

**Untersuchungen zum Auftreten rekombinanter Potyviren
in Mischinfektionen und virusresistenten transgenen
Pflanzen (VRTP) sowie Nachweise zur Virusverteilung
in doppelinfizierten Pflanzen**

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

Doktors der Gartenbauwissenschaften
- Dr. rer. hort. -

genehmigte Dissertation von
Dipl.-Ing. agr. Christof Dietrich
geboren am 14.06.1971 in Wehrda/Marburg a.d. Lahn

Referent

Prof. Dr. Edgar Maiß

Koreferent

Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach

Tag der Promotion

10.11.2004

**Für
Alexandra,
Merret und Hauke**

Zusammenfassung

Rekombination bei RNA-Pflanzenviren kann zu genetisch fixierten Modifikationen im viralen Genom führen. Dieser natürliche Vorgang ist Teil der Evolution von Viren und tritt in Mischinfektionen auf. Rekombination ist aber auch zwischen einem Pflanzenvirus und der mRNA des Transgens virusresistenter transgener Pflanzen (VRTP) beobachtet worden, wenn eine VRTP von einem Virus infiziert wurde, das Sequenzhomologien mit dem Transgen aufweist. Ob und wie häufig RNA-Rekombination bei unterschiedlichen Potyviren auftritt, wurde in Mischinfektionen des nicht-aphidenübertragbaren *Plum pox virus* (PPV-NAT) und des *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) in nicht-transgenen *Nicotiana benthamiana* Pflanzen, sowie in TVMV-infizierten transgenen *N. benthamiana* Pflanzen untersucht, die PPV-Hüllproteine exprimieren. Für eine spätere Risikobewertung von VRTP sollten die Rekombinationsraten von Viren in mischinfizierten, nicht-transgenen Pflanzen mit denen aus einzeln infizierten VRTP verglichen werden.

Ein Sequenzvergleich von PPV-NAT und TVMV ergab, dass in den am 3'-Ende der Genome lokalisierten Cistrons des Kerneinschlusskörpers b (NIb) und des Hüllproteins, die größten Übereinstimmungen von bis zu 62% und zwei 16 bzw. 18 Nukleotide große, perfekt konservierte Regionen vorliegen. Da Sequenzhomologie eine Voraussetzung für Rekombination ist und in diesem Bereich bei natürlichen PPV-Isolaten Rekombination bekannt ist, wurde die Suche nach Rekombinationsereignissen auf den 3'-Terminus von PPV-NAT und TVMV konzentriert. Für jedes Virus wurden drei spezifische Primerpaare entwickelt, deren ca. 1000 Nukleotide großen Produkte ein Drittel der Genome repräsentieren. Mit diesen Primern wurde eine RT-PCR entwickelt und soweit optimiert, dass ein rekombinantes Molekül aus 10^6 parental Molekülen zu detektieren ist. Trotz der hohen Sensitivität konnten weder in Mischinfektionen, noch in VRTP rekombinante Viren nachgewiesen werden.

Da die grundlegende Voraussetzung für ein Rekombinationsereignis das Vorliegen beider Rekombinationspartner in einer Zelle ist, wurden PPV-NAT und TVMV mit unterschiedlichen Reportergenen (smRS-GFP, DsRed) markiert, um die Lokalisation der Viren in einer Mischinfektion erkennen zu können. Zum Vergleich wurden auch Doppelinfectionen der Potyviren mit einem markierten Potexvirus (*Potato virus X*, PVX) untersucht. Es zeigte sich, dass die PVX/Potyviruskombinationen nicht nur zu dem aus der Literatur bekannten Synergismus führten, sondern auch, dass beide Viruspopulationen in der Lage sind größere Gewebereiche gemeinsam zu infizieren. In Mischinfektionen zweier Potyviren oder identischer, aber unterschiedlich markierter Viren kam es dagegen zu einer Trennung der Viruspopulationen. Hier gab es nur wenige mischinfizierte Zellen entlang der Grenze zweier aufeinandertreffender Viruspopulationen. Dieser Effekt war über mindestens 28 Tage

konstant und konnte in anderen *Nicotiana*-Arten bzw. PPV-transgenen Pflanzen (s.o.), sowie mit weiteren markierten Potyviren (*Clover yellow vein virus* und *Potato virus Y*) bestätigt werden.

