for crop virus resistance. *Hortscience* 30:449-456, 1995.
- H. S. Guo, J. J. Lopez-Moya, and J. A. Garcia. Mitotic stability of infection-induced resistance to plum pox potyvirus associated with transgene silencing and DNA methylation. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 12 (2):103-111, 1999.
- X. Q. Guo, H. Y. Han, J. D. Zhang, and H. G. Wang. [The viral resistance of transgenic tobacco plants containing untranslatable PVYN coat protein gene]. *Shi Yan.Sheng Wu Xue.Bao.* 36 (3):176-184, 2003.
- S. Guyader and D. G. Ducray. Sequence analysis of Potato leafroll virus isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. *J.Gen.Virol.* 83 (Pt 7):1799-1807, 2002.
- N. Habili and R. H. Symons. Evolutionary Relationship Between Luteoviruses and Other RNA Plant Viruses Based on Sequence Motifs in their Putative RNA Polymerases and Nucleic Acid Helicases. *Nucleic Acids Res.* 17 (23):9543-9555, 1989.
- R. Haldeman-Cahill, J. A. Daros, and J. C. Carrington. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *J.Virol.* 72 (5):4072-4079, 1998.
- I. M. Hall, G. D. Shankaranarayana, K. I. Noma, N. Ayoub, A. Cohen, and S. I. S. Grewal. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* 297 (5590):2232-2237, 2002.
- A. Hamilton, O. Voinnet, L. Chappell, and D. Baulcombe. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21 (17):4671-4679, 2002.
- A. J. Hamilton and D. C. Baulcombe. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants *Science* 286 (5441):950-952, 1999.

- S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, and G. J. Hannon. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404 (6775):293-296, 2000.
- S. M. Hammond, S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi, and G. J. Hannon. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293 (5532):1146-1150, 2001.
- S. J. Han, H. S. Cho, J. S. You, Y. W. Nam, E. K. Park, J. S. Shin, Y. I. Park, W. M. Park, and K. H. Paek. Gene silencing-mediated resistance in transgenic tobacco plants carrying potato virus Y coat protein gene. *Molecules and Cells* 9 (4):376-383, 1999.
- D. Hanahan. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* 166 (4):557-580, 1983.
- V. Hari, A. Siegel, C. Rozek, and W. E. Timberlake. The RNA of tobacco etch virus contains poly(A). *Virology* 92 (2):568-571, 1979.
- B. D. Harrison. Potato leafroll virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* 291., 1984.
- A. Hassairi, K. Masmoudi, J. Albouy, C. Robaglia, M. Jullien, and R. Ellouz. Transformation of Two Potato Cultivars "Spunta" and "Claustar" (*Solanum tuberosum*) with Lettuce Mosaic Virus Coat Protein Gene and Heterologous Immunity to Potato Virus Y. *Plant Sci.* 136:31-42, 1998.
- G.A. Helson. and D. O. Norris. *J.Count.Scient.Ind.Res.Aust.* 16:261, 1943.
- J. G. Herman, J. R. Graff, S. Myohanen, B. D. Nelkin, and S. B. Baylin. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 (18):9821-9826, 1996.
- A. J. Herr, M. B. Jensen, T. Dalmay, and D. C. Baulcombe. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308 (5718):118-120, 2005.
- D. G. Higgins and P. M. Sharp. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73 (1):237-244, 1988.
- C. Humber, P. Dunoyer, G. Moissiard, C. Ritzenthaler, and O. Voinnet. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.* 22 (17):4523-4533, 2003.
- A. Hoekema, P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykaas, and R. A. Schilpoort. A binary plantvector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303:179-180, 1983.
- S. A. Hogenhout, Wilk F. van der, M. Verbeek, R. W. Goldbach, and J. F. van den Heuvel. Potato leafroll virus binds to the equatorial domain of the aphid endosymbiotic GroEL homolog. *J.Virol.* 72 (1):358-365, 1998.
- T. Hohn, S. Corsten, S. Rieke, M. Muller, and H. Rothnie. Methylation of coding region alone inhibits gene expression in plant protoplasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 (16):8334-8339, 1996.
- Y. Hong, K. Levay, J. F. Murphy, P. G. Klein, J. G. Shaw, and A. G. Hunt. A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. *Virology* 214 (1):159-166, 1995.
- Y. Hong and A. G. Hunt. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 226 (1):146-151, 1996.
- R. B. Horsch, J. E. Fry, N. L. Hoffman, D. Eichholtz, S. G. Rogers, and R. T. Fraley. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231, 1985.

R. D. Hotchkiss. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* 168:315-332, 1948.

M. J. Huisman, H. J. M. Linthorst, J. F. Bol, and B. J. C. Cornelissen. The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologues at the amino acid level with various plus-stranded RNA-viruses. *J. Gen. Virol.* 69:1789-1798, 1988.

I. Ingelbrecht, H. Van Houdt, M. Van Montagu, and A. Depicker. Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91 (22):10502-10506, 1994.

A. Ishizuka, M. C. Siomi, and H. Siomi. A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev.* 16 (19):2497-2508, 2002.

F. J. Jan, C. Fagoaga, S. Z. Pang, and D. Gonsalves. A minimum length of N gene sequence in transgenic plants is required for RNA-mediated tospovirus resistance. *J. Gen. Virol.* 81 (Pt 1):235-242, 2000a.

F. J. Jan, C. Fagoaga, S. Z. Pang, and D. Gonsalves. A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. *J. Gen. Virol.* 81 (Pt 8):2103-2109, 2000b.

C. E. Jenner, X. Wang, K. Tomimura, K. Ohshima, F. Ponz, and J. A. Walsh. The dual role of the potyvirus P3 protein of Turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16 (9):777-784, 2003.

A. L. Jones, C. L. Thomas, and A. J. Maule. De novo methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *EMBO J.* 17 (21):6385-6393, 1998.

A. L. Jones, A. J. Hamilton, O. Voinnet, C. L. Thomas, A. J. Maule, and D. C. Baulcombe. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 11 (12):2291-2302, 1999.

L. Jones, F. Ratcliff, and D. F. Baulcombe. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr. Biol.* 11 (10):747-757, 2001.

R. A. C. Jones. Strain Group-Specific and Virus Specific Hypersensitive Reactions to Infection with Potyviruses in Potato Cultivars. *Ann. App. Biol.* 117 (1):93-105, 1990.

K. Kalantidis, S. Psaradakis, M. Tabler, and M. Tsagris. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15 (8):826-833, 2002.

W. Kaniewski, C. Lawson, B. Sammons, L. Haley, J. Hart, X. Delannay, and N. E. Tumer. Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y. *Bio/Technology* 8:750-754, 1990.

K. D. Kasschau, S. Cronin, and J. C. Carrington. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228 (2):251-262, 1997.

K. D. Kasschau and J. C. Carrington. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95 (4):461-470, 1998.

K. D. Kasschau, Z. Xie, E. Allen, C. Llave, E. J. Chapman, K. A. Krizan, and J. C. Carrington. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell* 4 (2):205-217, 2003.

- L. Katul. Serologische und molekularbiologische Charakterisierung des Beanleafroll virus (BLRV) und des Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV). *Dissertation*, Fachbereich Agrarwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen., 1992.
- T. Kavanagh, M. Goulden, Cruz S. Santa, S. Chapman, I. Barker, and D. Baulcombe. Molecular analysis of a resistance-breaking strain of potato virus X. *Virology* 189 (2):609-617, 1992.
- L. M. Kawchuk, R. R. Martin, D. M. Rochon, and J. McPherson. Identification and characterization of the potato leafroll virus putative coat protein gene. *J.Gen.Virol.* 70 (Pt 3):783-788, 1989.
- F. Kempken and R. Kempken. Herstellung, Nachweis und Stabilität von transgenen Pflanzen. In: *Gentechnik bei Pflanzen*, Berlin Heidelberg:Springer-Verlag, 2000, p. 75-113.
- J. S. Kennedy, M. F. Day, and V. F. Eastop. A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses. *Comm.Inst.Ent., London*:114, 1962.
- C. Kerlan, L. Glais, and M. Guillet. Variability of Potato Virus Y in Potato Crops in France. *J.Phytopathol.* 147:643-651, 1999.
- K. H. Kim and C. Hemenway. The 5' nontranslated region of potato virus X RNA affects both genomic and subgenomic RNA synthesis. *J.Virol.* 70 (8):5533-5540, 1996.
- K. H. Kim and C. L. Hemenway. Long-distance RNA-RNA interactions and conserved sequence elements affect potato virus X plus-strand RNA accumulation. *RNA.* 5 (5):636-645, 1999.
- N. Kishimoto, H. Sakai, J. Jackson, S. E. Jacobsen, E. M. Meyerowitz, E. S. Dennis, and E. J. Finnegan. Site specificity of the Arabidopsis MET1 DNA methyltransferase demonstrated through hypermethylation of the superman locus. *Plant Mol.Biol.* 46 (2):171-183, 2001.
- P. G. Klein, R. R. Klein, E. Rodriguez-Cerezo, A. G. Hunt, and J. G. Shaw. Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204 (2):759-769, 1994.
- M. Klinkowski and H. A. Uschdraweit. Die Virose des europäischen Raumes. In: *Pflanzliche Virologie, Vol. II, part 2: 460 pp.*, edited by M. Klinkowski, Berlin:Akademie-Verlag, 1968, p. 1.
- S. W. Knight and B. L. Bass. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293 (5538):2269-2271, 2001.
- M. Kojima, E. Shikata, M. Sugawara, and D. Murayama. Purification of potato leaf roll virus. *Virology* 39:162-165, 1969.
- K. Kosaki, M. J. McGinniss, A. N. Veraksa, W. J. McGinnis, and K. L. Jones. Prader-Willi and Angelman syndromes: Diagnosis with a bisulfite-treated methylation-specific PCR method. *Am.J.Med.Genet.* 73 (3):308-313, 1997.
- M. Kozak. The scanning model for translation: an update. *J.Cell.Biol.* 108 (2):229-241, 1989.
- J. F. Kreuze, E. I. Savenkov, W. Cuellar, X. D. Li, and J. P. T. Valkonen. Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *J.Virol.* 79 (11):7227-7238, 2005.
- K. Kubota, S. Tsuda, A. Tamai, and T. Meshi. Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J.Virol.* 77 (20):11016-11026, 2003.
- A. B. Kujawa, G. Dugeon, D. Hulanicka, and A. L. Haenni. Structural requirements for efficient translational frameshifting in the synthesis of the putative viral RNA-dependent RNA polymerase of potato leafroll virus. *Nucleic Acids Res.* 21 (9):2165-2171, 1993.

- M. Kus. The epidemic of the tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY^{NTN}) and its effect on potato crops in Slovenia. *Proceedings of the 9th EARP Virology Meeting Bled.*:159-160, 1995.
- U. K. Laemmli. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227 (5259):680-685, 1970.
- J. Landsmann, D. Llewellyn, E. S. Dennis, and W. J. Peacock. Organ regulated expression of the *Parasponia andersonii* haemoglobin gene in transgenic tobacco plants. *Mol.Gen.Genet.* 214:68-73, 1988.
- J. Landsmann. Kartoffelvirose. *Mitt.Biol.Bundesanst.Land- Forstwirtschaft* 373:62-64, 2000.
- C. Lawson, W. Kaniewski, L. Haley, R. Rozman, C. Newell, P. Sanders, and N. E. Tumer. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Biotechnology (N.Y.)* 8 (2):127-134, 1990.
- M. Le Romancer and C. M. Nedellec. Biological characterization of various geographical isolates of Potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathol.* 43:138-144, 1994.
- L. Lee, P. Palukaitis, and S. M. Gray. Host-dependent requirement for the Potato leafroll virus 17-kDa protein in virus movement *Mol.Plant-Microbe Interact.* 15 (10):1086-1094, 2002.
- D.-E. Lesemann. Recent aspects of the use of Cytopathology in virus detection. *Acta Hort.* 234:289-298, 1988.
- D.-E. Lesemann. Cytopathology. In: *The Plant Viruses; The Filamentous Plant Viruses.*, edited by R. G. Milne, New York, London:Plenum Press, 1988, p. 179-235.
- C. Levis and S. Astier-Manificier. The 5' untranslated region of PVY RNA, even located in an internal position, enables initiation of translation. *Virus Genes* 7 (4):367-379, 1993.
- H. W. Li, W. X. Li, and S. W. Ding. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296 (5571):1319-1321, 2002.
- W. X. Li and S. W. Ding. Viral suppressors of RNA silencing. *Curr.Opin.Biotechnol.* 12 (2):150-154, 2001.
- N. S. Lin, Y. H. Hsu, and H. T. Hsu. Immunobiological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80:824-828, 1990.
- J. A. Lindbo and W. G. Dougherty. 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 (2):725-733, 1992.
- J. A. Lindbo, L. Silva-Rosales, W. M. Proebsting, and W. G. Dougherty. Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *Plant Cell* 5 (12):1749-1759, 1993.
- K. Litiere, G. J. van Eldik, J. J. Jacobs, M. Van Montagu, and M. Cornelissen. Posttranscriptional gene silencing of *gn1* in tobacco triggers accumulation of truncated *gn1*-derived RNA species. *RNA* 5 (10):1364-1373, 1999.
- C. Llave, K. D. Kasschau, and J. C. Carrington. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (24):13401-13406, 2000.

- C. Llave, K. D. Kasschau, M. A. Rector, and J. C. Carrington. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14 (7):1605-1619, 2002.
- G. P. Lomonosoff. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu.Rev.Phytopathol.* 33:323-343, 1995.
- M. Longstaff, G. Brigneti, F. Boccard, S. Chapman, and D. Baulcombe. Extreme resistance to potato virus X infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase. *EMBO J.* 12 (2):379-386, 1993.
- T. J. Lough, K. Shash, B. Xoconostle-Cazáres, K. R. Hofstra, L. B. Beck, E. Balmori, R. L. S. Forster, and W. J. Lucas. Molecular Dissection of the Mechanism by Which Potexvirus Triple Gene Block Proteins Mediate Cell-to-Cell Transport of Infectious RNA. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 11 (8):801-814, 1998.
- T. J. Lough, N. E. Netzler, S. J. Emerson, P. Sutherland, F. Carr, D. L. Beck, W. J. Lucas, and R. L. Forster. Cell-to-cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 13 (9):962-974, 2000.
- A. P. Lucy, H. S. Guo, W. X. Li, and S. W. Ding. Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.* 19 (7):1672-1680, 2000.
- S. Mahajan, V. V. Dolja, and J. C. Carrington. Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. *J.Virol.* 70 (7):4370-4379, 1996.
- I. G. Maia, A. Haenni, and F. Bernardi. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J.Gen.Virol.* 77 (Pt 7):1335-1341, 1996.
- T. Mäki-Valkama, J. P. Valkonen, J. F. Kreuze, and E. Pehu. Transgenic resistance to PVY(O) associated with post-transcriptional silencing of P1 transgene is overcome by PVY(N) strains that carry highly homologous P1 sequences and recover transgene expression at infection. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 13 (4):366-373, 2000.
- A. C. Mallory, L. Ely, T. H. Smith, R. Marathe, R. Anandalakshmi, M. Fagard, H. Vaucheret, G. Pruss, L. Bowman, and V. B. Vance. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 13 (3):571-583, 2001.
- A. C. Mallory, B. J. Reinhart, D. Bartel, V. B. Vance, and L. H. Bowman. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and microRNAs in tobacco. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 (23):15228-15233, 2002.
- R. Marathe, R. Anandalakshmi, T. H. Smith, G. J. Pruss, and V. B. Vance. RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol.Biol.* 43 (2-3):295-306, 2000.
- D. Marchuk, M. Drumm, A. Saulino, and F. S. Collins. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 19:1156, 1990.
- R. E. F. Matthews. Classification and nomenclature of viruses. Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 17:140-141, 1982.
- M. A. Matzke, A. J. Matzke, and J. M. Kooter. RNA: guiding gene silencing. *Science* 293 (5532):1080-1083, 2001.
- M. A. Matzke and A. J. M. Matzke. Planting the Seeds of a New Paradigm. *PLoS Biology* 2 (5):e133, 2004.

G. Mavankal and R. E. Rhoads. In vitro cleavage at or near the N-terminus of the helper component protein in the tobacco vein mottling virus polyprotein. *Virology* 185 (2):721-731, 1991.

M. S. May and S. Hattmann. Analysis of bacteriophage deoxyribonucleic acid sequences methylated by host- and R-factor-controlled enzymes. *J.Bacteriol.* 123:768-770, 1975.

R. Mayerhofer, Z. Koncz-Kalman, C. Nawrath, G. Bakkeren, A. Crameri, K. Angelis, G. P. Redei, J. Schell, B. Hohn, and C. Koncz. T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO J.* 10:697-704, 1991.

M. A. Mayo, H. Barker, D. J. Robinson, T. Tamada, and B. D. Harrison. Evidence that potato leafroll virus RNA is positive-stranded, is linked to a small protein and does not contain polyadenylate. *J.Gen.Virol.* 59:163-167, 1982.

M. A. Mayo, D. J. Robinson, C. A. Jolly, and L. Hyman. Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA. *J.Gen.Virol.* 70 (Pt 5):1037-1051, 1989.

M. A. Mayo and V. Ziegler-Graff. Molecular biology of luteoviruses. *Adv.Virus Res.* 46:413-460, 1996.

M. A. Mayo and W. A. Miller. The Structure and Expression of Luteovirus Genomes. In: *The Luteoviridae*, edited by H. G. Smith and H. Barker, New York: Cabi Publishing, 1999, p. 23-42.

J. G. McDonald and R. P. Singh. Response of potato cultivars to North American isolates of PVY^{NTN}. *American Potato Journal* 73:317-323, 1996.

M. W. McDonnell, M. N. Simon, and F. W. Studier. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J.Mol.Biol.* 110:119-146, 1977.

A. Merits, D. Guo, and M. Saarma. VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *J.Gen.Virol.* 79 (Pt 12):3123-3127, 1998.

A. Merits, M. L. Rajamaki, P. Lindholm, P. Runeberg-Roos, T. Kekkarainen, P. Puustinen, K. Makelainen, J. P. Valkonen, and M. Saarma. Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J.Gen.Virol.* 83 (Pt 5):1211-1221, 2002.

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

M. F. Mette, A. J. Matzke, and M. A. Matzke. Resistance of RNA-mediated TGS to HC-Pro, a viral suppressor of PTGS, suggests alternative pathways for dsRNA processing. *Curr.Biol.* 11 (14):1119-1123, 2001.

M. Metzloff, M. O'Dell, P. D. Cluster, and R. B. Flavell. RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia. *Cell* 88 (6):845-854, 1997.

P. Meyer and I. Heidmann. Epigenetic variants of a transgenic petunia line show hypermethylation in transgene DNA: an indication for specific recognition of foreign DNA in transgenic plants. *Mol.Gen.Genet.* 243 (4):390-399, 1994.

E. D. Miller, C. A. Plante, K. H. Kim, J. W. Brown, and C. Hemenway. Stem-loop structure in the 5' region of potato virus X genome required for plus-strand RNA accumulation. *J.Mol.Biol.* 284 (3):591-608, 1998.