Die biologischen Eigenschaften zweier künstlich hergestellter PPV-Rekombinanten, bei denen das PPV-NAT-Hüllprotein durch korrespondierende Sequenzen anderer PPV-Isolate ausgetauscht war, wurden untersucht. Die artifiziellen Rekombinanten führten im Gegensatz zu den Elternviren auf *Chenopodium quinoa* zur Symptomausprägung in Form von klar erkennbaren Lokalläsionen.

Für die Risikobewertung von VRTP kann abgeleitet werden, dass die Rekombinationsraten aus mischinfizierten nicht-transgenen Pflanzen mit solchen aus VRTP nicht unmittelbar verglichen werden können, da die Anzahl doppelt infizierter Zellen sehr unterschiedlich sein kann. Dass VRTP hinsichtlich des Auftretens von Rekombinationen ein Risiko darstellen, konnte für die verwendeten Viruskombinationen und VRTP nicht belegt werden. Die Ergebnisse werden hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Risikobewertung von VRTP und im Zusammenhang mit der Evolution von Pflanzenviren diskutiert.

Schlagwörter: Potyviren, Rekombination, Mischinfektionen

Abstract

Recombination can lead to genetically fixed changes in plant viral RNA genomes. This natural process is an integral part of virus evolution and can occur in mixed infections. Recombination can also be observed in virus-resistant transgenic plants (VRTP) between a virus and transgenic mRNA when the transgene and the challenging virus share a certain level of sequence homology.

The frequency of RNA recombination between two potyviruses was investigated. For this purpose, mixed infections of the non-aphid-transmissible *Plum pox virus* (PPV-NAT) and *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) in non-transgenic *Nicotiana benthamiana* plants were examined as well as single infections of PPV coat protein transgenic *N. benthamiana* plants infected with TVMV. Finally, the comparison of recombination rates observed in TVMV/PPV-NAT mixed infections with those from TVMV infected PPV transgenic plants should provide basic data for evaluation of recombinational gene flow presenting a potential risk in the use of virus genes to confer resistance.

Sequence alignment of PPV-NAT and TVMV showed that among the RNA genomes highest similarities (up to 62% identical nucleotides) are found in the 3'-localized cistrons, the gene for the nuclear inclusion body b (Nlb) and the coat protein. In both genes, two perfectly conserved motifs of 16 and 18 nucleotides, respectively, exist. Because high sequence similarity (identity) is a prerequisite for RNA recombination and natural crossover sites of PPV isolates exist at the 3'-end of the Nlb cistron upstream of the coat protein coding region, the search for recombination events focussed on the 3'-end of PPV-NAT and TVMV. Sets of three primer pairs covering the 3'-region of each virus were designed to amplify three overlapping fragments per virus, with each pair amplifying a genome fragment of about 1000 nucleotides. With the RT-PCR subsequently developed it was possible to detect one recombinant out of 10^6 parental molecules. However, despite its high sensitivity, neither in PPV-NAT/TVMV mixed infections of non-transgenic *N. benthamiana* plants nor in PPV transgenic *N. benthamiana* plants infected with TVMV, recombinant viruses were detected.

The occurrence of recombination events is bound to the simultaneous presence of putative recombination partners in one cell. To investigate if PPV-NAT and TVMV co-localise within doubly infected plant tissues, recombinant viruses labelled with different reporter genes (smRS-GFP, DsRed) were generated and mixed virus infections established. For comparison, double infections with a non-related virus, the potyvirus *Potato virus X* (PVX) and one of the potyviruses were carried out. As expected from earlier reports, the PVX/potyvirus infections led to synergistic symptom development on *N. benthamiana* plants. Concurrently, PVX and potyviruses were shown to be co-localised within larger areas of the infected tissues. In contrast, extensive co-localisation of two potyviruses as well as co-

localisation of two identical but differently labelled viruses was not observed. In these cases a spatial separation of the virus populations was evident, while doubly infected cells were only rarely found along the borderline of two adjacent populations. The effect of spatial separation was constant for at least 28 days. It also occurred in other *Nicotiana* species or PPV transgenic plants (see above) and was confirmed by using additional labelled potyviruses (*Clover yellow vein virus*, *Potato virus Y*).