W. A. Miller, S. P. Dinesh-Kumar, and C. P. Paul. Luteovirus Gene Expression. *Crit.Rev.Plant Sci.* 14:179-211, 1995.

- A. Missiou, K. Kalantidis, A. Boutla, S. Tzortzakaki, M. Tabler, and M. Tsagris. Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Mol.Breed.* 14 (2):185-197, 2004.
- N. Mitter, M. W. Graham and R. G. Dietzgen Emy. Suppression of gene silencing: a threat to virus-resistant transgenic plants? *Trends Plant Sci.* 6 (6):246-247, 2001.
- N. Mitter, E. Sulistyowati, and R. G. Dietzgen. Cucumber mosaic virus infection transiently breaks dsRNA-induced transgenic immunity to Potato virus Y in tobacco. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 16 (10):936-944, 2003.
- A. Moreira, R. A. C. Jones, and C. E. Fribourg. Properties of a resistance-breaking strain of potato virus X. *Ann.appl.Biol.* 95:93-103, 1980.
- S. I. Morozov, L. I. Lukasheva, B. K. Chernov, K. G. Skriabin, and I. G. Atabekov. [Primary structure of the potato virus X genome: the region preceding the capsid protein cistron]. *Mol.Gen.Mikrobiol.Virusol.* (3):32-38, 1987.
- S. Y. Morozov, V. G. Gorbulev, V. K. Novikov, A. A. Agranovskii, Y. V. Kozlov, I. G. Atabekov, and A. A. Baev. The primary structure of 5'- and 3' terminal regions of potato virus X genomic RNA. *Proc.Acak.Nauk.SSSR* 259:723-725, 1981.
- S. Y. Morozov, N. A. Miroshnichenko, A. G. Solovyev, O. N. Fedorkin, D. A. Zelenina, L. I. Lukasheva, A. V. Karasev, V. V. Dolja, and J. G. Atabekov. Expression strategy of the potato virus X triple gene block. *J.Gen.Virol.* 72 (Pt 8):2039-2042, 1991.
- S. Y. Morozov, A. G. Solovyev, N. O. Kalinina, O. N. Fedorkin, O. V. Samuilova, J. Schiemann, and J. G. Atabekov. Evidence for two nonoverlapping functional domains in the potato virus X 25K movement protein. *Virology* 260 (1):55-63, 1999.
- P. Mourrain, C. Beclin, T. Elmayan, F. Feuerbach, C. Godon, J. B. Morel, D. Jouette, A. M. Lacombe, S. Nikić, N. Picault, K. Remoue, M. Sanial, T. A. Vo, and H. Vaucheret. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101 (5):533-542, 2000.
- E. Mueller, J. Gilbert, G. Davenport, G. Brigneti, and D. C. Baulcombe. Homology-dependent resistance: Transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant J.* 7:1001-1013, 1995.
- K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 51 Pt 1:263-273, 1986.
- J. Murfett, X. J. Wang, G. Hagen, and T. J. Guilfoyle. Identification of Arabidopsis histone deacetylase HDA6 mutants that affect transgene expression. *Plant Cell* 13 (5):1047-1061, 2001.
- J. F. Murphy, R. E. Rhoads, A. G. Hunt, and J. G. Shaw. The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24-kDa part of the proteinase. *Virology* 178 (1):285-288, 1990.
- J. F. Murphy, W. Rychlik, R. E. Rhoads, A. G. Hunt, and J. G. Shaw. A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links the VPg to the viral RNA. *J.Virol.* 65 (1):511-513, 1991.
- J. F. Murphy, P. G. Klein, A. G. Hunt, and J. G. Shaw. Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology* 220 (2):535-538, 1996.
- M. W. Muskens, A. P. Vissers, J. N. Mol, and J. M. Kooter. Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol.Biol.* 43 (2-3):243-260, 2000.

C. Mühlhardt. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. Heidelberg - Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.

J. J. Natti, H. C. Kirkpatrick, and A. F. Ross. Host range of potato leafroll virus. *Am. Potato J.* 30:55-64, 1953.

A. C. Neves-Borges, W. M. Collares, J. A. Pontes, P. Breyne, L. Farinelli, and D. E. de Oliveira. Coat protein RNAs-mediated protection against Andean potato mottle virus in transgenic tobacco. *Plant Sci.* 160 (4):699-712, 2001.

A. W. Nicholson. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23 (3):371-390, 1999.

X. Nie and R. P. Singh. Evolution of North American PVY(NTN) strain Tu 660 from local PVY(N) by mutation rather than recombination. *Virus Genes* 26 (1):39-47, 2003.

F. Nienhaus and B. Stille. Obertragung des Kartoffel-X-Virus durch Zoosporen von *Synchytrium endobioticum*. *Phytopath. Z.* 54:335, 1965.

K. M. Nurkiyanova, E. V. Ryabov, U. Commandeur, G. H. Duncan, T. Canto, S. M. Gray, M. A. Mayo, and M. E. Taliany. Tagging potato leafroll virus with the jellyfish green fluorescent protein gene. *J. Gen. Virol.* 81 (Pt 3):617-626, 2000.

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

Y. Onodera, J. R. Haag, T. Ream, P. C. Nunes, O. Pontes, and C. S. Pikaard. Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* 120 (5):613-622, 2005.

K. J. Oparka, A. G. Roberts, I. M. Roberts, D. A. M. Prior, and S. Santa Cruz. Viral coat protein is targeted to, but does not gate, plasmodesmata during cell-to-cell movement of potato virus X. *Plant J.* 10:805-813, 1996.

I. Oruetebarria and J. P. Valkonen. Analysis of the P1 gene sequences and the 3'-terminal sequences and secondary structures of the single-stranded RNA genome of Potato virus V. *Virus Genes* 22 (3):335-343, 2001.

J. C. Palauqui, T. Elmayan, J. M. Pollien, and H. Vaucheret. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* 16 (15):4738-4745, 1997.

A. Palucha, W. Zagorski, M. Chrzanowska, and D. Hulanicka. An antisense coat protein gene confers immunity to potato leafroll virus in a genetically engineered potato. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:287-293, 1998.

S. Z. Pang, J. L. Slightom, and D. Gonsalves. Different mechanisms protect transgenic tobacco against tomato spotted wilt and impatiens necrotic spot tospoviruses. *Biotechnology (N Y)* 11 (7):819-824, 1993.

S. Z. Pang, F. J. Jan, K. Carney, J. Stout, D. M. Tricoli, H. D. Quemada, and D. Gonsalves. Post-transcriptional transgene silencing and consequent tospovirus resistance in transgenic lettuce are affected by transgene dosage and plant development. *Plant J.* 9 (6):899-909, 1996.

S. Z. Pang, F. J. Jan, and D. Gonsalves. Nontarget DNA sequences reduce the transgene length necessary for RNA-mediated tospovirus resistance in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94 (15):8261-8266, 1997.

S. Z. Pang, F. J. Jan, D. M. Tricoli, P. Sanders, K. J. Carney, J. S. Hu, M. Fuchs, H. D. Quemada, and D. Gonsalves. Resistance to squash mosaic comovirus in transgenic squash plants expressing its coat protein genes. *Mol. Breed.* 6 (1):87-93, 2000.

- T. Pehu. Characterization of the P1 gene expression of potato virus Y. *Ph.D.Thesis* Department of Plant Production, University of Helsinki, 63 p, 1995.
- T. Pelissier, S. Thalmeir, D. Kempe, H. L. Sanger, and M. Wassenegger. Heavy de novo methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 27 (7):1625-1634, 1999.
- T. Pelissier and M. Wassenegger. A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. *RNA.* 6 (1):55-65, 2000.
- D. Peters. The purification of potato leafroll virus from its vector *Myzus persicae*. *Virology* 31:46-54, 1967.
- S. Pfeffer, P. Dunoyer, F. Heim, K. E. Richards, G. Jonard, and V. Ziegler-Graff. P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J.Virol.* 76 (13):6815-6824, 2002.
- T. P. Pirone and K. F. Harris. Nonpersistent transmission of plant viruses by aphids. *Annu.Rev.Phytopathol* 15:55-73, 1977.
- F. G. Pluthero. Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 21 (20):4850-4851, 1993.
- H. Potter, L. Weir, and P Leder. Enhancer-dependent expression of human kappa-immunglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81:7161-7165, 1984.
- H. Potter. Electroporation in biology: methods, application and instrumentation. *Anal.Biochem.* 174:361-373, 1988.
- P. Powell-Abel, R. S. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S. G. Rogers, R. T. Fraley, and R. N. Beachy. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743, 1986.
- C. R. Pringle. Virus Taxonomy - 1999. *Arch. Virol.* 144 (2):421-429, 1999.
- M. Prins, P. de Haan, R. Luyten, M. Van Veller, M. Q. van Grinsven, and R. Goldbach. Broad resistance to tospoviruses in transgenic tobacco plants expressing threotospoviral nucleoprotein gene sequences. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 8 (1):85-91, 1995.
- M. Prins, M. Kikkert, C. Ismayadi, W. de Graauw, P. de Haan, and R. Goldbach. Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants expressing NSM gene sequences. *Plant Mol.Biol.* 33 (2):235-243, 1997.
- G. N. Proctor and R. H. Rownd. Rosanilins: indicator dyes for chloramphenicol-resistant enterobacteria containing chloramphenicol acetyltransferase. *J. Bacteriol.* 150 (3):1375-1382, 1982.
- P. Provost, D. Dishart, J. Doucet, D. Frendewey, B. Samuelsson, and O. Radmark. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J.* 21 (21):5864-5874, 2002.
- F. Pröls and P. Meyer. The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrida*. *Plant J.* 2 (4):465-475, 1992.
- D. Prüfer, E. Tacke, J. Schmitz, B. Kull, A. Kaufmann, and W. Rohde. Ribosomal frameshifting in plants: a novel signal directs the -1 frameshift in the synthesis of the putative viral replicase of potato leafroll luteovirus. *EMBO J.* 11 (3):1111-1117, 1992.

D. Prüfer, L. Kawchuk, M. Monecke, S. Nowok, R. Fischer, and W. Rohe. Immunological analysis of potato leafroll luteovirus (PLRV) P1 expression identifies a 25 kDa RNA-binding protein derived via P1 processing. *Nucleic Acids Res.* 27 (2):421-425, 1999.

G. Pruss, X. Ge, X. M. Shi, J. C. Carrington, and Vance Bowman, V. Plant viral synergism: the potyvirus genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9 (6):859-868, 1997.

D. E. Purcifull and J. R. Edwardson. Potexviruses. In: *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, edited by E. Kurstak, Amsterdam:Elsevier/North-Holland, 1981, p. 628.

P. Puustinen and K. Mäkinen. Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase NIb correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J.Biol.Chem.* 279 (37):38103-38110, 2004.

F. Qu, T. Ren, and T. J. Morris. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J.Virol.* 77 (1):511-522, 2003.

Q. Que, H.-Y. Wang, J. J. English, and R. A. Jorgensen. The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. *Plant Cell* 9 (8):1357-1368, 1997.

B. Raccach and S. Blanc. Potyviruses. In: *Virus-Insect-Plant Interactions*, edited by K. F. Harris, O. P. Smith, and J. E. Duffus, London:Academic Press, 2001, p. 181-206.

A. M. Raizis, F. Schmitt, and J. P. Jost. A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. *Anal.Biochem.* 226 (1):161-166, 1995.

M. L. Rajamaki and J. P. Valkonen. The 6K2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicandra physaloides*. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 12 (12):1074-1081, 1999.

F. G. Ratcliff, S. A. MacFarlane, and D. C. Baulcombe. Gene Silencing without DNA: RNA-Mediated Cross-Protection between Viruses. *Plant Cell* 11 (7):1207-1216, 1999.

J. C. Reed, K. D. Kasschau, A. I. Prokhnovsky, K. Gopinath, G. P. Pogue, J. C. Carrington, and V. V. Dolja. Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellows virus. *Virology* 306 (2):203-209, 2003.

J. Rek. Untersuchungen über die Eignung des ELISA- Verfahrens zum serienmässigen Nachweis von Viren (PLRV und PVY) bei der Kartoffel unter Berücksichtigung des Infektionszeitpunktes der Pflanzen und des physiologischen Zustandes der Knolle. *Doktors der Technischen Wissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich*.:37-41, 1987.

F. Revers, O. Le Gall, T. Candresse, and A. J. Maule. New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 12 (5):367-376, 1999.

J. L. Riechmann, S. Lain, and J. A. Garcia. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J.Gen.Virol.* 73 (Pt 1):1-16, 1992.

J. L. Riechmann, M. T. Cervera, and J. A. Garcia. Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *J.Gen.Virol.* 76 (Pt 4):951-956, 1995.

Y. Robert and O. Lemaire. Epidemiology and control strategies. In: *The Luteoviridae*, edited by H. G. Smith and H. Baker, Wallingford:CABI, 1999, p. 211-279.

W. F. Rochow. Variation within and among aphid vectors of plantviruses. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 105:713-729, 1963.

- F. Ros and R. Kunze. Regulation of Activator/Dissociation Transposition by Replication and DNA Methylation. *Genetics* 157 (4):1723-1733, 2001.
- M. T. Ruiz, O. Voinnet, and D. C. Baulcombe. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10 (6):937-946, 1998.
- W. Rychlik and R. E. Rhoads. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 17:8543-8551, 1989.
- E. Sadowy, A. Maasen, M. Juszczuk, C. David, W. Zagorski-Ostojka, B. Gronenborn, and M. D. Hulanicka. The ORFO product of Potato leafroll virus is indispensable for virus accumulation. *J.Gen. Virol.* 82 (Pt 6):1529-1532, 2001.
- E. Sadowy, M. Juszczuk, C. David, B. Gronenborn, and M. D. Hulanicka. Mutational analysis of the proteinase function of Potato leafroll virus. *J.Gen. Virol.* 82 (Pt 6):1517-1527, 2001.
- P. Saenz, M. T. Cervera, S. Dallot, L. Quiot, J. B. Quiot, J. L. Riechmann, and J. A. Garcia. Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K(1). *J.Gen. Virol.* 81 (Pt 3):557-566, 2000.
- R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839):487-491, 1988.
- R. N. Salaman. History and Early Influence of the Potato. Cambridge, England:Cambridge University Press, 1970,
- L. F. Salazar. Potato viruses after the XXth Century:Effects, Dissemination and their control. *Seminar transcript: Appendix B* Crop Protection Department, CIP, P.O. Box 1558 Lima 12, Peru, 2003.
- J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, NY*, 1989.
- J. C. Sanford and S. A. Johnston. The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J.Theor.Biol.* 113:395-405, 1985.
- F. Sanger, G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, C. A. Fiddes, P. M. Slocombe, and M. Smith. Nuclotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265 (5596):687-695, 1977.
- E. I. Savenkov and J. P. T. Valkonen. Coat protein gene-mediated resistance to Potato virus A in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *J.Gen. Virol.* 82 (9):2275-2278, 2001.
- E. I. Savenkov and J. P. Valkonen. Silencing of a viral RNA silencing suppressor in transgenic plants. *J.Gen. Virol.* 83 (Pt 9):2325-2335, 2002.
- M. C. Schaad, R. Haldeman-Cahill, S. Cronin, and J. C. Carrington. Analysis of the VPg-proteinase (Nla) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J. Virol.* 70 (10):7039-7048, 1996.
- M. C. Schaad, A. D. Lellis, and J. C. Carrington. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J. Virol.* 71 (11):8624-8631, 1997.
- H. Schagger and G. von Jagow. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in a range from 1 to 100 kDa. *Anal.Biochem.* 166:368-379, 1987.

O. M. Scheid, J. Paszkowski, and I. Potrykus. Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol.Gen.Genet.* 228 (1-2):104-112, 1991.

A. Schepers, P. Harrewijn, and C. B. Bus. Non-insecticidal treatments to reduce aphid development and infection with stylet-borne virus diseases in seed potatoes. In: *Abstracts of Conference Papers of the 9th Triennial Conference European Association for Potato Research*. Interlaken: 1984, p. 204-206.

W. Schiebel, B. Haas, S. Marinkovic, A. Klanner, and H. L. Sanger. RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. II. Catalytic in vitro properties. *J.Biol.Chem.* 268 (16):11858-11867, 1993.

J. Schmitz, C. Stussi-Garaud, E. Tacke, D. Prüfer, W. Rohde, and O. Rohrfritsch. In situ localisation of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* 235:311-322, 1997.

H. Schmutterer. Zur Kenntnis der Beißinsekten als Überträger pflanzlicher Viren (Teil I u. II). *Z.angew.Entomol.* 47:277-301-416-439, 1960.

J. Schubert, J. Matousek, and D. Mattern. Pathogen-derived resistance in potato to Potato virus Y-aspects of stability and biosafety under field conditions. *Virus Res.* 100 (1):41-50, 2004.

W. Schuchert, W. Rohde, and E. Peerenboom. Die virusresistente Kartoffel. *MPIZ aktuell* (02):1-4, 1996.

E. U. Selker. Gene silencing: repeats that count. *Cell* 97 (2):157-160, 1999.

P. Seppänen, R. Puska, J. Honkanen, L. G. Tyulkina, O. Fedorkin, S. Y. Morozov, and J. G. Atabekov. Movement protein-derived resistance to triple gene block-containing plant viruses. *J.Gen.Virol.* 78 (Pt 6):1241-1246, 1997.

M. Shahabuddin, J. G. Shaw, and R. E. Rhoads. Mapping of the tobacco vein mottling virus VPg cistron. *Virology* 163 (2):635-637, 1988.

X. M. Shi, H. Miller, J. Verchot, J. C. Carrington, and V. B. Vance. Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. *Virology* 231 (1):35-42, 1997.

J. M. Short, J. M. Fernandez, J. A. Sorge, and W. D. Huse. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16 (15):7583-7600, 1988.

D. D. Shukla, C. W. Ward, and A. A. Brunt. Genome structure, variation and function. In: *The Potyviridae*. CAB Int., Wallingford, UK.:74-110, 1994.

M. F. E. Siaw, M. Shahabuddin, S. Ballard, J. G. Shaw, and R. E. Rhoads. Identification of a protein covalently linked to the 5' -terminus of tobacco vein mottling virus RNA. *Virology* 142:134-143, 1985.

T. Sijen, J. Wellink, J. B. Hiriart, and A. vanKammen. RNA-mediated virus resistance: Role of repeated transgenes and delineation of targeted regions. *Plant Cell* 8 (12):2277-2294, 1996.

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

R. P. Singh, M. Singh, and J. G. McDonald. Screening by a 3-primer PCR of North American PVYN isolates for European-type members of the tuber necrosis-inducing PVYNTN subgroup. *Can.J.Plant Pathol.* 20:227-233, 1998.

- K. G. Skryabin, S. Yu. Morozov, A. S. Kraev, M. V. Rozanov, B. K. Chernov, L. I. Lukasheva, and J. G. Atabekov. Conserved and variable elements in RNA genomes of potexviruses. *FEBS Lett.* 240:33-40, 1988.
- K. G. Skryabin, A. S. Kraev, S. Yu. Morozov, M. N. Rozanov, B. K. Chernov, L. I. Lukasheva, and J. G. Atabekov. The nucleotide sequence of potato virus X RNA. *Nucleic Acids Res.* 16:10929-10930, 1988.
- H. A. Smith, S. L. Swaney, T. D. Parks, E. A. Wernsman, and W. G. Dougherty. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* 6 (10):1441-1453, 1994.
- K. M. Smith. On the composite nature of certain potato virus diseases of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators and selective methods of transmission. *Proc.Royal Soc.B.* 109:251-267, 1931.
- N. A. Smith, S. P. Singh, M. B. Wang, P. A. Stoutjesdijk, A. G. Green, and P. M. Waterhouse. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407 (6802):319-320, 2000.
- S. S. Smith, J. L. C. Kan, D. J. Baker, B. E. Kaplan, and P. Dembek. Recognition of Unusual Dna Structures by Human Dna(Cytosine-5)Methyltransferase. *J.Mol.Biol.* 217 (1):39-51, 1991.
- W. A. Snedden and H. Fromm. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Sci.* 3 (8):299-304, 1998.
- R. M. Solomon-Blackburn and H. Barker. A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations. *Heredity* 86 (Pt 1):8-16, 2001.
- R. M. Solomon-Blackburn and H. Barker. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. *Heredity* 86 (Pt 1):17-35, 2001.
- N. Sonenberg, A. J. Shatkin, R. P. Riccardi, M. Rubin, and R. M. Goodman. Analysis of terminal structures of RNA from potato virus X. *Nucleic Acids Res.* 5:2501-2512, 1978.
- R. V. Sonti, M. Chiurazzi, D. Wong, C. S. Davies, G. R. Harlow, D. W. Mount, and E. R. Signer. Arabidopsis Mutants Deficient in T-Dna Integration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (25):11786-11790, 1995.
- Y. Soumounou and J. F. Laliberte. Nucleic acid-binding properties of the P1 protein of turnip mosaic potyvirus produced in *Escherichia coli*. *J.Gen.Virol.* 75 (Pt 10):2567-2573, 1994.
- C. Spetz and J. P. Valkonen. Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 17 (5):502-510, 2004.
- V. S. Sriskanda, G. Pruss, X. Ge, and V. B. Vance. An eight-nucleotide sequence in the potato virus X 3' untranslated region is required for both host protein binding and viral multiplication. *J.Virol.* 70 (8):5266-5271, 1996.
- M. Stam, A. Viterbo, J. N. Mol, and J. M. Kooter. Position-dependent methylation and transcriptional silencing of transgenes in inverted T-DNA repeats: implications for posttranscriptional silencing of homologous host genes in plants. *Mol.Cell Biol.* 18 (11):6165-6177, 1998.
- D. Stanic-Racman, J. Zel, and B. Strukelj. Immunity to potato tuber necrotic ringspot disease in potato induced by transformation with coat protein gene sequences from an NTN isolate of Potato virus Y. Genebank sequence AF321554.1; *elsewhere unpublished*, 2005.
- M. Sugawara, M. Kojima, and D. Murayama. Latent period and retention of potato leaf-roll virus in its vector, *Myzus persicae*. *Ann.Phytopath.Soc.Japan* 40:39-45, 1974.

H. Tabara, E. Yigit, H. Siomi, and C. C. Mello. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 109 (7):861-871, 2002.

E. Tacke, D. Prufer, F. Salamini, and W. Rohde. Characterization of a potato leafroll luteovirus subgenomic RNA: differential expression by internal translation initiation and UAG suppression. *J.Gen.Virol.* 71:2265-2272, 1990.

E. Tacke, J. Schmitz, D. Prufer, and W. Rohde. Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* 197 (1):274-282, 1993.

T. Takanami and S. Kubo. Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses: tobacco necrotic dwarf and potato leafroll. *J.Gen.Virol.* 44:153-159, 1979.

M. Taliansky, M. A. Mayo, and H. Barker. Pathogen profile: potato Leafroll virus: a classic pathogen shows some new tricks. *Mol.Plant.Pathol.* 4 (2):81-89, 2003.

T. Tamada, B. D. Harrison, and I. M. Roberts. Variation among British isolates of potato leafroll virus. *Ann.appl.Biol.* 104:107-116, 1984.

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

X. Tang, Y. Nakata, H. O. Li, M Zhang, H. Gao, A. Fujita, O. Sakatsume, T Ohta, and K. Yokoyama. The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 22 (14):2857-2858, 1994.

M. M. Tanzer, W. F. Thompson, M. D. Law, E. A. Wernsman, and S. Uknes. Characterization of Post-Transcriptionally Suppressed Transgene Expression That Confers Resistance to Tobacco Etch Virus Infection in Tobacco. *Plant Cell* 9 (8):1411-1423, 1997.

F. Tenllado, C. Llave, and J. R. Diaz-Ruiz. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Res.* 102 (1):85-96, 2004.

M. Tepfer. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annu.Rev.Phytopathol.* 40:467-491, 2002.

C. L. Thomas, L. Jones, D. C. Baulcombe, and A. J. Maule. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J.* 25 (4):417-425, 2001.

C. L. Thomas, V. Leh, C. Lederer, and A. J. Maule. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 306 (1):33-41, 2003.

P. E. Thomas, E. C. Lawson, J. C. Zalewski, G. L. Reed, and W. K. Kaniewski. Extreme resistance to Potato leafroll virus in potato cv. Russet Burbank mediated by the viral replicase gene. *Virus Res.* 71 (1-2):49-62, 2000.

H. H. Thornberry. PVY. *Index of Plant Virus Diseases, Agric.Handb U.S.D.A.* 307:285, 1966.

D. W. Thornbury, G. M. Hellmann, R. E. Rhoads, and T. P. Pirone. Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology* 144:260-267, 1985.

K. Tiilikkala. Perunan Y -viroosin torjunta mineraaliöljyllä. *M.Sc.Thesis*, Department of Plant Pathology, University of Helsinki, 22 p.(In Finnish)., 1987.

U. Timpe, E. Maiss, J. Landsmann, and R. Casper. Coat protein mediated cross protection"gegen das Scharka Virus. *Mitt.Biol.Bundesanst.Land- Forstwirtschaft* 238:212, 1992.

- B. Tinland, B. Hohn, and H. Puchta. *Agrobacterium tumefaciens* transfers single-stranded transferred DNA (T-DNA) into the plant cell nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (17):8000-8004, 1994.
- H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76 (9):4350-4354, 1979.
- D. M. Tricoli, K. Carney, R. Russel McMaster, D. W. Groff, K. C. Hadden, P. T. Himmel, J. P. Hubbard, M. L. Boeshore, and H. D. Quemada. Field Evaluation of Transgenic Squash Containing Single or Multiple Virus Coat Protein Gene Constructs for Resistance to Cucumber Mosaic Virus, Watermelon Mosaic Virus 2, and Zucchini Yellow Mosaic Virus. *Bio/Technology* 13:1458-1465, 1995.
- T. Tuschl, P. D. Zamore, R. Lehmann, D. P. Bartel, and P. A. Sharp. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 13 (24):3191-3197, 1999.
- G. E. Tusnady, I. Simon, A. Varadi, and T. Aranyi. BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes. *Nucleic Acids Res.* 33 (1), 2005.
- S. Urcuqui-Inchima, A. Haenni, and F. Bernardi. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* 74 (1-2):157-175, 2001.
- F. E. Vaistij, L. Jones, and D. C. Baulcombe. Spreading of RNA Targeting and DNA Methylation in RNA Silencing Requires Transcription of the Target Gene and a Putative RNA-Dependent RNA Polymerase. *Plant Cell* 14 (4):857-867, 2002.
- J. P. T. Valkonen and J. P. Palohuhta. Resistance to potato virus A and potato virus Y in potato cultivars grown in Finland. *Agric.Food Sci.Finland* 5 (1):57-62, 1996.
- T. Van Den Boogaart, A. J. Maule, J. W. Davies, and G. P. Lomonossoff. Sources of target specificity associated with the recovery against Pea seed-borne mosaic virus infection mediated by RNA silencing in pea. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 5 (1):37-43, 2004.
- G. W. Van den Bovenkamp. Potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD) veroorzaakt door een nieuwe stam van PVYN. *Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor Landbouwgewassen, EDE*, 1992.
- J. F. van den Heuvel, M. Verbeek, and Wilk F. van der. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J.Gen.Virol.* 75 (Pt 10):2559-2565, 1994.
- J. F. van den Heuvel, R. A. A. van der Vlugt, M. Verbeek, P. T. de Haan, and H. Huttinga. Characteristics of a resistance-breaking isolate of Potato virus Y causing Potato tuber necrosis ringspot disease. *Eur.J.Plant Pathol.* 100:347-356, 1994.
- R. A. van der Vlugt, R. K. Ruiter, and R. Goldbach. Evidence for sense RNA-mediated protection to PVYN in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Mol Biol* 20 (4):631-639, 1992.
- F. van der Wilk, P. Houterman, J. Molthoff, F. Hans, B. Dekker, Heuvel J. van den, H. Huttinga, and R. Goldbach. Expression of the potato leafroll virus ORF0 induces viral-disease-like symptoms in transgenic potato plants. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 10 (2):153-159, 1997.
- H. A. van Hoof. Aphid vectors of Potato virus Y. *Neth.J.Pl.Path.* 86:156-162, 1980.
- H. Van Houdt, I. Ingelbrecht, M. Van Montagu, and A. Depicker. Post-transcriptional silencing of a neomycin phosphotransferase II transgene correlates with the accumulation of unproductive RNAs and with increased cytosine methylation of 3' flanking regions. *Plant J.* 12 (2):379-392, 1997.

- V. B. Vance, P. H. Berger, J. C. Carrington, A. G. Hunt, and X. M. Shi. 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 206 (1):583-590, 1995.
- B. F. Vanyushin and M. D. Kirnos. DNA methylation in plants. *Gene* 74 (1):117-121, 1988.
- B. F. Vanyushin. Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Biochemistry-Moscow* 70 (5):488-499, 2005.
- M. Varrelmann and E. Maiss. Mutations in the coat protein gene of plum pox virus suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. *J.Gen.Virol.* 81 (Pt 3):567-576, 2000.
- H. Vaucheret, J. C. Palauqui, T. Elmayan, and B. Moffatt. Molecular and genetic analysis of nitrite reductase co-suppression in transgenic tobacco plants. *Mol.Gen.Genet.* 248 (3):311-317, 1995.
- H. Vaucheret, L. Nussaume, J. C. Palauqui, I. Quillere, and T. Elmayan. A Transcriptionally Active State Is Required for Post-Transcriptional Silencing (Cosuppression) of Nitrate Reductase Host Genes and Transgenes. *Plant Cell* 9 (8):1495-1504, 1997.
- H. Vaucheret, C. Beclin, T. Elmayan, F. Feuerbach, C. Godon, J. B. Morel, P. Mourrain, J. C. Palauqui, and S. Vernhettes. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J.* 16 (6):651-659, 1998.
- H. Vaucheret, C. Beclin, and M. Fagard. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J.Cell Sci.* 114 (Pt 17):3083-3091, 2001.
- C. Vazquez Rovere, S. Asurmendi, and H. E. Hopp. Transgenic resistance in potato plants expressing potato leaf roll virus (PLRV) replicase gene sequences is RNA-mediated and suggests the involvement of post-transcriptional gene silencing. *Arch.Virol.* 146 (7):1337-1353, 2001.
- C. Vazquez Rovere, M. del Vas, and H. E. Hopp. RNA-mediated virus resistance. *Curr.Opin.Biotechnol.* 13 (2):167-172, 2002.
- J. Verchot, E. V. Koonin, and J. C. Carrington. The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185 (2):527-535, 1991.
- J. Verchot and J. C. Carrington. Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. *J.Virol.* 69 (3):1582-1590, 1995.
- J. Verchot and J. C. Carrington. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J.Virol.* 69 (6):3668-3674, 1995.
- J. Verchot, S. M. Angell, and D. C. Baulcombe. In vivo translation of the triple gene block of potato virus X requires two subgenomic mRNAs. *J.Virol.* 72 (10):8316-8320, 1998.
- T. C. Verwoerd, B. M. Dekker, and A. Hoekema. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17:2362, 1989.
- O. Voinnet, Y. M. Pinto, and D. C. Baulcombe. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (24):14147-14152, 1999.
- O. Voinnet, C. Lederer, and D. C. Baulcombe. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103 (1):157-167, 2000.

- O. Voinnet. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 17 (8):449-459, 2001.
- H. J. Walters. Some relationships of three plant viruses to the differential seed potato certification. *Phytopathology Am.Potato* 42:355-362, 1952.
- J. Y. Wang, C. Chay, F. E. Gildow, and S. M. Gray. Readthrough protein associated with virions of barley yellow dwarf luteovirus and its potential role in regulating the efficiency of aphid transmission. *Virology* 206 (2):954-962, 1995.
- M. B. Wang and P. M. Waterhouse. High-efficiency silencing of a beta-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Mol.Biol.* 43 (1):67-82, 2000.
- M. B. Wang, S. V. Wesley, E. J. Finnegan, N. A. Smith, and P. M. Waterhouse. Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants. *RNA* 7 (1):16-28, 2001.
- M. B. Wang and M. Metzloff. RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr.Opin.Plant Biol.* 8 (2):216-222, 2005.
- R. Y. H. Wang, C. W. Gehrke, and M. Ehrlich. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nuc.Acids Res.* 8:4777-4790, 1980.
- M. Wassenegger, S. Heimes, L. Riedel, and H. L. Sanger. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76 (3):567-576, 1994.
- M. Wassenegger and T. Pelissier. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Mol.Biol.* 37 (2):349-362, 1998.
- M. Wassenegger. Gene silencing-based disease resistance. *Transgenic Res.* 11 (6):639-653, 2002.
- P. M. Waterhouse, M. W. Graham, and M. B. Wang. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (23):13959-13964, 1998.
- P. M. Waterhouse, M. B. Wang, and T. J. Lough. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411 (Juni):834-842, 2001.
- H. L. Weidemann. Importance and control of Potato virus YN (PVYN) in seed potato production. *Potato Res.* 31:85-94, 1988.
- S. Wittmann, H. Chatel, M. G. Fortin, and J. F. Laliberte. Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234 (1):84-92, 1997.
- Z. Xie, L. K. Johansen, A. M. Gustafson, K. D. Kasschau, A. D. Lellis, D. Zilberman, S. E. Jacobsen, and J. C. Carrington. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS.Biol* 2 (5):E104, 2004.
- H. W. Xin and S. W. Ding. Identification and molecular characterization of a naturally occurring RNA virus mutant defective in the initiation of host recovery. *Virology* 317 (2):253-262, 2003.
- S. J. Yang, S. A. Carter, A. B. Cole, N. H. Cheng, and R. S. Nelson. A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101 (16):6297-6302, 2004.
- Y. Yang, B. Ding, D. C. Baulcombe, and J. Verchot. Cell-to-cell movement of the 25K protein of potato virus X is regulated by three other viral proteins. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 13 (6):599-605, 2000.

N. E. Yelina, E. I. Savenkov, A. G. Solovyev, S. Y. Morozov, and J. P. Valkonen. Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. *J. Virol.* 76 (24):12981-12991, 2002.

B. Yu, Z. Yang, J. Li, S. Minakhina, M. Yang, R. W. Padgett, R. Steward, and X. Chen. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307 (5711):932-935, 2005.

P. D. Zamore, T. Tuschl, P. A. Sharp, and D. P. Bartel. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101 (1):25-33, 2000.

J. Zhu, X. Zhu, F. Wen, Q. Bai, C. Zhu, and Y. Song. Effect of cDNA fragments in different length derived from potato virus Y coat protein gene on the induction of RNA-mediated virus resistance. *Sci.China C.(Life Sci.)* 47 (4):382-388, 2004.

V. Ziegler-Graff, V. Brault, D. Mutterer, M.-T. Simonis, E. Herrbach, H. Guilley, K. Richards, and G. Jonard. The coat protein of Beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 9:501-510, 1996.

D. Zilberman, X. Cao, and S. E. Jacobsen. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299 (5607):716-719, 2003.

7. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Schematische Darstellung des PTGS in höheren Pflanzen.....	4
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der Genomstruktur des einzelsträngigen (+) RNA Genoms des PVY, mit Kennzeichnung der Proteinase - Schnittstellen und Angabe der kodierten Proteine.....	8
Abb. 1.3	Symptome des PVY ^{NTN} an der Kartoffelknolle	13
Abb. 1.4	Schematische Darstellung der Genomstruktur des einzelsträngigen (+) RNA Genoms des PLRV mit Darstellung der subgenomischen RNAs und Angabe der einzelnen Proteine	16
Abb. 1.5	Schematische Darstellung der Genomstruktur des einzelsträngigen (+) RNA Genoms des PVX mit Darstellung der subgenomischen RNAs und Angabe der einzelnen Proteine	20
Abb. 3.1	DNA Fragmente der <i>Pst</i> I verdauten I - Phagen - DNA im 1%igen Agarosegel	46
Abb. 3.2	Darstellung der verwendeten Protein Marker	52
Abb. 3.3	Aufbau des Elektroblottes	84
Abb. 3.4	Bisulfitmodifikation von Cytosin zu Uracil	87
Abb. 3.5	Schematische Darstellung einer PCR nach Bisulfitmodifikation von methylierten und nicht methylierten Cytosinen	88
Abb. 3.6	Coomassieblau gefärbtes Tris - Tricin Polyacrylamidgel mit unterschiedlichen Verdünnungen der isolierten <i>Taq</i> DNA Polymerase nach der Dialyse	98
Abb. 3.7	PCR der Verdünnungsreihe der isolierten <i>Taq</i> DNA Polymerase.....	98
Abb. 3.8	Reamplifikation modifizierter <i>N. benthamiana</i> DNA mit unterschiedlichen <i>Taq</i> DNA Polymerasen.....	99
Abb. 4.1	Schematische Darstellung der unterschiedlich langen Hüllprotein abgeleiteten Fragmente der PVY kodierenden Region	100
Abb. 4.2	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für den kassettenförmigen Aufbau der unterschiedlichen Konstrukte, die aus Hüllproteinfragmenten von PVY, PLRV und PVX zusammengesetzt sind	101
Abb. 4.3	Darstellung der synthetischen Oligomere CG1 und CG2 unter Angabe der Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme	102
Abb. 4.4	Schematische Darstellung des Vektors peStuSL-MCS	103
Abb. 4.5	Schematische Darstellung der PVY 'Vor' - Konstrukte	104
Abb. 4.6	Schematische Darstellung der Umsetzung der Klonierungskassetten aus dem Vektor pe35StuSL_MCS in den binären Vektor pLX_222	105
Abb. 4.7	Schematische Darstellung der zur Pflanzentransformation verwendeten PVY Konstrukte	106
Abb. 4.8	Schematische Darstellung der zur Pflanzentransformation verwendeten PVY - PLRV Konstrukte.....	107
Abb. 4.9	Schematische Darstellung der zur Pflanzentransformation verwendeten PVY - PLRV - PVX Konstrukte.....	108