The biological properties of two *in vitro* generated PPV recombinants, in which the PPV-NAT coat protein was replaced by the corresponding region of other PPV isolates, were investigated. Unlike the parental viruses these artificial recombinants induced local lesions on *Chenopodium quinoa*.

With regards to risk assessment of VRTP, the data obtained show that recombination rates of mixed infections cannot be compared with those of VRTP since the numbers of double infected cells in natural situations may differ drastically. From the experimental evidences obtained, it cannot be concluded that, at least for TVMV infected PPV transgenic plants, recombinational gene flow presents a risk of using VRTP. Further impacts of the results on risk assessment of VRTP are highlighted and, additionally, are discussed in relation to plant virus evolution.

Keywords: potyvirus, recombination, mixed infections

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Verzeichnis der Abbildungen	V
Verzeichnis der Tabellen.....	VIII
Glossar	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Virusresistente transgene Pflanzen	1
1.1.1 Mit VRTP potenziell verbundene Risiken	5
1.1.2 Rekombination in Mischinfektionen und VRTP	7
1.1.3 Risikobewertung von VRTP.....	8
1.2 Verteilung von Pflanzenviren in Mischinfektionen	11
1.3 Vorstellung der Viren.....	12
1.3.1 <i>Plum pox virus</i> (PPV).....	12
1.3.2 <i>Tobacco vein mottling virus</i> (TVMV).....	17
1.3.3 Replikation, Ausbreitung in der Pflanze und Aphidenübertragung bei Potyviren .	19
1.3.4 <i>Potato virus X</i> (PVX)	21
1.4 Reportergene	24
1.4.1 Das "green fluorescent protein" – GFP	25
1.4.2 Das "red fluorescent protein" – DsRed.....	28
1.5 Zielsetzung.....	30
2 Material & Methoden.....	33
2.1 Material.....	33
2.1.1 Pflanzenmaterial	33
2.1.2 Viren und virale Klone.....	34
2.1.3 Antikörper	35
2.1.4 Plasmide, Klonierungsvektoren und Nukleinsäuren	35
2.1.5 Reaktionskits	37
2.1.6 Bakterienstamm zur Klonierung	37
2.1.7 Enzyme und Reaktionspuffer.....	37
2.1.8 Chemikalien	40
2.1.9 Geräte	42
2.1.9.1 Partikelkanone.....	43
2.1.9.2 Epifluoreszenzmikroskop	44
2.1.9.3 Konfokales Laser Scan Mikroskop (CLSM)	45

2.1.10 Sonstige Materialien	45
2.1.11 Software	46
2.2 Methoden.....	46
2.2.1 Anzucht des Pflanzenmaterials	46
2.2.2 DNA-Präparation aus <i>N.benthamiana</i> Pflanzen.....	46
2.2.3 RNA-Präparation aus <i>N.benthamiana</i> Pflanzen.....	47
2.2.3.1 RNA-Präparation nach Verwoerd et al. (1989).....	47
2.2.3.2 RNA-Präparation nach Menzel et al. (2002).....	48
2.2.4 "Tissue print immuno assay" (TPIA)	50
2.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	51
2.2.5.1 Primerdesign	52
2.2.5.2 RT-PCR	53
2.2.5.3 Reamplifikation von PCR- und RT-PCR-Produkten.....	54
2.2.5.4 Identifikation von rekombinanten RNA-Sequenzen mittels RT-PCR	55
2.2.6 Reinigung von PCR- und RT-PCR-Produkten	56
2.2.7 Proteinase K-Verdau.....	56
2.2.8 Phenol/Chlorophorm-Extraktion	57
2.2.9 Na-Acetat/Ethanol-Fällung.....	57
2.2.10 T7-Transkription	58
2.2.11 Präparativer und analytischer Restriktionsverdau.....	59
2.2.12 Präparative und analytische Gelelektrophorese	60
2.2.13 Präparation von DNA aus Agarosegelen	62
2.2.14 Klenow-Reaktion	62
2.2.15 Dephosphorylierung von Vektoren	63
2.2.16 Ligation	64
2.2.17 Klonierung	65
2.2.17.1 Herstellung kompetenter Zellen	66
2.2.17.2 Chemische Transformation kompetenter <i>E. coli</i> NM522.....	67
2.2.17.3 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> NM522 zur Lagerung	68
2.2.17.4 Quick-Transformation.....	69
2.2.17.5 Selektion transformierter Zellen	69
2.2.18 Plasmid-DNA Präparation aus <i>E. coli</i> NM 522	70
2.2.18.1 Analytische Plasmid-DNA Präparation (Klare Lysate)	70
2.2.18.2 Präparative Plasmid-DNA Präparation	71
2.2.18.3 Herstellung von Bakteriendauerkulturen	73
2.2.19 Sequenzierung	73
2.2.20 Partikelbombardement von <i>N. benthamiana</i> Pflanzen.....	74

2.2.20.1	Präparation von Plasmid-DNA zum Partikelbombardement	74
2.2.20.2	Durchführung des Partikelbombardements	74
2.2.21	Mechanische Übertragung von Pflanzenviren	75
2.2.22	Konservieren von virusinfiziertem Pflanzenmaterial	76
2.2.23	Fluoreszenzmikroskopie	76
2.2.23.1	Epifluoreszenzmikroskopie	77
2.2.23.2	Konfokale Laser Scan Mikroskopie (CLSM)	77
3	Ergebnisse	84
3.1	Entwicklung einer RT-PCR zum Nachweis rekombinanter PPV-NAT/TVMV-Sequenzen	84
3.1.1	Konservierte Regionen zwischen PPV-NAT und TVMV	84
3.1.2	Primer zur Detektion von TVMV/PPV-NAT-Rekombinanten	86
3.1.3	Test der Primer unter Standardbedingungen	88
3.1.4	Optimierung der RT-PCR	92
3.1.5	Detektionsgrenze des Nachweisverfahrens	96
3.1.5.1	Klonierung eines Plasmids mit chimärer PPV-NAT/TVMV-Sequenz	97
3.1.5.2	Bestimmung der Nachweisgrenze von pTBrec10TP-Transkripten	97
3.1.6	Untersuchung von PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten nicht-transgenen <i>N. benthamiana</i> Pflanzen	99
3.1.7	Untersuchung von TVMV-infizierten PPV-transgenen <i>N. benthamiana</i> Pflanzen	101
3.2	Untersuchungen <i>in vitro</i> -hergestellter rekombinanter PPV-NAT-"full-length"-Klone.	103
3.3	Mischinfektionen von fluoreszenzmarkierten Viren	105
3.3.1	Konventionelle Fluoreszenz- und konfokale Laser Scan Mikroskopie	105
3.3.2	Markierung von p35PPV-NAT mit smRS-GFP bzw. DsRed	108
3.3.3	Markierung von p35PPV-NAT/SoC mit DsRed	113
3.3.4	Markierung von p35TVMV mit smRS-GFP bzw. DsRed	115
3.3.5	Mischinfektionen von PVX und verschiedenen Potyviren	120
3.3.6	Mischinfektionen unterschiedlich markierter Viren gleichen Ursprungs	123
3.3.7	Mischinfektionen verschiedener, unterschiedlich markierter Potyviren	125
3.3.8	Längerfristige Beobachtung der getrennten Verteilung	127
3.3.9	Zeitlich verzögerte Inokulationen zweier unterschiedlich markierter PVX-Populationen	127
3.3.10	Mischinfektion PPV-transgener <i>N. benthamiana</i> Pflanzen mit unterschiedlich markierten Viren	129
3.3.11	Mischinfektionen unterschiedlich markierter Viren in verschiedenen Tabakarten	129