Abb. 4.10	Kontrollverdau der Plasmidpräparation aus <i>A. tumefaciens</i> und aus <i>E. coli</i> nach einer "Rück" - Transformation	109
Abb. 4.11	Darstellung von transformierten Sprossen auf T ₀ - Medium	110
Abb. 4.12	PCR zum Nachweis des Transgens in transformierten <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen.....	111
Abb. 4.13	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die <i>inverted repeat</i> Konstrukte	115
Abb. 4.14	Schematische Darstellung der <i>inverted repeat</i> Konstrukte	116
Abb. 4.15	PLRV Symptome auf <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen.....	119
Abb. 4.16	Nachweis von PLRV Partikeln in den Blattadern mittels TPIA.....	119
Abb. 4.17	Schematische Darstellung der Lage der Primer zur Amplifikation der längeren PVY CP - Fragmente unter Angabe der verwendeten Restriktionssequenzen.....	121
Abb. 4.18	Ergebnis der Einschnitt RT - PCR zur Amplifikation der PVY - CP Sequenzen.....	122
Abb. 4.19	Ergebnis der Gradienten PCR.....	122
Abb. 4.20	Schematische Darstellung der PVY Konstrukte mit 592 bp, 614 bp und 842 bp langen CP Fragmenten	123
Abb. 4.21	Darstellung der PVY Symptome in <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen	125
Abb. 4.22	PAGE und Western Blot.....	127
Abb. 4.23	Abbildung Kanamycin resistenter und nicht resistenter <i>N. benthamiana</i> - Keimlinge.....	128
Abb. 4.24	PVY - Symptom der Pflanze PVY13.03, die mit einer nicht einheitlichen Reaktion auf eine PVY Infektion reagiert	132
Abb. 4.25	PVY - Symptom der Pflanze PVY _{CG} .09.01, die mit einer instabilen Resistenz auf eine PVY Infektion reagiert	133
Abb. 4.26	Schematische Darstellung der Lage der Primer zur Amplifikation der Bisulfit modifizierten transgenen Nukleinsäure.....	138
Abb. 4.27	Ergebnis der Amplifikation an nicht modifizierter Plasmid DNA des Konstruktes VY mit den Primerpaaren Ms/Mas, Ums/Umas und mod1/mod2 DNA	139
Abb. 4.28	Ergebnis der Amplifikation von Plasmid DNA nach der Bisulfit - Modifikation (exemplarisch für das Konstrukt PVY _{CG})	139
Abb. 4.29	Kontroll - PCR für die Primer amp1/amp2 zur Amplifikation Bisulfit-modifizierter DNA aus dem Ampicillinresistenz vermittelnden Gen des Plasmids pBluescriptII	140
Abb. 4.30	Alignment der modifizierten sequenzierten - mit der nicht modifizierten Sequenz des Ampicillinresistenzgen - Fragmentes des pBlueskriptII	141
Abb. 4.31	Ergebnis der Reamplifikation modifizierter transgener <i>N. benthamiana</i> - DNA.....	142
Abb. 4.32	Alignment der viral - abgeleiteten modifizierten Sequenz einer Pflanze der Linie PV.14.....	143

Abb. 4.33	Vergleich der Ergebnisse einer Multiplex PCR zur Amplifikation von modifizierter Kontrollplasmid DNA, die vor und nach der Modifikation mit genomischer Pflanzen DNA vermischt wurde.....	144
Abb. 4.34	Amplifikation und Reamplifikation der modifizierten genomischen DNA und der Kontrollplasmid DNA in Parallelansätzen.....	144
Abb. 4.35	Schematische Darstellung der Lage der Primer Mr und Mf	146
Abb. 4.36	Reamplifikation modifizierter transgener <i>N. benthamiana</i> - DNA des Konstruktes PVY mit den Primerkombinationen Ms/Mr und Mas/Mf.....	147
Abb. 4.37	Grafische Darstellung der prozentual methylierten C in den viral - abgeleiteten Sequenzen der untersuchten Pflanzen vor und nach der PVY - Inokulation.....	151
Abb. 4.38	Grafische Darstellung der prozentualen Anteile der ^m C in den viral - abgeleiteten Sequenzen der resistenten Pflanzen.....	152
Abb. 4.39	Grafische Darstellung der prozentualen Anteile der ^m C in den viral-abgeleiteten Sequenzen der anfälligen Pflanzen	154
Abb. 4.40	Grafische Darstellung der korrigierten prozentualen Anteile der ^m C in den viral - abgeleiteten Sequenzen der Pflanzen vor und nach der Inokulation	158
Abb. 4.41	Grafische Darstellung der korrigierten prozentualen Anteile der ^m C in den viral - abgeleiteten Sequenzen der resistenten und anfälligen Pflanzen.....	159
Abb. 4.42	Darstellung aller in der Sequenz vorkommenden Cytosin - Reste (Konstrukt PVY)	160
Abb. 4.43	Grafische Darstellung der Verteilung der ^m C innerhalb der viral - abgeleiteten Sequenz des Konstruktes PVY _{CG}	161
Abb. 4.44	Grafische Darstellung der Verteilung der ^m C innerhalb der viral - abgeleiteten Sequenz des Konstruktes PV	161
Abb. 4.45	Grafische Darstellung der Verteilung der ^m C innerhalb der viral - abgeleiteten Sequenz der Linie VY.04	162
Abb. 4.46	Grafische Darstellung der Verteilung der ^m C innerhalb der viral - abgeleiteten Sequenz der Linie VY.07	162
Abb. 4.47	Grafische Darstellung der Verteilung der ^m C innerhalb der viral - abgeleiteten Sequenz des Konstruktes PVY	163
Abb. 5.1	Schematische Darstellung der verwendeten CP - Fragmente des PVY und Angabe der Anzahl der resistenten Linien.....	166
Abb. 5.2	Schematische Darstellung der PVY - Konstrukte, die mit synthetischen (CG) ₁₀ kombiniert wurden und Angabe der Anzahl der resistenten Linien.....	178
Abb. 8.1	Schematische Darstellung der Lage der Primer 35Eco und 35Hind am Plasmid pLX_222.....	225
Abb. 8.2	Analyse auf Spleiß-Stellen im Konstrukt p35PPX+Intron-XPP	226
Abb. 8.3	Analyse auf Spleiß-Stellen im Konstrukt p35PPX+CG-XPP	226
Abb. 8.4	Auswertung der PTA ELISA - Daten von Tag 42 nach Inokulation nach REK	228

Abbildungsverzeichnis

Abb. 8.5	Amplifikation des Kontrollfragmentes des pBlueskriptII vor und nach Bisulfit Modifikation.....	229
Abb. 8.6	Alignment der relevanten Sequenz des Plasmids pSL1180_CG	229
Abb. 8.7	Alignment der Kontrollfragmente der einzelnen Modifikationen zur Bestimmung der Effizienz	229
Abb. 8.8	Alignment der viralen CP Sequenz der anfälligen Pflanze PV.14.14 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY.....	230
Abb. 8.9	Alignment der viralen CP Sequenz der instabil immunen Pflanze PV.14.13 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY.....	230
Abb. 8.10	Alignment der viralen CP Sequenz der anfälligen Pflanze VY.04.10 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY.....	231
Abb. 8.11	Alignment der viralen Sequenz der immun reagierenden Pflanze VY.04.04 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY.....	231
Abb. 8.12	Alignment der viralen CP Sequenz der anfälligen Pflanze VY.07.10 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY.....	232
Abb. 8.13	Alignment der viralen CP Sequenz der recovery resistant reagierenden Pflanze VY.07.06 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY.....	232
Abb. 8.14	Alignment der viralen CP Sequenz der anfälligen Pflanze PVY _{CG} .09.15 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY.....	233
Abb. 8.15	Alignment der viralen CP Sequenz der immun reagierenden Pflanze PVY _{CG} .09.06 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY.....	234
Abb. 8.16	Alignment der viralen CP - Sequenz der transgenen anfälligen Pflanze PVY.13.15 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY.....	235
Abb. 8.17	Alignment der viralen CP - Sequenz der transgenen <i>recovery</i> resistant reagierenden Pflanze PVY.13.10 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY	236
Abb. 8.18	Alignment eines Fragmentes des Transgens der Pflanzen 06 und 15 der Linie PVY _{CG} .09 (ohne Bisulfitmodifikation) mit der ursprünglichen Sequenz zum Nachweis der (CG) ₁₀ innerhalb des Transgens in den Pflanzen	237
Abb. 8.19	Alignment des Plasmids PPX+Intron mit der theoretischen Sequenz zur Kontrolle der Nukleotidabfolge in dem <i>inverted repeat</i> Vorkonstrukt.....	238
Abb. 8.20	Alignment des Plasmids PPX _{CG} mit der theoretischen Sequenz zur Kontrolle der Nukleotidabfolge in dem <i>inverted repeat</i> Vorkonstrukt.....	239

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1	Auflistung der ersten identifizierten Suppressor Proteine von Viren unterschiedlicher Genera.....	3
Tab. 1.2	Übersicht der RNA vermittelten Resistenzen gegen PVY.....	15
Tab. 2.1	Auflistung der verwendeten Viren, der Erhaltungswirte, der verwendeten Abkürzungen und Angaben zu ihrer Herkunft	25
Tab. 2.2	Auflistung und Beschreibung der verwendeten Antiseren mit Angabe der Bezugsquellen.....	26
Tab. 2.3	Auflistung der verwendeten Bakterienstämme, mit Angaben ihrer Charakteristika und Bezugsquellen.....	26
Tab. 2.4	Auflistung der verwendeten Plasmide, mit Beschreibung und Angabe der Referenzen bzw. Bezugsquellen.....	27
Tab. 2.5	Auflistung der verwendeten RE, mit Angabe der Erkennungssequenz, der Isoschizomere und Bezugsquellen	28
Tab. 2.6	Auflistung der verwendeten Nukleinsäure - modifizierenden Enzyme, mit Angabe der Konzentrationen, Bezugsquellen und Pufferzusammensetzungen	29
Tab. 2.7	Auflistung der verwendeten Polymerasen, mit Angabe der Konzentrationen, Bezugsquellen und Pufferzusammensetzungen.....	29
Tab. 2.8	Auflistung der verwendeten Protein - modifizierenden und Zellwand - abbauenden Enzyme, mit Angaben der Konzentrationen, Bezugsquellen und Pufferzusammensetzungen.....	30
Tab. 2.9	Auflistung der verwendeten Feststoffe, mit Angabe der Bezugsquellen und verwendeten Abkürzung	30
Tab. 2.10	Auflistung der verwendeten Flüssigchemikalien, mit Angabe der Bezugsquellen und Abkürzungen.....	32
Tab. 2.11	Auflistung der verwendeten Oligonukleotide	33
Tab. 2.12	Auflistung der eingesetzten Kits mit Herstellerangabe	35
Tab. 2.13	Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien, mit Bezeichnung und Bezugsquellen.....	35
Tab. 2.14	Auflistung sonstiger verwendeter Materialien mit Bezugsquellen	36
Tab. 2.15	Auflistung der verwendeten Geräte, mit Typbezeichnungen und Bezugsquellen	36
Tab. 2.16	Auflistung der verwendeten Software, mit Angabe der Version und dem rechtlichen Urheber.....	38
Tab. 3.1	Zusammensetzung eines Ansatzes für den Verdau mit RE.....	60
Tab. 3.2	Antibiotika - Resistenzgene und ihre Wirkung	66
Tab. 3.3	Übersicht über die verwendeten Antibiotikakonzentrationen	67
Tab. 3.4	Konzentration der Antibiotika bei der Pflanzentransformation	78
Tab. 3.5	Auflistung der Primer amp1 und amp2.....	91
Tab. 4.1	Auflistung der regenerierten und abgeernteten T ₀ - Mutterpflanzen	112
Tab. 4.2	Ergebnisse des PVY - Resistenztest.....	113