3.3.12 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Verteilung von Viruspopulationen in Mischinfektionen	130
4 Diskussion	132
4.1 Entwicklung eines RT-PCR-Systems zum Nachweis rekombinanter PPV-NAT/TVMV-Sequenzen	132
4.1.1 Untersuchungen von PPV-NAT/TVMV-Mischinfektionen nicht-transgener Pflanzen hinsichtlich des Auftretens rekombinanter Viren.....	134
4.1.2 Untersuchungen von TVMV-infizierten PPV-transgenen <i>N. benthamiana</i> Pflanzen hinsichtlich des Auftretens rekombinanter Viren.....	138
4.2 Versuche mit <i>in vitro</i> -hergestellten PPV-Rekombinanten	140
4.3 Verteilung fluoreszenzmarkierter Viren in Mischinfektionen	144
4.3.1 Klonierung von Reportergenen in potyvirale "full-length"-Klone	145
4.3.2 Unterschiedlich markierte PVX- und Potyviruspopulationen	147
4.3.3 Kombinationen unterschiedlich markierter Populationen eines Virus oder von Viren des gleichen Genus	149
4.3.4 Mögliche Ursachen und Konsequenzen für die getrennte Verteilung von Viruspopulationen.....	151
4.4 Verteilung von Viruspopulationen und Auftreten rekombinanter Viren	156
4.5 Risikobewertung virusresistenter transgener Pflanzen	161
4.6 Schlussbetrachtung.....	164
5 Literatur.....	166
6 Anhang.....	186
6.1 Filtersätze für die Epifluoreszenzmikroskopie	186
6.2 Sequenz des 3'-terminalen Teils des PPV-NAT-Genoms mit Lage von Primern und konservierten Regionen	187
6.3 Sequenz des 3'-terminalen Teils des TVMV-Genoms mit Lage von Primern und konservierten Regionen	189
6.4 Fragmente des DNA-Größenmarkers λ - <i>Pst</i> I.....	191
7 Veröffentlichungen	192

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1-1	Genomorganisation und Polyproteinprozessierung des nicht-aphiden- übertragbaren <i>Plum pox virus</i> (PPV-NAT).....	14
Abbildung 1-2	Genomorganisation und -expression des <i>Potato virus X</i> (PVX)	22
Abbildung 1-3	Die Qualle <i>Aequorea victoria</i> als Herkunft des "green fluorescent protein" (GFP).....	25
Abbildung 1-4	Herkunft von DsRed und Homologien zu GFP	29
Abbildung 2-1	Expressionskassette der PPV-transgenen <i>N. benthamiana</i> Linie 17. 27.4 ..	33
Abbildung 2-2	Expressionskassette der PPV-transgenen <i>N. benthamiana</i> Linie 4.30.45 ...	34
Abbildung 2-3	Heterologe Primerkombinationen zur Identifikation rekombinanter Nukleinsäuren.....	55
Abbildung 2-4	Aufbau einer Partikelkanone.....	75
Abbildung 2-5	Schematische Darstellung des konfokalen Prinzips	78
Abbildung 3-1	Nukleotidsequenzen der konservierten Regionen CR1 und CR2 von PPV-NAT und TVMV	85
Abbildung 3-2	Graphische Darstellung der Lokalisation der Primerpaare und der zu amplifizierenden Fragmente auf dem jeweiligen 3'-terminalen Bereich der Genome von PPV-NAT (A) und TVMV (B).....	86
Abbildung 3-3	Temperaturgradient für das Primerpaar P10+/P10-	88
Abbildung 3-4	Überprüfung der Primerpaare mittels Standard-PCR und -RT-PCR	89
Abbildung 3-5	Standard-RT-PCR mit heterologen Primerkombinationen und RNA aus PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten Pflanzen.....	90
Abbildung 3-6	Standard-RT-PCR mit heterologen Primerkombinationen und RNA aus PPV-NAT- und TVMV-einzelinfizierten Pflanzen	91
Abbildung 3-7	MgSO ₄ -Gradient mit T10+/ T10- in einer RT-PCR (Invitrogen Kit).....	92
Abbildung 3-8	RT-PCR mit heterologen Primerkombinationen (Invitrogen Kit)	93
Abbildung 3-9	RT-PCR mit heterologen Primerkombinationen mit dem Invitrogen Kit unter optimierten Bedingungen.....	96
Abbildung 3-10	Klonierung des Kontrollplasmids pTBrec10TP	98
Abbildung 3-11	Detektionsgrenze von pTBrec10TP-Transkripten in <i>A. bidest.</i> (A) bzw. in Gegenwart von Gesamt-RNA aus mischinfizierten Pflanzen (B) in einer RT-PCR mit den Primern T10+/P10-	99
Abbildung 3-12	Versuch der Detektion rekombinanter PPV-NAT/ TVMV-Sequenzen in PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten, nicht-transgenen <i>N. benthamiana</i> Pflanzen.....	101