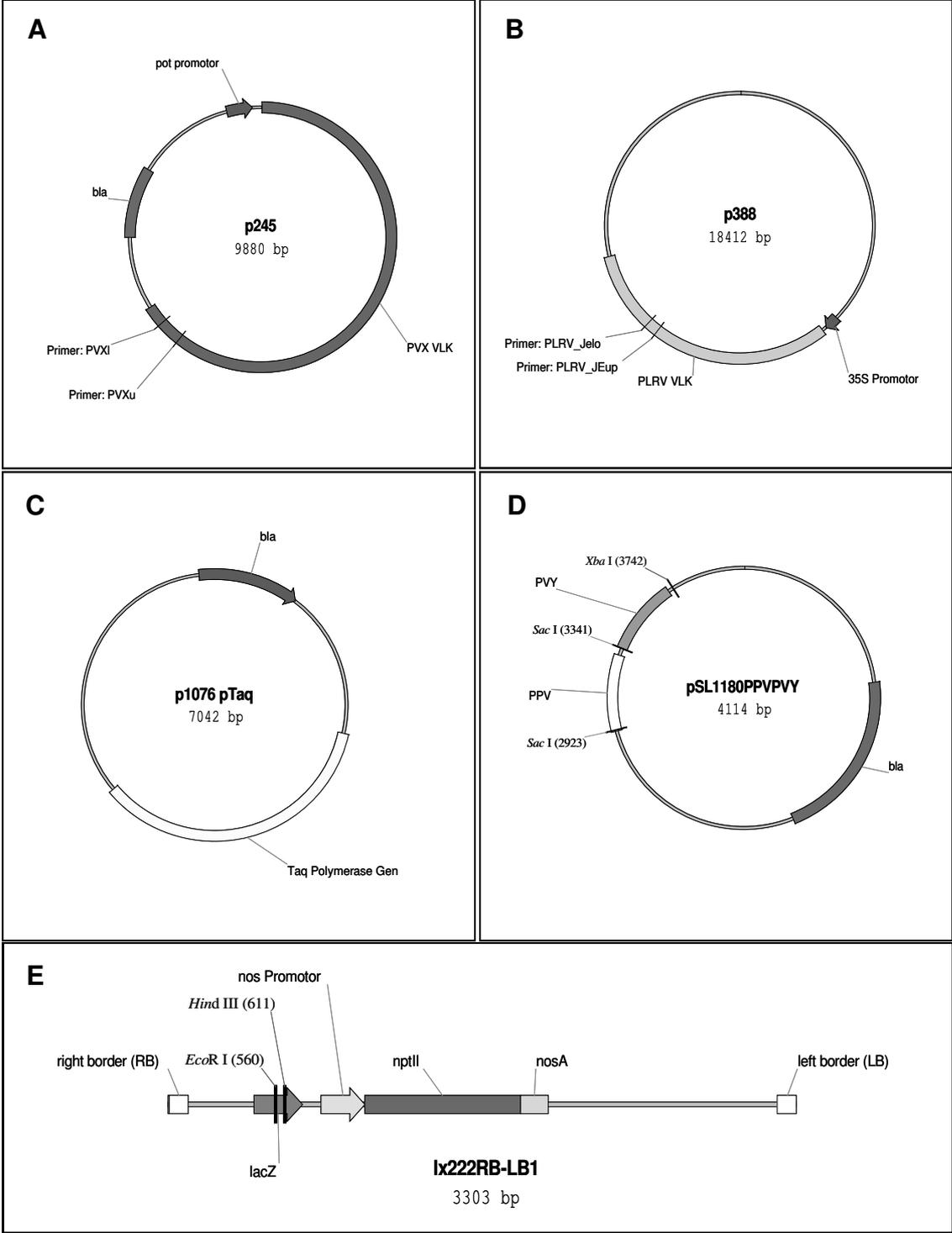
Tabellenverzeichnis

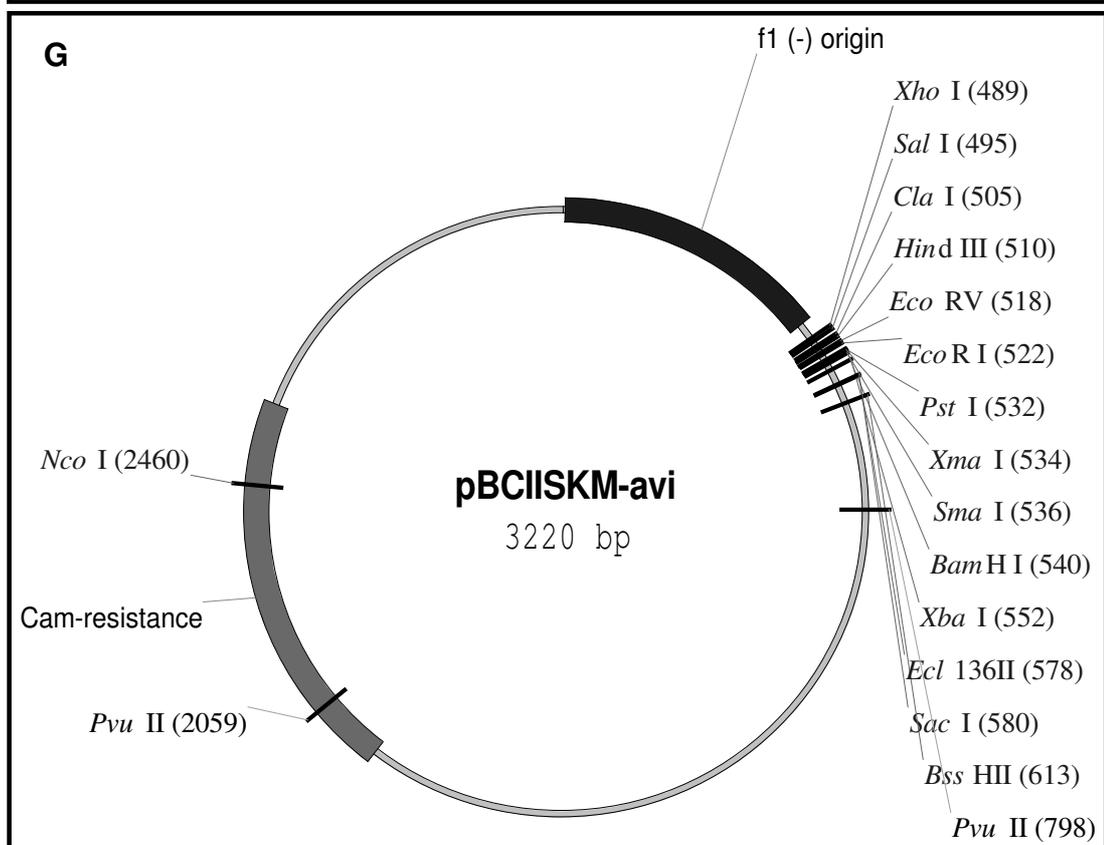
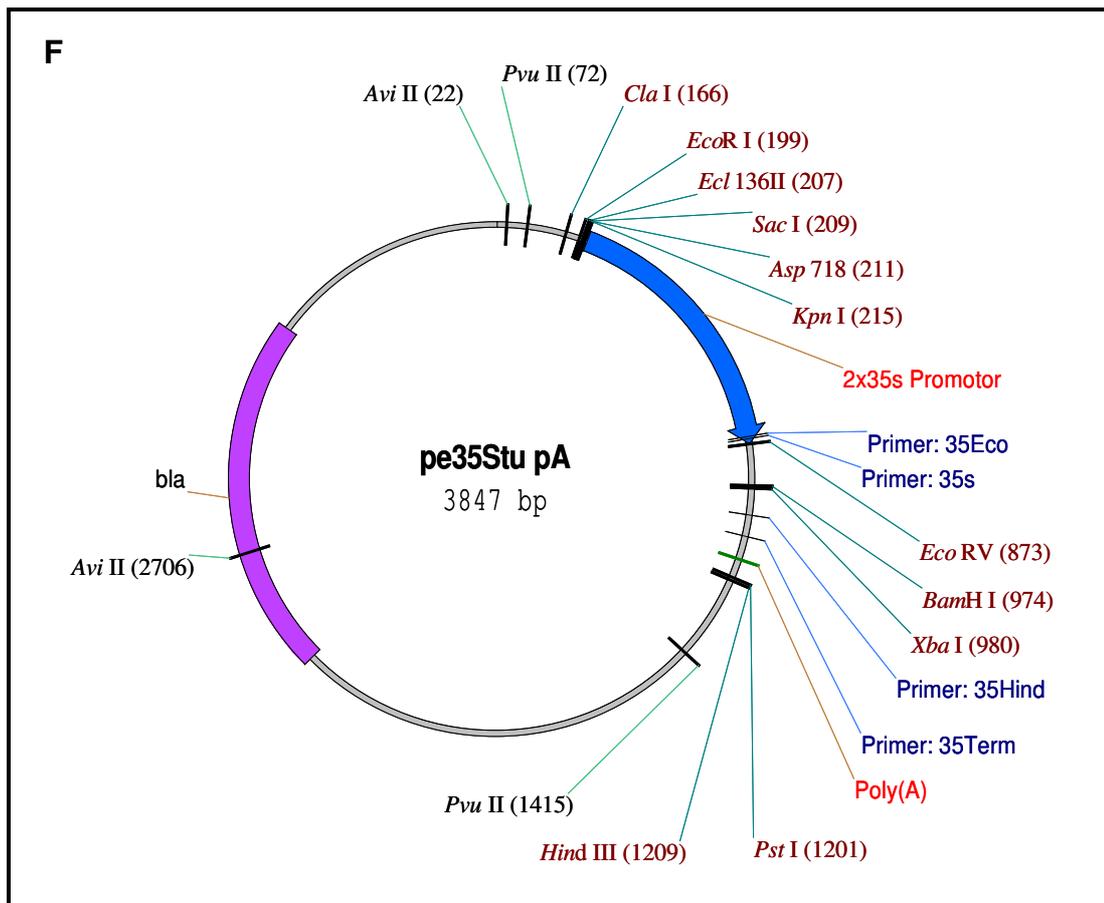
Tab. 4.3	Erwartete Produktgröße der Amplifikate für die einzelnen Konstrukte und die Ergebnisse der Regeneration	117
Tab. 4.4	Ergebnisse des PVY - Resistenztests (Ansatz B).....	117
Tab. 4.5	Detaillierte Auflistung der PVY - Resistenzausprägung innerhalb der T ₁ - Linien der <i>inverted repeat</i> Konstrukte	118
Tab. 4.6	Ergebnisse des PLRV - Resistenztests	120
Tab. 4.7	Ergebnisse der PVX Resistenztests.....	120
Tab. 4.8	Erwartete Produktgröße der Amplifikate für die einzelnen Konstrukte und die Ergebnisse der Regeneration	124
Tab. 4.9	Ergebnisse des PVY - Resistenztests	124
Tab. 4.10	Detaillierte Auflistung der PVY - Resistenzausprägung der Pflanzen der T ₁ - Linien.....	126
Tab. 4.11	Auflistung der Anzahl der Integrationsorte des Transgens in das <i>N. benthamiana</i> - Genom in den Linien, deren Pflanzen eine PVY - Resistenz zeigen	129
Tab. 4.12	Boniturergebnis der 15 transgenen Pflanzen der Linie PVY.13	131
Tab. 4.13	Boniturergebnis der zehn transgenen Pflanzen der Linie PVY _{CG} .09.....	132
Tab. 4.14	Boniturergebnis der sieben transgenen Pflanzen der Linie PV.14.....	133
Tab. 4.15	Boniturergebnis der 15 transgenen Pflanzen der Linie VY.04	134
Tab. 4.16	Boniturergebnis der 15 transgenen Pflanzen der Linie VY.07	135
Tab. 4.17	Zusammenfassung der Ergebnisse des wiederholten PVY - Resistenztests mit Angaben zur Effizienz der jeweiligen Konstrukte.....	136
Tab. 4.18	Auflistung der für die Methylierungsanalyse ausgewählten Pflanzen.....	137
Tab. 4.19	Auflistung der Primer zur Amplifikation der modifizierten DNA	138
Tab. 4.20	Erwartete PCR - Produktgröße für die einzelnen Konstrukte.....	138
Tab. 4.21	Auflistung der Primer zur Amplifikation der modifizierten DNA der PVY Konstrukte in zwei Fragmenten.....	146
Tab. 4.22	Auflistung der nicht modifizierten C in den Kontrollfragmenten und den daraus resultierenden Effizienzen	148
Tab. 4.23	Angabe der Anzahl der C in den viral - abgeleiteten Sequenzen der einzelnen Konstrukte	149
Tab. 4.24	Auflistung der Gesamtanzahl der methylierten C der viral - abgeleiteten Sequenzen der untersuchten Pflanzen	149
Tab. 4.25	Auflistung der Häufigkeiten der C in den untersuchten Fragmenten.....	157
Tab. 4.26	Angabe der korrigierten Daten der C - Methylierung	157
Tab. 8.1	Klonierungsschritte der PVY Ausgangskonstrukte (vgl. Abb. 4.5)	222
Tab. 8.2	Klonierungsschema zur Verlängerung der PVY Konstrukte mit (CG) ₁₀ ⁻ , PLRV- und PVX - CP Sequenzen	223
Tab. 8.3	Klonierungsschema der PVY - Konstrukte mit den 109 bp langen PVY-CP abgeleiteten Sequenzen	223
Tab. 8.4	Klonierung der <i>inverted repeat</i> Konstrukte	223

Tab. 8.5	Klonierungsschritte zur Verkürzung der <i>inverted repeat</i> Konstrukte für die Sequenzierung.....	224
Tab. 8.6	Klonierung der Konstrukte mit längeren PVY CP abgeleiteten Sequenzen	224
Tab. 8.7	Angabe der Größe der PCR Fragmente zum Transgen Nachweis aller Konstrukte.....	225
Tab. 8.8	ELISA Daten des PVX Resistenztests	227
Tab. 8.9	ELISA Daten des PVY Resistenztests 42 dpi (zu 4.8.1)	227
Tab. 8.10	ELISA Daten des PVY Resistenztests 55 dpi (zu 4.8.1)	228
Tab. 8.11	Übersicht über den prozentualen Anteil der methylierten C innerhalb der viral - abgeleiteten Sequenzen der untersuchten Pflanzen.....	239

8 ANHANG

8.1 PLASMIDKARTEN





8.2 SEQUENZABSCHNITTE WICHTIGER PLASMIDE MIT ANGABEN DER RELEVANTEN ERKENNUNGSSCHNITTSTELLEN

A. Sequenz der eingefügten synthetischen (CG)₁₀ im Plasmid pSL1180_CG

```

Sma I
~~~~~
Xma I
~~~~~
Ava I          BamHI          BglII          AvrII
~~~~~          ~~~~~          ~~~~~          ~~~~~
CCCGGGCCCT ATATATGGAT CCAATTGCAA TGATCATCAT GACAGATCTG GTACCTAGGC
GGGCCCCGGA TATATACCTA GGTTAACGTT ACTAGTAGTA CTGTCTAGAC CATGGATCCG
                NheI
                ~~~~~
                BamHI          XbaI
                ~~~~~          ~~~~~
GCGCGCGCGC GCGCGCGCGG GATCCGCTAG CTATAGTTCT AGA
CGCGCGCGCG CGCGCGCGCC CTAGGCGATC GATATCAAGA TCT
    
```

B. Sequenz der eingefügten synthetischen (CG)₁₀ im Plasmid pe35_CG

```

                KpnI          NheI
                ~~~~~          ~~~~~
StuI   SacII          AvrII          BamHI          XbaI
~~~~~   ~~~~~          ~~~~~          ~~~~~          ~~~~~
AGGCCTCGGC CGCGGATCTG GTACCTAGGC GCGCGCGCGC GCGCGCGCGG GATCCGCTAG CTATAGTTCT AGA
TCCGGAGCCG GCGCCTAGAC CATGGATCCG CGCGCGCGCG CGCGCGCGCC CTAGGCGATC GATATCAAGA TCT
    
```

C. Sequenz zwischen der *EcoRI* und *HindIII* Erkennungssequenz des Vektors pe35StusL-MCS und Lage der Primer 35s, 35Eco, 35Hind und 35Term

	<p style="text-align: center;">ClaI -----</p> <p>151 CGGCCAGTGA ATTATCGATT AAATTAACCC TCACTAAAGG GAGAGACGAA GCCGGTCACT TAATAGCTAA TTTAATTGGG AGTGATTTC CTCTCTGCTT</p> <p style="text-align: center;">EcoRI ~~~</p> <p>201 TTCICGGTAC GTACCCAACA TGGTGGAGCA CGACACTCTC GTCTACTCCA AAGAGCCATG CATGGGTTGT ACCACCTCGT GCTGTGAGAG CAGATGAGGT</p> <p>251 AGAATATCAA AGATACAGTC TCAGAAGACC AAAGGGCTAT TGAGACTTTT TCTTATAGTT TCTATGTAG AGTCTTCTGG TTCCCGATA ACTCTGAAAA</p> <p>301 CAACAAAGG TAATATCGG AAACCTCTCT GGATTCCATT GCCCAGCTAT GTTGTTTCCC ATTATAGCCC TTGGAGGAG CTAAGGTAA CGGGTGATA</p> <p>351 CTGICACTTG ATCAAAAGGA CAGTAGAAAA GGAAGGTGGC ACCTACAAAT GACAGTGAAC TAGTTTCTCT GTCATCTTTT CCTTCCACCG TGGATGTTTA</p> <p>401 GCCATCATTG CGATAAAGGA AAGGCTATCG TTCAAGAATG CCTCTGCCGA CGGTAGTAAC GCTATTTCTT TTCCGATAGC AAGTCTTAC GGAGACGGCT</p> <p>451 CAGTGGTCCC AAAGATGGAC CCCCAACCAC GAGGAGCATC GTGAAAAAAG GTCACCAGGG TTTCTACCTG GGGGTGGGTG CTCTCTGAG CACCTTTTTT</p> <p>501 AAGACGTTCC AACCCAGTCT TCAAAGCAAG TGGATTGATG TGATAACATG TTTGCAAGG TTGGTGAGA AGTTTCTGTT ACCTAFACTAC ACTATTGTAC</p> <p>551 GTGGAGCAGC ACACTCTCGT CTACTCCAAG AATATCAAAG ATACAGTCTC CACCTCGTGC TGTGAGAGCA GATGAGGTTT TTATAGTTTC TATGTACAGG</p> <p>601 AGAAGACCAA AGGGCTATTG AGACTTTTCA ACAAAGGTA ATATCGGGAA TCTTCTGGTT TCCGATAAC TCTGAAAAGT TGTTTCCCAT TATAGCCCTT</p> <p>651 ACCTCCTCGG ATTCCATTGC CCAGCTATCT GTCACCTGAT CAAAAGGACA TGGAGGAGCC TAAGGTAAAG GGTGATAGA CAGTGAACCTA GTTTTCTCTT</p> <p>701 GTAGAAAAGG AAGTGGCAC CTACAAATGC CATCATTCCG ATAAAGGAAA CATCTTTTCC TTCCACCGTG GATGTTTACG GTAGTAACGC TATTTCTTTT</p> <p>751 GGCTATCGTT CAAGAAATGCC TGTGCCGACA GTGGTCCCAA AGATGGACCC CCGATAGCAA GTTCTTACGG AGACGGCTGT CACCAGGTTT TCTACCTGGG</p> <p>801 CCACCCACGA GGAGCATCGT GGAAAAAGAA GACGTTCCAA CCACGTCTTC GGTGGTGTCT CCTCGTAGCA CCTTTTTCTT CTGCAAGGTT GGTGAGAAG</p> <p style="text-align: center;">Primer: 35Eco 80.6%</p> <p>=====</p> <p style="text-align: center;">Primer: 35S 100.0%</p> <p>=====</p> <p style="text-align: center;">EcoRV ~~~~~</p> <p>851 AAAGCAAGTG GATTGATGTG ATATCTCCAC TGACGTAAGG GATGACGCAC TTTCGTTTCC CTAACCTACAC TATAGAGGTG ACTGCATTCC CTACTGCGTG</p> <p>901 AATCCCACTA TCCITCGCAA GACCCITCCT CTATATAAGG AAGTTCATTT TTAGGGTGAT AGGAAGCGTT CTGGGAAGGA GATATATTCC TTCAAGTAAA</p> <p style="text-align: center;">Ecl136II</p>	<p style="text-align: center;">Ecl136II -----</p> <p style="text-align: center;">XhoI -----</p> <p style="text-align: center;">SacI -----</p> <p>951 CATTIGGAGA GGGTGGCCAC TAGTACTTCT CGAGCTCTGT ACATGTCCGC GTAAACCTCT CCCACCGGTG ATCATGAAGA GCTCGAGACA TGTACAGGCG</p> <p style="text-align: center;">PvuII -----</p> <p style="text-align: center;">ClaI PstI -----</p> <p>1001 GGTGCGGAGC TACGCGTATC GATGCGGCCA GCTGCAGGCG GCCGCCATAT CCAGCGTGC ATGCGCATAG CTACCGCGGT CGAGCTCCCG CGGCGGTATA</p> <p>1051 GCATCCTAGG CCTATTAATA TTCGGAGTA TACGTACCGG GCTAACGTTA CGTAGGATCC GGATAATTAT AAGGCCTCAT ATGCATCGCG CGATTGCAAT</p> <p style="text-align: center;">Asp718 -----</p> <p style="text-align: center;">KpnI XbaI -----</p> <p>1101 ACAACCGGTA CCTCTAGAGT CCGCAAAAA CACCAGTCTC TCTCTACAAA TGTGGCCAT GGAGATCTCA GCGTTTTTA GTGGTCAGAG AGAGATGTTT</p> <p>1151 TCTATCTCTC TCTATTTTTT TCCAGAATAA TGTGTGAGTA GTTCCCAGAT AGATAGAGAG AGATAAAAAG AGGTCTTATT ACACACTCAT CAAGGGTCTA</p> <p style="text-align: right;">Primer: 35Hind 75.0%</p> <p>=====</p> <p>1201 AAGGGAATTA GGGTCTTAT AGGGTTTCGC TCATGTGTTG AGCATATAAG TTCCCTTAAT CCCAAGAATA TCCCAAAGCG AGTACACAC TCGTATATTC</p> <p style="text-align: right;">Primer: 35Hind 75.0% Primer: 35Term 100.0%</p> <p>=====</p> <p>1251 AAACCCITAG TATGTAITTG TATTTGTAAA ATACTTCTAT CAATAAAAT TTTGGGAATC ATACATAAAC ATAAACATTT TATGAAGATA GTATTTTAA</p> <p style="text-align: right;">PstI HindIII -----</p> <p>1301 TCTAATTCCT AAAACCAAAA TCCAGTGACC TGCAGGCATG CAAGCTTTCC AGATTAAGGA TTTTGGTTTT AGGTCACCTGG ACGTCCGTCG GTTCGAAAAG</p>
--	---	--

8.3 VORBEREITUNG DER VEKTOREN

A. Entfernung einer *AviI* Erkennungssequenz im Vektor pBCIISKM

Restriktion des Vektors pBCIISKM mit *Bsp120I*, *Fill in* Reaktion mit dem Klenow Fragment, Restriktion mit *AviI*, Ligation und Transformation in *E. coli* NM522

B. Entfernung einer *SacI* und *KpnI* Erkennungssequenz im Vektor pe35Stu-pA

Restriktion des Vektors pe35Stu-pA mit *EcoRI* - *Ecl136II*, *Fill in* Reaktion mit dem Klenow Fragment, Ligation und Transformation in *E. coli* NM522

Produkt: pe35Stu-pA1

Restriktion des Vektors pe35Stu-pA1 mit *Asp718I*, *Fill in* Reaktion mit dem Klenow Fragment, Ligation und Transformation in *E. coli* NM522

Produkt: pe35Stu-pA2

C. Einfügen einer *SacI* Erkennungssequenz in den Vektor pe35Stu_pA2 Austausch des Mehrfachklonierungsortes mit dem des Vektors pSL1180

Klonierung des *PmlI* - *XbaI* Fragmentes des Vektors pSL1180 in den *StuI* - *XbaI* geöffneten Vektor pe35Stu_pA2

Produkt: peStusL-MCS

8.4 KLONIERUNGEN

In allen folgenden Tabellen sind mit Buchstaben 'Zwischen' - Konstrukte bezeichnet, deren Klonierung für die Erstellung der Konstrukte nötig war, die zur Pflanzentransformation verwendet wurden und mit Nummern bezeichnet sind.

Tab. 8.1 Klonierungsschritte der PVY Ausgangskonstrukte (vgl. Abb. 4.5)

Nr.	Produkt	Fragment		Vektor	
		Bezeichnung	Restriktion	Bezeichnung	Restriktion
A	pBCPVY1	pSL1180PPVPVY	<i>SacI</i> - <i>XbaI</i>	pBCSKM- <i>AviI</i>	<i>SacI</i> - <i>XbaI</i>
B	pBCPVY2	PVY Fragment 1	<i>StuI</i> - <i>SacI</i>	pBCPVY1	<i>AviI</i> - <i>SacI</i>
C	pe35PVY	pBCPVY2	<i>SacI</i> - <i>XbaI</i>	pe35StusL-MCS	<i>SacI</i> - <i>XbaI</i>
D	pBC PVY2 _{CG}	pSL1180 _{CG}	<i>NheI</i> - <i>BglII</i>	pBCPVY2	<i>NheI</i> - <i>BglII</i>
E	pBC PV _{CG} Y	pe35 _{CG}	<i>AvrII</i> - <i>BamHI</i>	pBCPVY2	<i>NheI</i> - <i>BglII</i>
1	p35P	pBCPVY1	<i>SacI</i> - <i>XbaI</i>	pe35StusL-MCS	<i>SacI</i> - <i>XbaI</i>
2	p35 P _{CG_i}	pBC PV _{CG} -Y	<i>SacI</i> - <i>XbaI</i>	pe35StusL-MCS	<i>SacI</i> - <i>XbaI</i>

Tab. 8.2 Klonierungsschema zur Verlängerung der PVY Konstrukte mit (CG)₁₀-, PLRV- und PVX - CP Sequenzen

Nr	Produkt	Fragment		Vektor	
		Bezeichnung	Restriktion	Bezeichnung	Restriktion
F	pBCPk _{CG}	pBCPVY2+CG	<i>KpnI</i>	Religation	
G	pBCPk	pBCPk _{CG}	<i>NheI-AvrII</i>	Religation	
3	P35Pk	pBCPk	<i>SacI-XbaI</i>	pe35StuSL-MCS	<i>SacI-XbaI</i>
4	P35Pk _{CG}	pBCPk _{CG}	<i>SacI-XbaI</i>	pe35StuSL-MCS	<i>SacI-XbaI</i>
7	P35PP	PLRVFragment	<i>KpnI-XbaI</i>	p35P	<i>KpnI-XbaI</i>
8	P35PkP	PLRVFragment	<i>KpnI-XbaI</i>	p35Pk	<i>KpnI-XbaI</i>
9	P35Pk _{CG} P+sites	pe35_CG	<i>KpnI-BamHI</i>	p35PkP	<i>BglII-KpnI</i>
10	P35Pk _{CG} P	PLRVFragment	<i>KpnI-XbaI</i>	p35Pk _{CG}	<i>KpnI-XbaI</i>
H	P35PP+ sites	PLRVFragment	<i>KpnI-XbaI</i>	p35P+Sites	<i>KpnI-XbaI</i>
I	P35P _{CG_i} P	PLRVFragment	<i>KpnI-XbaI</i>	p35P _{CG}	<i>KpnI-XbaI</i>
J	P35P _{CG} P	pe35_CG	<i>KpnI-BamHI</i>	p35PP+Sites	<i>BglII-KpnI</i>
11	P35PPX	PVX-Fragment	<i>BamHI-XbaI</i>	p35PP	<i>BamHI-XbaI</i>
12	P35PkPX	PVX-Fragment	<i>BamHI-XbaI</i>	p35PkP	<i>BamHI-XbaI</i>
13	P35P _{CG_i} PX	PVX-Fragment	<i>BamHI-XbaI</i>	p35P _{CG_i} P	<i>BamHI-XbaI</i>
14	P35P _{CG} PX	PVX-Fragment	<i>BamHI-XbaI</i>	p35P _{CG} P	<i>BamHI-XbaI</i>
15	P35PP _{CG} X	pSL1180_CG	<i>BglII-NheI</i>	p35PPX	<i>BamHI-NheI</i>

Tab. 8.3 Klonierungsschema der PVY - Konstrukte mit den 109 bp langen PVY-CP abgeleiteten Sequenzen

Nr.	Produkt	Fragment		Vektor	
		Bezeichnung	Restriktion	Bezeichnung	Restriktion
5	p Pkk	p35P	<i>AviI-HindIII</i>	p P	<i>EclI36II-HindIII</i>
9	p Pkk _{CG} P	p35P _{CG} P	<i>AviI-HindIII</i>	p P	<i>EclI36II-HindIII</i>
16	p Pkk _{CG} PX	p35P _{CG} PX	<i>AviI-HindIII</i>	p P	<i>EclI36II-HindIII</i>
K	pe35Pkk _{CG} VK	pe35_CG	<i>BamHI-KpnI</i>	p35PP	<i>BamHI-KpnI</i>
6	p Pkk _{CG}	p35Pkk _{CG} VK	<i>AviI-HindIII</i>	p P	<i>EclI36II-HindIII</i>

Tab. 8.4 Klonierung der *inverted repeat* Konstrukte

Nr	Produkt	Fragment		Vektor	
		Bezeichnung	Restriktion	Bezeichnung	Restriktion
L	p35PPX-IR VK	Fragment PPX-IR	<i>XbaI-XhoI</i>	pe35StuSL-MCS	<i>XbaI-XhoI</i>
M	p35PPX+CG	pe35_CG	<i>SacII-NheI</i>	p35PPX-IR VK	<i>AvrII-SacII</i>
N	p35PPX+Intron	Fragment Intron	<i>MluI-XbaI</i>	p35PPX-IR VK	<i>AvrII-MluI</i>

Nr	Produkt	Fragment		Vektor	
		Bezeichnung	Restriktion	Bezeichnung	Restriktion
23	p35PPX-CG-XPP	p35PPX+CG	<i>Sac</i> II - <i>Xba</i> I	Fragment PPX-IR	<i>Sac</i> II - <i>Xba</i> I
24	p35PPX-Intron-XPP	p35PPX+Intron	<i>Mlu</i> I - <i>Xba</i> I	Fragment PPX-IR	<i>Mlu</i> I - <i>Xba</i> I

Aus dem Vektor p35 wurden die Klonierungskassetten (virale Sequenzen mit Promotor und Polyadenylierungssignal) durch eine *Eco*RI - *Hind*III Klonierung in den binären Vektor pLX_222 überführt.

Tab. 8.5 Klonierungsschritte zur Verkürzung der *inverted repeat* Konstrukte für die Sequenzierung

Produkt	Konstrukt	Restriktion		Sequenzier Primer
p35 XPP	p35PPX-CG-XPP	<i>Avr</i> II - <i>Eco</i> RI	Religation*	T3
P35 PPX CG ₍₁₀₎	p35PPX-CG-XPP	<i>Avr</i> II - <i>Hind</i> III	Religation*	T7
p35 ½ Intron XPP	p35PPX-Intron-XPP	<i>Eco</i> RI - <i>Mfe</i> I	Religation*	T3
p35 PPX ½ Intron	p35PPX-Intron-XPP	<i>Hind</i> III - <i>Mfe</i> I	Religation*	T7

*Vor der Religation wurde ein Fill in mit dem Klenow Fragment durchgeführt.

Tab. 8.6 Klonierung der Konstrukte mit längeren PVY CP abgeleiteten Sequenzen

Nr	Produkt	Fragment		Vektor	
		Bezeichnung	Restriktion	Bezeichnung	Restriktion
17	P35PVY	Fragment PVY	<i>Sal</i> I - <i>Xba</i> I	pe35StuSL-MCS	<i>Xba</i> I - <i>Xho</i> I
18	P35PVY _{CG}	Fragment PVY	<i>Nhe</i> I - <i>Sal</i> I	pe35StuSL-MCS	<i>Xba</i> I - <i>Xho</i> I
19	P35PV	Fragment PV	<i>Sal</i> I - <i>Xba</i> I	pe35StuSL-MCS	<i>Xba</i> I - <i>Xho</i> I
20	P35PV _{CG}	Fragment PV	<i>Nhe</i> I - <i>Sal</i> I	pe35StuSL-MCS	<i>Xba</i> I - <i>Xho</i> I
21	P35VY	Fragment VY	<i>Sal</i> I - <i>Xba</i> I	pe35StuSL-MCS	<i>Xba</i> I - <i>Xho</i> I
22	P35VY _{CG}	Fragment VY	<i>Nhe</i> I - <i>Sal</i> I	pe35StuSL-MCS	<i>Xba</i> I - <i>Xho</i> I

Aus dem Vektor p35 wurden die Klonierungskassetten (virale Sequenzen mit Promotor und Polyadenylierungssignal) durch eine *Eco*RI - *Hind*III Klonierung in den binären Vektor pLX_222 überführt.

8.5 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER LAGE DER PRIMER ZUR AMPLIFIKATION DER TRANSGENEN SEQUENZ UND ANGABEN DER GRÖÖE DER RESULTIERENDEN PCR FRAGMENTE

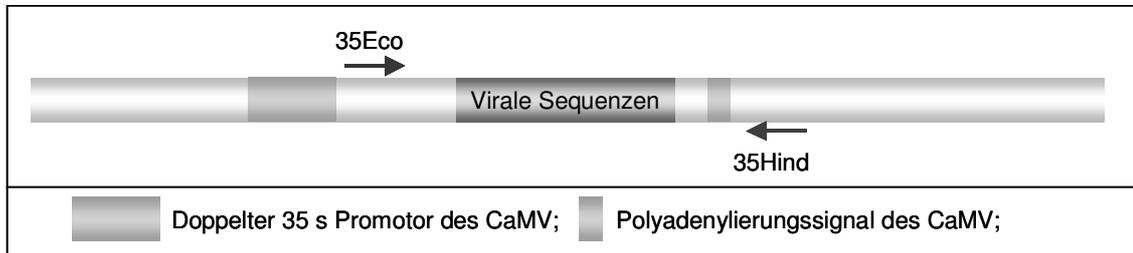


Abb. 8.1 Schematische Darstellung der Lage der Primer 35Eco und 35Hind am Plasmid pLX_222

Tab. 8.7 Angabe der Größe der PCR Fragmente zum Transgen Nachweis aller Konstrukte

Konstrukt Nr.	Konstrukt Bezeichnung	Größe des PCR - Produktes in bp
1	P P	626
2	P P _{CG}	662
3	P P _k	502
4	p P _{kCG}	534
5	p P _{kk}	359 (397*)
6	p P _{kkCG}	398 (436*)
7	p P _P	901
8	p P _{kP}	777
9	p P _{kCGP}	809
10	p P _{kkCGP}	658
11	p P _{PX}	1188
12	p P _{kPX}	1064
13	p P _{VCGYPX}	1224
14	p P _{CGPX}	1212
15	p P _{P_{CG}X}	1224
16	p P _{kkP_{CG}X}	957
17	P _{VY}	1067
18	P _{VYCG}	1096
19	P _V	839
20	P _{VCG}	868
21	V _Y	818
22	V _{YCG}	847

Konstrukt Nr.	Konstrukt Bezeichnung	Größe des PCR - Produktes in bp
23	PPX-CG-XPP	1106
24	PPX-Intron-XPP	982

* Primerkombination: 35s / 35Term

8.6 ANALYSE AUF SPLEIß-STELLEN IN DEN *INVERTED REPEAT* KONSTRUKTEN

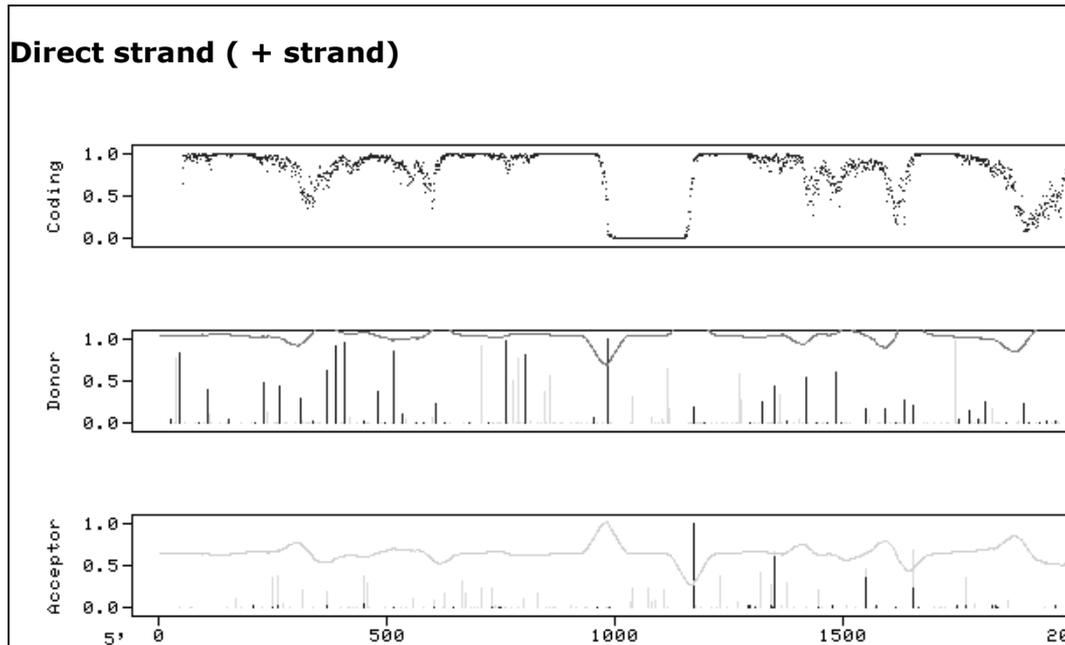


Abb. 8.2 Analyse auf Spleiß-Stellen im Konstrukt p35PPX+Intron-XPP

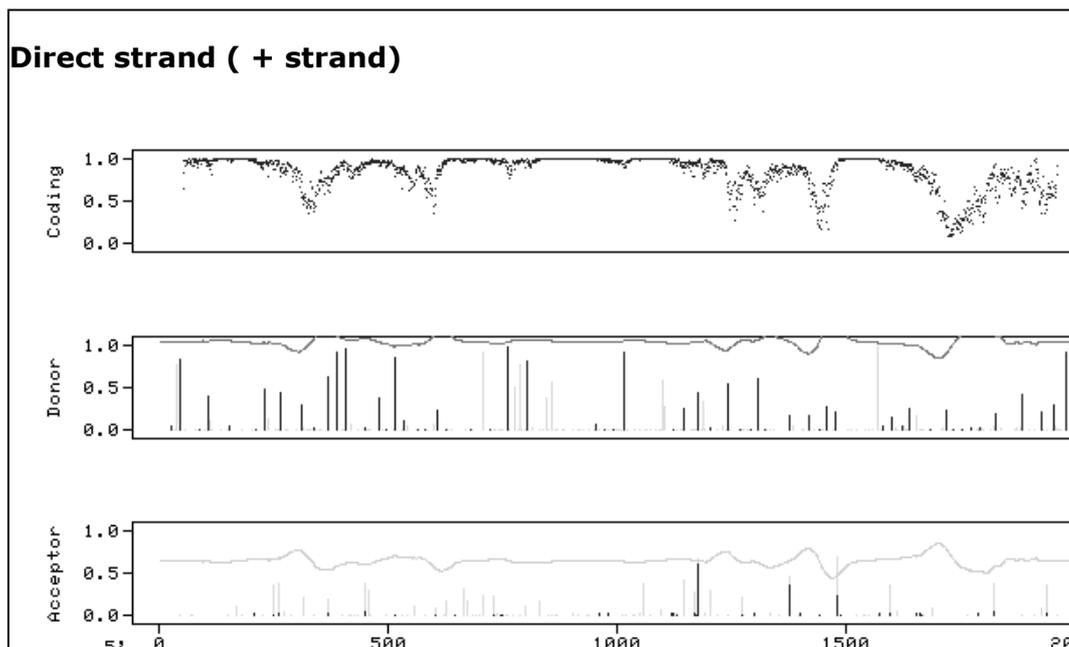


Abb. 8.3 Analyse auf Spleiß-Stellen im Konstrukt p35PPX+CG-XPP

8.7 ELISA DATEN UND AUSWERTUNG

Tab. 8.8 ELISA Daten des PVX Resistenztests

Pflanze	22.05.2003		04.06.2003	
	ELISA Wert	Symptom	ELISA Wert	Symptom
positiv Kontrolle #1	0,276	+	2,002	-
positiv Kontrolle #2	0,270	+	0,315	-
positiv Kontrolle #3	0,277	+	1,928	+
negativ Kontrolle	0,131	-	0,359	-

Tab. 8.9 ELISA Daten des PVY Resistenztests 42 dpi (zu 4.8.1)

Pflanze Nr.	Linie PVY.13	Linie PVY _{CG} .09	Linie PV.14	Linie VY.04	Linie VY.07
01	0,665	0,147	n.t.	0,579	0,424
02	0,159	3,277	n.t.	0,173	0,254
03	0,209	n.t.	n.t.	0,169	0,321
04	***	0,197	n.t.	0,152	0,752
05	1,233	n.t.	2,458	2,956	1,659
06	0,918	0,155	1,755	0,181	0,288
07	0,190	0,891	n.t.	0,173	0,349
08	0,262	0,171	n.t.	0,188	0,617
09	1,065	0,781	n.t.	0,154	0,291
10	0,224	1,290	n.t.	***	2,109
11	1,367	n.t.	2,061	0,162	0,951
12	1,720	n.t.	0,280	0,171	0,896
13	1,670	2,288	0,244	0,175	0,286
14	1,064	n.t.	***	0,170	0,517
15	***	***	1,739	0,186	1,205

Tab. 8.10 ELISA Daten des PVY Resistenztests 55 dpi (zu 4.8.1)

Pflanze Nr.	Linie PVY.13	Linie PVY _{CG.09}	Linie PV.14	Linie VY.04	Linie VY.07
01	-	1,445	n.t.	0,028	0,000
02	-	-	n.t.	-	-
03	0,501	n.t.	n.t.	-	-
04	-	-	n.t.	-	-
05	-	n.t.	-	-	-
06	-	-	-	-	-
07	-	-	n.t.	-	0,23
08	-	3,007	n.t.	-	-
09	-	-	n.t.	-	-
10	-	-	n.t.	-	-
11	-	n.t.	-	-	-
12	-	n.t.	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	n.t.	-	-	0,407
15	-	-	-	-	0,000

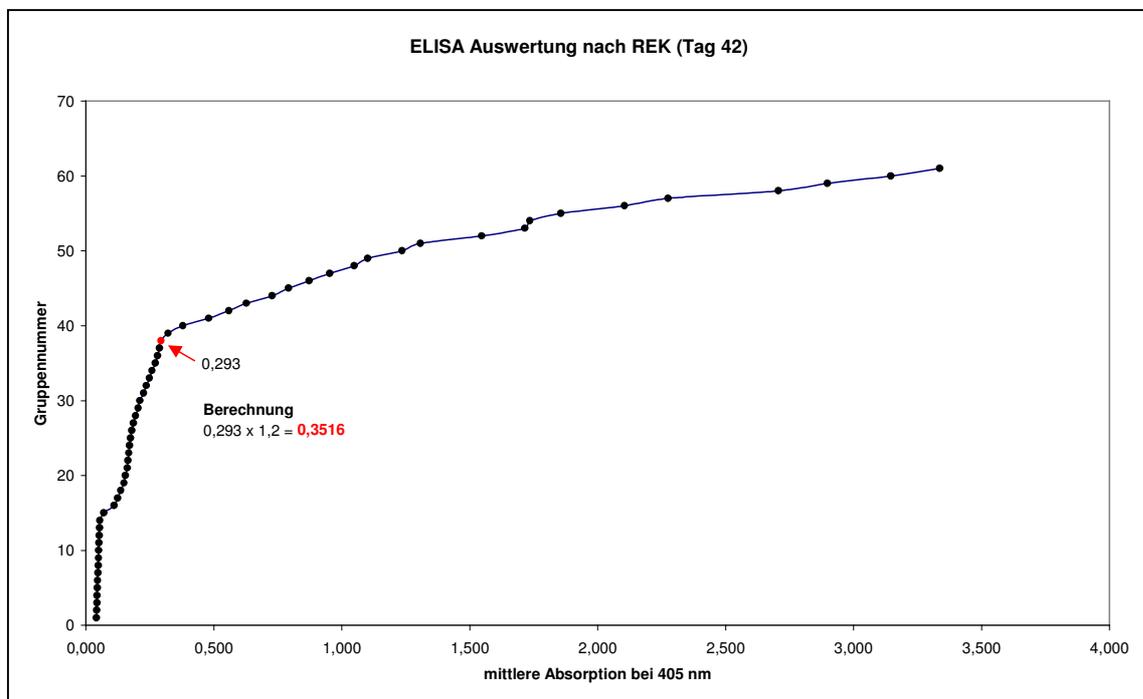


Abb. 8.4 Auswertung der PTA ELISA - Daten von Tag 42 nach Inokulation nach REK

8.8 PCR ZUM NACHWEIS MODIFIZIERTE PBLUESKRIPTII DNA

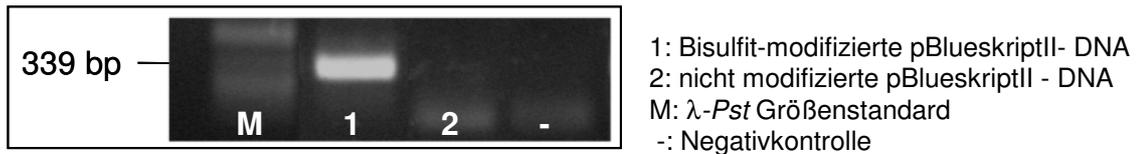


Abb. 8.5 Amplifikation des Kontrollfragmentes des pBlueskriptII vor und nach Bisulfit Modifikation