Abbildung 3-13 Versuch der Detektion von rekombinanten PPV-NAT/TVMV-Sequenzen in TVMV-infizierten PPV-transgenen <i>N. benthamiana</i> Pflanzen (4.30.45) .	102
Abbildung 3-14 Lokalläsionen auf <i>C. quinoa</i> verursacht durch PPV-NAT/SoC und PPV-NAT/AT	104
Abbildung 3-15 Verschiedene Filtersätze zur Detektion von smRS-GFP- bzw. DsRed-Fluoreszenz in transient exprimierenden Epidermiszellen von <i>N. benthamiana</i> im Epifluoreszenzmikroskop.....	106
Abbildung 3-16 Darstellung von smRS-GFP-Fluoreszenz in einer transient exprimierenden <i>N. benthamiana</i> Epidermiszelle mit dem CLSM.....	107
Abbildung 3-17 Herstellung von Subklonen mit 3'-terminalen Sequenzen des PPV-NAT ...	109
Abbildung 3-18 Klonierung des Markergens DsRed in p35PPV-NAT.....	111
Abbildung 3-19 Schematische Darstellung der Insertion von smRS-GFP und DsRed in p35PPV-NAT- <i>AgfpS</i> bzw. p35PPV-NAT- <i>red</i>	112
Abbildung 3-20 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p35PPV-NAT/SoC- <i>red</i>	114
Abbildung 3-21 Zwischenklonierung des DsRed-PCR-Produkts nach Amplifikation mit den Primern TVMV- <i>redup</i> /TVMV- <i>redlow</i> zur späteren Klonierung von pe35TVMV- <i>red</i>	115
Abbildung 3-22 Herstellung des TVMV-Subklons pSport <i>BshTI/Sall</i>	116
Abbildung 3-23 Strategie zur Klonierung des DsRed-markierten TVMV-"full-length"-Klons pe35TVMV- <i>red</i>	117
Abbildung 3-24 Schematische Darstellung der Insertion von DsRed und smRS-GFP in pe35TVMV.....	119
Abbildung 3-25 Gemeinsame Verteilung von PVX201- <i>optRed</i> und PPV-NAT- <i>AgfpS</i> in Epidermiszellen von <i>N. benthamiana</i>	122
Abbildung 3-26 Gemeinsame Verteilung von PVX201- <i>optRed</i> und PPV-NAT- <i>AgfpS</i> im Mesophyllgewebe von <i>N. benthamiana</i>	123
Abbildung 3-27 Getrennte Verteilung von unterschiedlich markierten Populationen des PPV-NAT in systemisch infizierten <i>N. benthamiana</i> Blättern.....	124
Abbildung 3-28 Getrennte Verteilung von unterschiedlich markierten Populationen des PPV-NAT im Mesophyllgewebe systemisch infizierter <i>N. benthamiana</i> Blätter	125
Abbildung 3-29 Getrennte Verteilung der Populationen von PPV-NAT- <i>red</i> (rot) und TVMV- <i>gfp</i> (grün).....	126
Abbildung 3-30 Getrennte Verteilung der Populationen von TVMV- <i>gfp</i> / PPV-NAT/SoC- <i>red</i> (A) bzw. TVMV- <i>red</i> und CIYVV-GFP (B)	126
Abbildung 3-31 Doppelinfektion von PVX0014- <i>red</i> und PVX201- <i>gfp</i> in <i>N. benthamiana</i> ...	128
Abbildung 3-32 Verteilung von Viruspopulationen in <i>N. clevelandii</i>	130

Abbildung 4-1	Mögliche Entstehungsorte rekombinanter und mutierter Viren in einer Mischinfektion von Populationen mit getrennter Virusverteilung	159
Abbildung 6-1	Filtersatz zur Detektion von S65T-GFP-Varianten in Pflanzengeweben	186
Abbildung 6-2	Filtersatz zur Detektion von CFP, YFP und DsRed in Pflanzengeweben...	186
Abbildung 6-3	DNA-Fragmente nach einem Verdau von λ -DNA mit <i>Pst</i> I	191