8.9 ALIGNMENTS

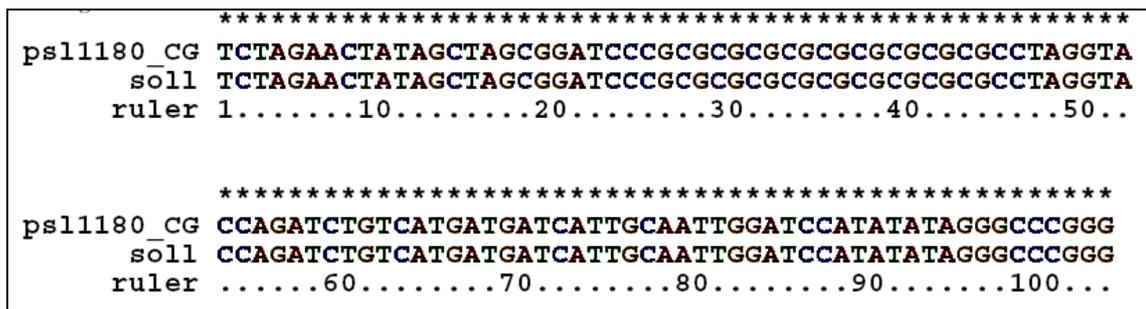


Abb. 8.6 Alignment der relevanten Sequenz des Plasmids pSL1180_CG

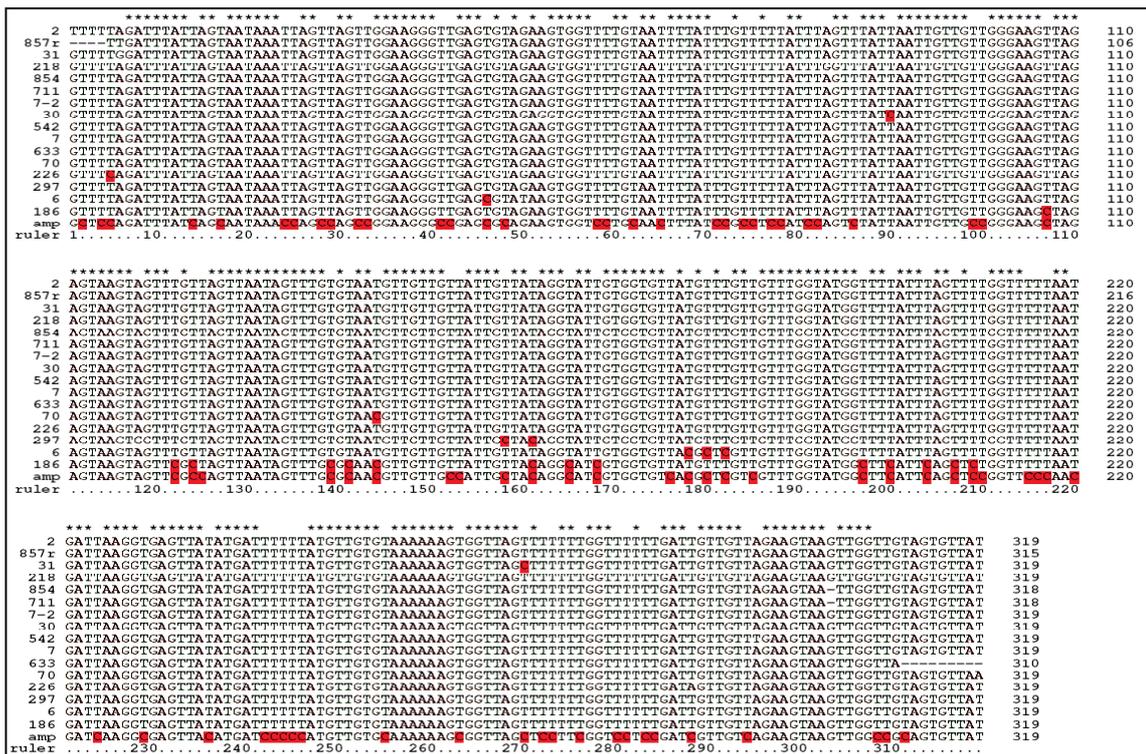


Abb. 8.7 Alignment der Kontrollfragmente der einzelnen Modifikationen zur Bestimmung der Effizienz

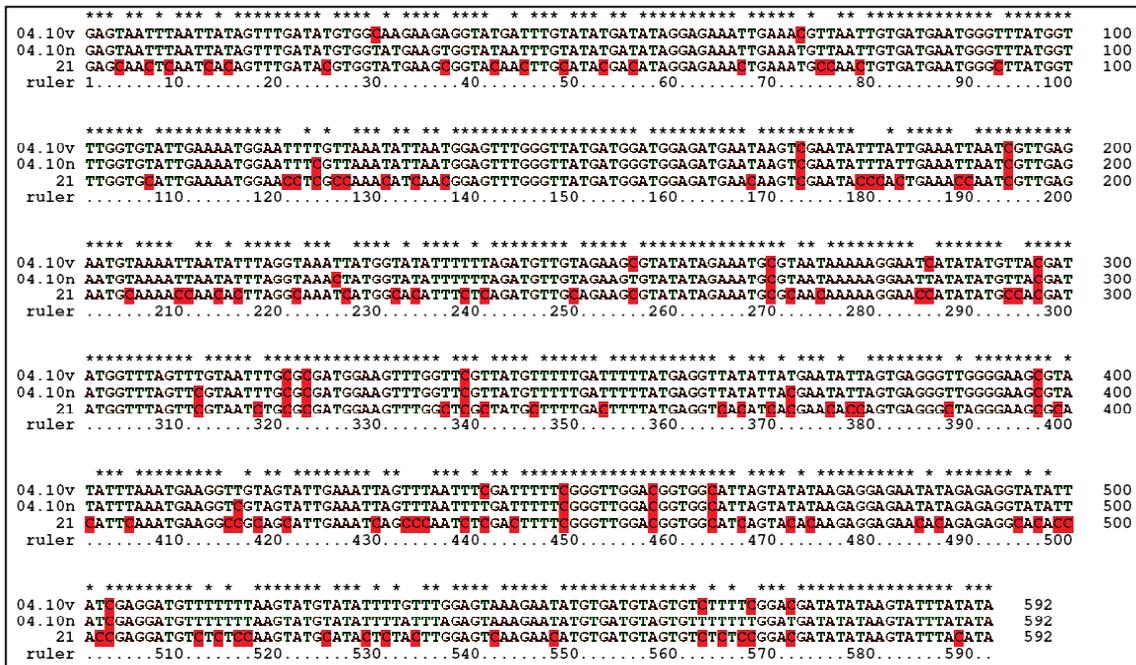


Abb. 8.10 Alignment der viralen CP Sequenz der anfälligen Pflanze VY.04.10 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY

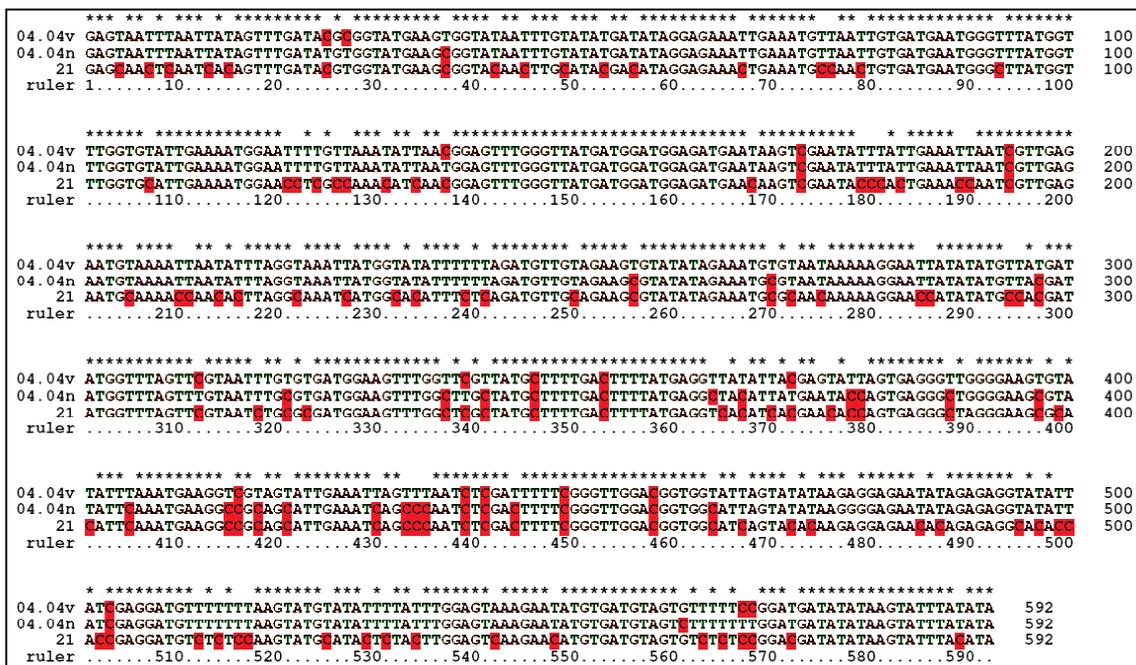


Abb. 8.11 Alignment der viralen CP Sequenz der immun reagierenden Pflanze VY.04.04 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY

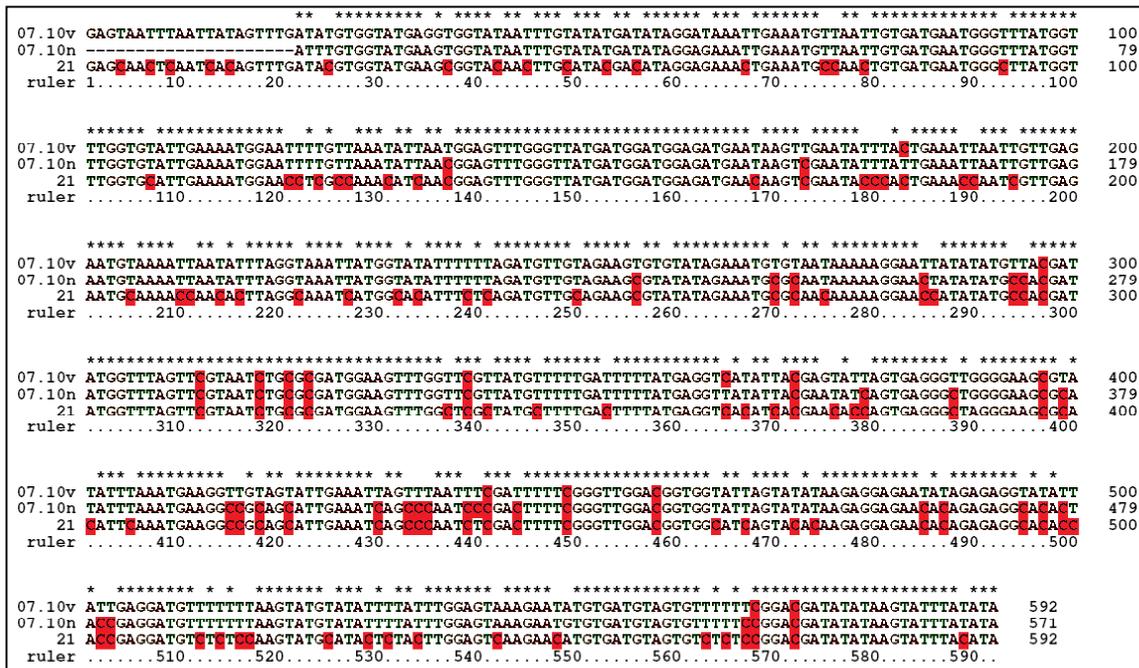


Abb. 8.12 Alignment der viralen CP Sequenz der anfälligen Pflanze VY.07.10 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY

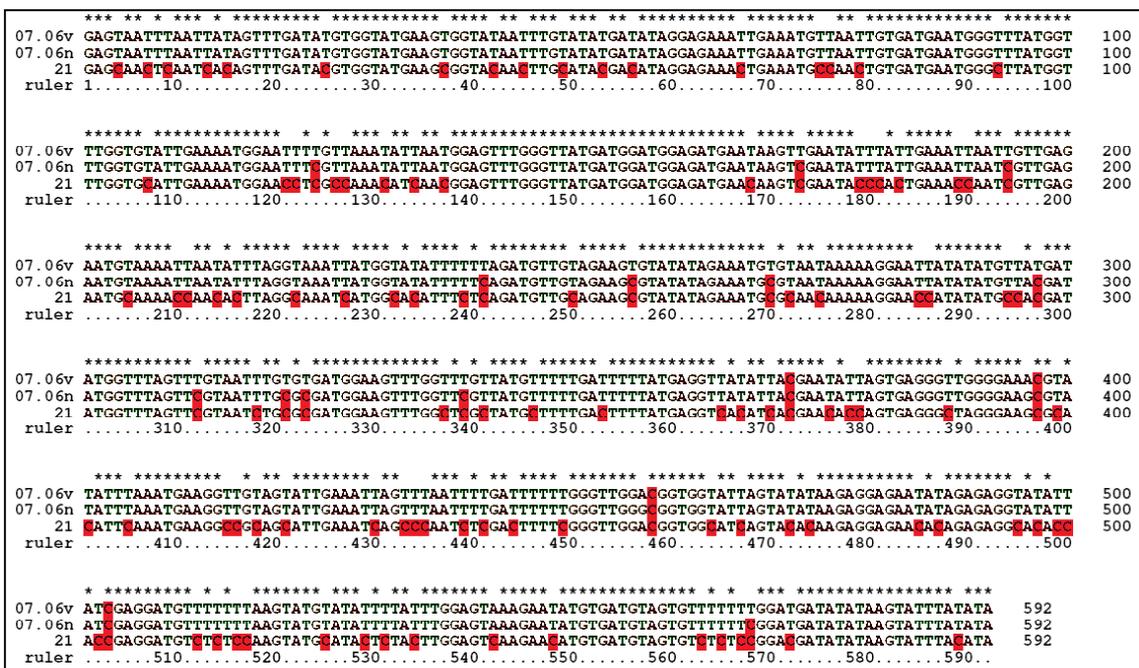


Abb. 8.13 Alignment der viralen CP Sequenz der recovery resistent reagierenden Pflanze VY.07.06 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY

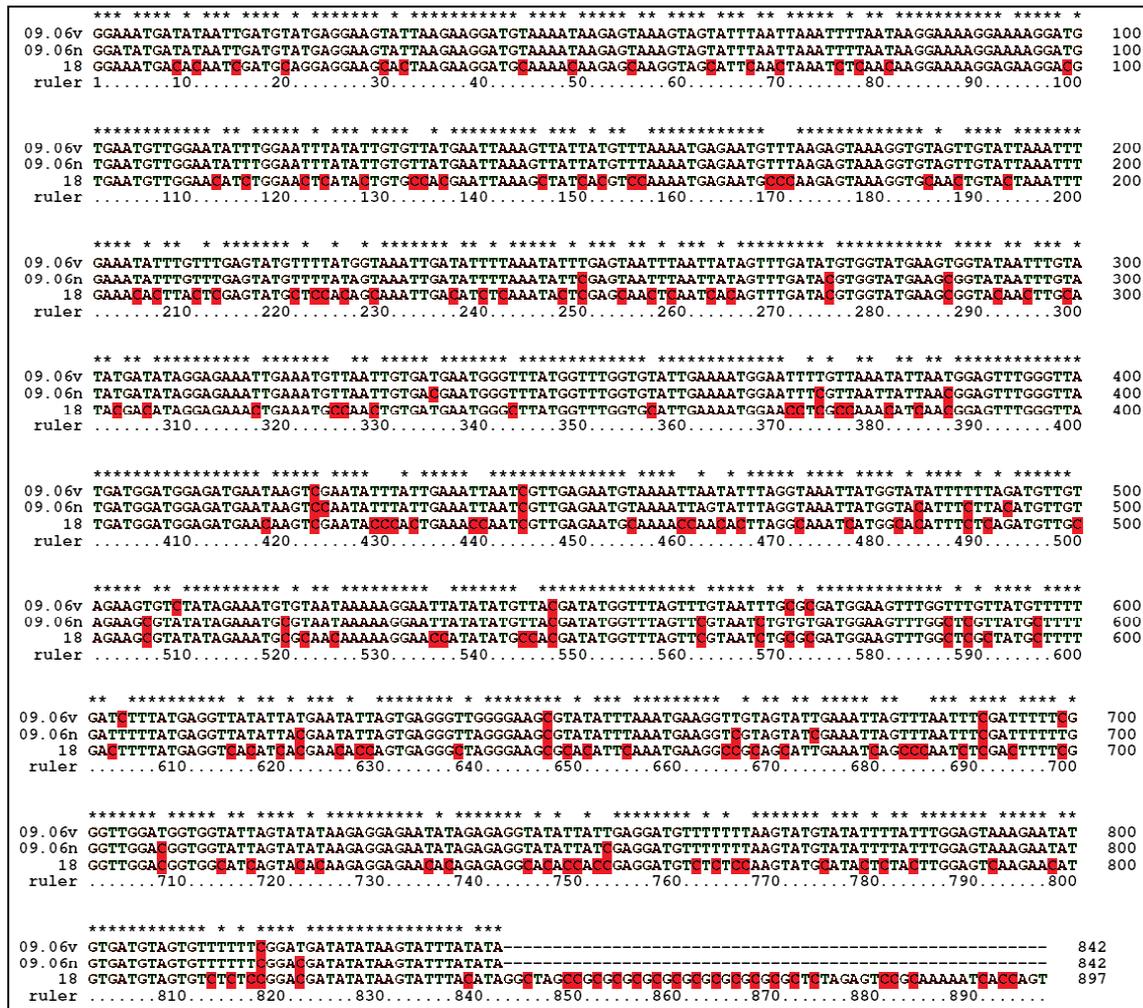


Abb.8.15 Alignment der viralen CP Sequenz der immun reagierenden Pflanze PVY_{CG}.09.06 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY

13.10v	GGAAATGATATAATTGATGTATGAGGAAGTATTAAGAAGGATGTAATAAAGAGTAAAGTAGTATTTAAATTAATTTAATAAGGAAAAGGAAAAGGATG	100
13.10n	GGAAATGATATAATTGATGTATGAGGAAGTATTAAGAAGGATGTAATAAAGAGTAAAGTAGTATTTAAATTAATTTAATAAGGAAAAGGAAAAGGATG	100
17	GGAAATGATATAATTGATGTATGAGGAAGTATTAAGAAGGATGTAATAAAGAGTAAAGTAGTATTTAAATTAATTTAATAAGGAAAAGGAAAAGGATG	100
ruler	1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100	
13.10v	TGAATGTTGGAATATTTGGAATTTATATTTGTTTGAATTAAGTTTATGTTTAAATGAGAATGTTTAAAGAGTAAAGGTTGACTGTATTAAATTT	200
13.10n	TGAATGTTGGAATATTTGGAATTTATATTTGTTTGAATTAAGTTTATGTTTAAATGAGAATGTTTAAAGAGTAAAGGTTGACTGTATTAAATTT	200
17	TGAATGTTGGAATATTTGGAATTTATATTTGTTTGAATTAAGTTTATGTTTAAATGAGAATGTTTAAAGAGTAAAGGTTGACTGTATTAAATTT	200
ruler110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200	
13.10v	GAAAATTGCTGAGTATGTTTACAGAAATTGACATCTAAATACTGAGTAACTAATAGTTTATGATATGTTGATGAAGCGGTAAATTGCTA	300
13.10n	GAAAATTGCTGAGTATGTTTATAGTAAATTTGATATTTAAATATTTGAGTAACTAATAGTTTATGATATGTTGATGAAGCGGTAAATTGCTA	300
17	GAAAATTGCTGAGTATGTTTACAGAAATTGACATCTAAATACTGAGTAACTAATAGTTTATGATATGTTGATGAAGCGGTAAATTGCTA	300
ruler210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300	
13.10v	TAAGATAGGAGAAATTTGAAATGTTAATTTGATGATGAATGGCTTATGCTTTGGTCTATTGAAATGGAATTTCTGAAATTAAGCGGATTTGGGTTA	400
13.10n	TATGATATAGGAGAAATTTGAAATGTTAATTTGATGATGAATGGCTTATGCTTTGGTCTATTGAAATGGAATTTCTGAAATTAAGCGGATTTGGGTTA	400
17	TAAGATAGGAGAAATTTGAAATGTTAATTTGATGATGAATGGCTTATGCTTTGGTCTATTGAAATGGAATTTCTGAAATTAAGCGGATTTGGGTTA	400
ruler310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400	
13.10v	TGATGGATGGAGATGACGAAGTGAATATTTATGAAATTAATCTTGAGCAATGTAATAATTAATTTAGCTAAATTTATGGTATATTTTTAGATGTTGT	500
13.10n	TGATGGATGGAGATGCAATAGCTGAATATTTATGAAATTAATCTTGAGCAATGTAATAATTAATTTAGCTAAATTTATGGTATATTTTTAGATGTTGT	500
17	TGATGGATGGAGATGAAAGACTGAATACTCAATGAAATTAATCTTGAGCAATGTAATAATTAATTTAGCTAAATTTATGGTATATTTTTAGATGTTGT	500
ruler410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480.....490.....500	
13.10v	AGAAGTGTATAGAAATGCTAATAAAAAGGAATTTATATGTTACGATATGGTTTACTTCTAATCTGCGATGGAAAGTTTGGCTGCTATGTTTT	600
13.10n	AGAAGCTATATAGAAATGCTAATAAAAAGGAATTTATATGTTACGATATGGTTTACTTCTAATCTGCGATGGAAAGTTTGGCTGCTATGTTTT	600
17	AGAAGCTATATAGAAATGCTAATAAAAAGGAATTTATATGTTACGATATGGTTTACTTCTAATCTGCGATGGAAAGTTTGGCTGCTATGTTTT	600
ruler510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600	
13.10v	TGATTTTTATGAGGTTAATTAAGAAATTAAGTGAAGGTTAGGGAAGCTATATTTAAATGAAGGTGTAGTATTGAAATTTAATTTTTGATTTTT	699
13.10n	TGATTTTTATGAGGTTAATTAAGAAATTAAGTGAAGGTTAGGGAAGCTATATTTAAATGAAGGTGTAGTATTGAAATTTAATTTTTGATTTTT	700
17	TGATTTTTATGAGGTTAATTAAGAAATTAAGTGAAGGTTAGGGAAGCTATATTTAAATGAAGGTGTAGTATTGAAATTTAATTTTTGATTTTT	699
ruler610.....620.....630.....640.....650.....660.....670.....680.....690.....700	
13.10v	GGGTTGGAAGGTCCTATTAGTATATAAGAGGAGAAATATAGAGAGGTATATTTAGGATGTTTTTAAAGTATGATATTTTTATTGGAGTAAGGAATA	799
13.10n	GGGTTGGAAGGTCCTATTAGTATATAAGAGGAGAAATATAGAGAGGTATATTTAGGATGTTTTTAAAGTATGATATTTTTATTGGAGTAAGGAATA	800
17	GGGTTGGAAGGTCCTATTAGTATATAAGAGGAGAAATATAGAGAGGTATATTTAGGATGTTTTTAAAGTATGATATTTTTATTGGAGTAAGGAATA	799
ruler710.....720.....730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800	
13.10v	TGTGATGTAGTGTTTTTTTGGATGATATATAAGTATTTATATA	842
13.10n	TGTGATGTAGTGTTTTTTTGGAGATATATAAGTATTTATATA	843
17	TGTGATGTAGTGTTTTTTTGGAGATATATAAGTATTTATATA	842
ruler810.....820.....830.....840...	

Abb. 8.17 Alignment der viralen CP - Sequenz der transgenen *recovery* resistent reagierenden Pflanze PVY.13.10 mit der ursprünglichen Sequenz vor (v) und nach (n) der Inokulation mit PVY

```

** * * * *
180906 -GGCCGGGGGAATTGATTAATATGGGACATTTCTAGATGTTGAGAAGGTATATAGAAATGGAAAAAAAGGAAACATATATGCAAGATAT 99
180915 -GGCCGGGGGAATTGATTAATATGGGACATTTCTAGATGTTGAGAAGGTATATAGAAATGGAAAAAAAGGAAACATATATGCAAGATAT 99
18 TGC AAAACCAAAATTTAGCAATATGGGACATTTCTAGATGTTGAGAAGGTATATAGAAATGGAAAAAAAGGAAACATATATGCAAGATAT 100
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100

*****
180906 GGTTTAGTTGTAATTCGCATGGGAAGTTGGTTCGATGCTTTTGA TTTTATGAGGTCATATAGAAACAGTGAGGGTAGGGAAACGATA 199
180915 GGTTTAGTTGTAATTCGCATGGGAAGTTGGTTCGATGCTTTTGA TTTTATGAGGTCATATAGAAACAGTGAGGGTAGGGAAACGATA 199
18 GGTTTAGTTGTAATTCGCATGGGAAGTTGGTTCGATGCTTTTGA TTTTATGAGGTCATATAGAAACAGTGAGGGTAGGGAAACGATA 200
ruler .....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200

*****
180906 TTC AATGAAGCGGAGATTGAATAGCCCAATTCGATTTTGGGTTGGA GGTGGATAGTAAAGAGGAGAAACAGAGAGGCATAGCAC 299
180915 TTC AATGAAGCGGAGATTGAATAGCCCAATTCGATTTTGGGTTGGA GGTGGATAGTAAAGAGGAGAAACAGAGAGGCATAGCAC 299
18 TTC AATGAAGCGGAGATTGAATAGCCCAATTCGATTTTGGGTTGGA GGTGGATAGTAAAGAGGAGAAACAGAGAGGCATAGCAC 300
ruler .....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300

*****
180906 GAGGATGCTTTC AAGTATGCATATCTACTTGGAGTAAAGAAATGTGATGTAGTGTCTCTCGGAGATATATAAGTATTTACATAGGCTAGCCGC 399
180915 GAGGATGCTTTC AAGTATGCATATCTACTTGGAGTAAAGAAATGTGATGTAGTGTCTCTCGGAGATATATAAGTATTTACATAGGCTAGCCGC 399
18 GAGGATGCTTTC AAGTATGCATATCTACTTGGAGTAAAGAAATGTGATGTAGTGTCTCTCGGAGATATATAAGTATTTACATAGGCTAGCCGC 400
ruler .....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400

*****
180906 CGCGCGCGCGCGCGCTT TAGAGTCGGCAAAAATCACAGTCTCT 448
180915 CGCGCGCGCGCGCGCTT TAGAGTCGGCAAAAATCACAGTCTCT 448
18 CGCGCGCGCGCGCGCTT TAGAGTCGGCAAAAATCACAGTCTCT 449
ruler .....410.....420.....430.....440.....

```

Abb. 8.18 Alignment eines Fragmentes des Transgens der Pflanzen 06 und 15 der Linie PVY_{CG.09} (ohne Bisulfitmodifikation) mit der ursprünglichen Sequenz zum Nachweis der (CG)₁₀ innerhalb des Transgens in den Pflanzen

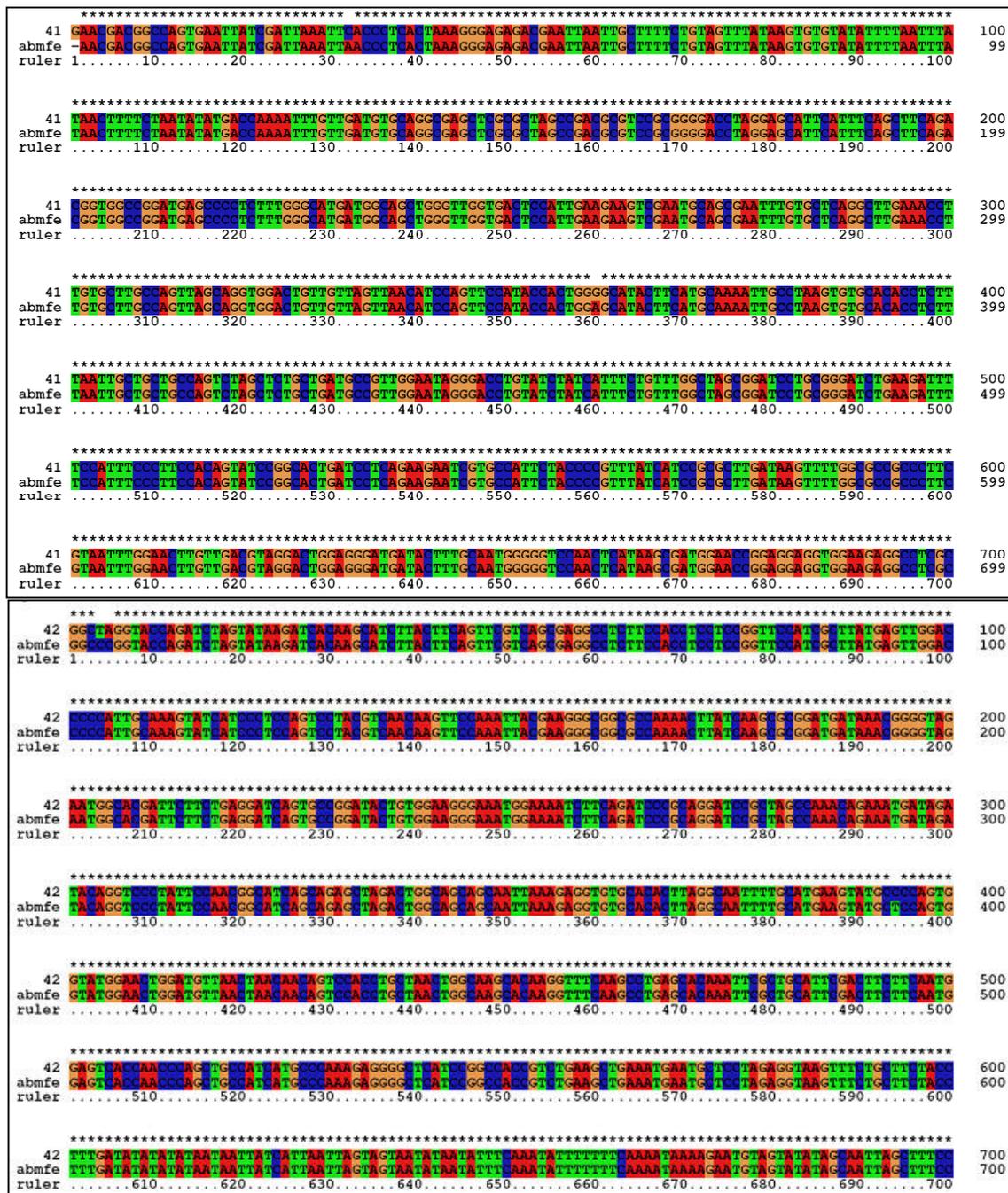


Abb. 8.19 Alignment des Plasmids PPX+Intron mit der theoretischen Sequenz zur Kontrolle der Nukleotidabfolge in dem *inverted repeat* Vorkonstrukt

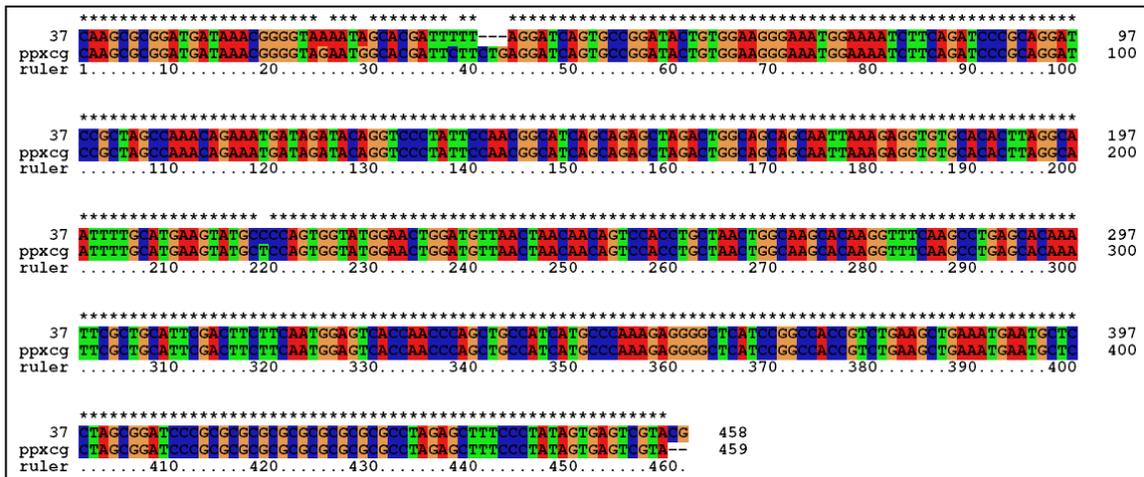


Abb. 8.20 Alignment des Plasmids PPX_{CG} mit der theoretischen Sequenz zur Kontrolle der Nukleotidabfolge in dem *inverted repeat* Vorkonstrukt

8.10 ANGABE DER PROZENTUALEN DNA - METHYLIERUNG DER UNTERSUCHTEN PFLANZEN

Tab. 8.11 Übersicht über den prozentualen Anteil der methylierten C innerhalb der viral - abgeleiteten Sequenzen der untersuchten Pflanzen

	Pflanze	% ^m C vor der Infektion			Effizienz der Modifikation [%]	% ^m C nach der Infektion			Effizienz der Modifikation [%]
		C	sC	aC		C	sC	aC	
resistente Pfl.	PVY.13.10	29,1	44,7	22,9	100	13,9	34,2	6,8	100
	PVY _{CG} .09.06	4,2	14,9	0,0	98,8	13,9	40,4	3,4	98,8
	PV.14.13	20,5	46,9	10,0	84,3	75,9	90,6	70,0	97,6
	VY.04.04.	14,4	36,8	3,8	84,3	27,1	47,4	17,5	100
	VY.07.06	3,4	10,5	0,0	100	14,4	44,7	0,0	100
anfällige Pfl.	PVY.13.15	6,7	23,4	0,0	98,8	0,0	0,0	0,0	100,0
	PVY _{CG} .09.15	15,8	34,0	8,5	97,6	15,2	34,0	7,6	97,6
	PV.14.14	69,6	78,1	66,3	100,0	68,8	81,3	63,8	98,8
	VY.04.10	15,3	39,5	3,8	100,0	13,6	39,5	1,3	84,3
	VY.07.10	12,7	36,8	1,3	100,0	35,6	71,1	18,8	100,0

Pfl.: Pflanze

Wissenschaftliche Veröffentlichungen von Teilen dieser Arbeit

Engelmann, J.; Maiss, E. (2004): Untersuchungen zur Korrelation von PVYNTN Resistenz und Methylierung transgener DNA in *Nicotiana benthamiana* - Pflanzen. Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft e.V. 2004 (2), 40-41

Engelmann, J. ; Maiss, E. (2003): RNA mediated resistance against *Potato virus Y* NTN with coat - protein fragments in *Nicotiana benthamiana* plants - Comparison of different constructs. Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft e.V. 2003 (2), 44-45

Engelmann, J. ; Maiss, E. (2002): Etablierung einer RNA vermittelten Resistenz gegen *Potato virus Y* - NTN in *Nicotiana benthamiana* Pflanzen. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land - und Forstwirtschaft 390, 498-499

Engelmann, J. ; Maiss, E. (2000): Erzeugung von RNA-vermittelter Virusresistenz durch Kombination von Virusgenen mit synthetischen CG-Sequenzen zur Erhöhung der DNA - Methylierung. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft 376, 465

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Edgar Maiß für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, sein großes Vertrauen in meine Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Günter Adam danke ich für die bereitwillige Übernahme des Ko Referats.

Dem Ministerium für Wissenschaft und Kultur möchte ich für die finanzielle Unterstützung zur Durchführung dieser Arbeit im Rahmen des Agrarforschungsschwerpunktes: "Agrarbiotechnologie in Niedersachsen" danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Poehling bedanke ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Maiß und des Instituts sei für die Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima gedankt. Mein besonderer Dank gilt Dirk, Ilona, Jutta, Mark, Shranga, Andy und Wulf für Ihre Hilfe, sowie den Gärtnern Herrn Seelbinder und Herrn Arndt.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle Freunde auf deren Toleranz und Unterstützung ich mich die ganze Zeit verlassen konnte, insbesondere an Rudi, der mir immer treu zur Seite stand.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name Jill Engelmann
Geboren am 21.08.1971 in Berlin
Familienstand ledig

Schul Ausbildung

1977 – 1981 Grundschule Engelbostel
1981 – 1983 Orientierungsstufe Godshorn
1983 – 1990 Gymnasium Langenhagen

Ausbildung

1991 – 1993 Ausbildung zur staatlich geprüften Biologisch - Technischen Assistentin an der berufsbildende Schule S. Blindow, Hannover
1993 – 1998 Gartenbaustudium an der Universität Hannover; Abschluss: Dipl.- Ing. agr. Fachrichtung Gartenbau; Diplomarbeitsthema: "Expression, Reinigung und Interaktion der Helferkomponente und des Hüllproteins des *Plum pox virus* (PPV)"

Berufspraxis

Juni 1993 – Juni 1994 Biologisch-Technische Assistentin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Botanisches Institut
Nov. 1994 – Nov. 1995 Biologisch-Technische Assistentin in Teilzeitbeschäftigung bei AKO, Salze und Gewürze Vertriebs GmbH, Ronnenberg
Juli 1997 – Sept. 1997 Hilfwissenschaftlerin, der Universität Hannover, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz des Fachbereichs Gartenbau, Abteilung Molekulare Phytopathologie
April 1998 – Dez. 1998 Hilfwissenschaftlerin, der Universität Hannover, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz des Fachbereichs Gartenbau, Abteilung Molekulare Phytopathologie
Jan. 1999 – Dez. 2003 wissenschaftliche Angestellte der Universität Hannover, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz des Fachbereichs Gartenbau, Abteilung Molekulare Phytopathologie
seit März 2005 Wissenschaftliche Angestellte in der Biologischen Bundesanstalt Braunschweig, Institut für Virologie, Mikrobiologie und gentechnische Sicherheit, Abteilung Elektronenmikroskopie

Praktika

März 1997 – Apr. 1997 Praktikum bei der Baumschule Lorberg, Brandenburg
Feb. 1996 – Apr. 1996 Praktikum im botanischen Schulgarten, Hannover
Juli 1990 – Dez. 1990 Praktikum als Biologisch-Technische Assistentin bei der Firma Ökolimna in Großburgwedel

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen, als solche kenntlich gemacht habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass ich den Doktorgrad nicht besitze und mich auch früher nicht um den Doktorgrad beworben habe.

Hannover, im Dezember 2005