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1-1	Anzahl autorisierter Freisetzungen von VRTP in den USA.....	3
Tabelle 1-2	Anzahl autorisierter Freisetzungsverfahren von potyvirusresistenten transgenen Pflanzen (potyVRTP) in den USA.....	4
Tabelle 1-3	Beispiele für die Markierung von Pflanzenviren mit unterschiedlichen Varianten des Gens für das "green fluorescent protein" (GFP).....	27
Tabelle 2-1	Virusisolate	34
Tabelle 2-2	Virale "full-length"-Klone	35
Tabelle 2-3	Antikörper	35
Tabelle 2-4	Plasmide, Klonierungsvektoren und Nukleinsäuren	35
Tabelle 2-5	Oligonukleotidprimer	36
Tabelle 2-6	Reaktionskits	37
Tabelle 2-7	Bakterienstamm zur Klonierung.....	37
Tabelle 2-8	Restriktionsendonukleasen.....	37
Tabelle 2-9	DNA/RNA-modifizierende Enzyme	39
Tabelle 2-10	Polymerasen.....	39
Tabelle 2-11	Protein-abbauendes Enzym	40
Tabelle 2-12	Nukleotide.....	40
Tabelle 2-13	Feste Chemikalien	40
Tabelle 2-14	Flüssige Chemikalien.....	42
Tabelle 2-15	Laborgeräte	42
Tabelle 2-16	Bauteile der Partikelkanone nach Gray et al. (1994).....	43
Tabelle 2-17	Spektralbereiche der Filterkombinationen für das Axiophot	44
Tabelle 2-18	Sonstige Materialien	45
Tabelle 2-19	Software.....	46
Tabelle 2-20	Reaktionsbedingungen und Programm einer Standard-PCR.....	52
Tabelle 2-21	Reaktionsbedingungen und Programm einer Standard-RT-PCR.....	54
Tabelle 3-1	Vergleich der Nukleinsäuresequenzen von PPV-NAT und TVMV.....	85
Tabelle 3-2	Oligonukleotidprimer zur Detektion rekombinanter Potyvirussequenzen	87
Tabelle 3-3	Heterologe Primerkombinationen	90
Tabelle 3-4	RT-PCR Reaktionsansatz und Programm mit dem Invitrogen Kit zu Beginn der Optimierung	93
Tabelle 3-5	RT-PCR-Reaktionsansatz und Programm mit dem Invitrogen Kit nach der Optimierung	95

Tabelle 3-6	Primerkombinationen zur Detektion rekombinanter PPV-NAT/TVMV-Sequenzen in nicht-transgenen <i>N. benthamiana</i> Pflanzen.....	100
Tabelle 3-7	Primerkombinationen zur Detektion rekombinanter PPV-NAT/TVMV-Sequenzen in PPV-transgenen <i>N. benthamiana</i> Pflanzen	102
Tabelle 3-8	CLSM-Einstellungen für die Darstellung von smRS-GFP- bzw. DsRed-Fluoreszenz in <i>N. benthamiana</i> Gewebe.....	107
Tabelle 3-9	Mischinfektionen mit PVX/Potyviruskombinationen	121
Tabelle 3-10	Mischinfektionen mit unterschiedlich markierten Viren gleichen Ursprungs.....	123
Tabelle 3-11	Mischinfektionen mit unterschiedlich markierten Potyiren	127
Tabelle 3-12	Zusammenfassende Darstellung von getrennter und gemeinsamer Verteilung verschiedener, unterschiedlich markierter Viruspopulationen ...	131

Glossar

'	Minuten
"	Sekunden
% (v/v)	Volumenprozent/Volumen
%	Prozent
™	Trade Mark
λ	Wellenlänge in nm
©	"copy right" (Urheberrecht)
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ L)
µm	Mikrometer (10 ⁻⁶ m)
3'-NTR	3'-nichttranslatierte Region
35S	35S-Promotor des CaMV
5'-NTR	5'-nichttranslatierte Region
<i>A. bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
abs.	absolut
AHF	AHF Analysentechnik, Tübingen (Hersteller für Fluoreszenzfilter; hier als Filterbezeichnung, s.u.)
AHF _{EGFP}	Filtersatz für smRS-GFP-Fluoreszenz
AHF _{DsRed}	Filtersatz für DsRed-Fluoreszenz
AP	alkalische Phosphatase
Ap	Ampicillin
APHIS	"Animal and Plant Health Inspection Service" der USDA (s.u.)
APS	Ammoniumpersulfat
as	"antisense"
ATP	Adenosin-Triphosphat
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	kopierte DNA ("copy DNA")
Cfu	"colony forming units"

CLSM	"confocal laser scanning microscopy", Konfokale Laser Scan Mikroskopie
cm	Zentimeter
CP	Hüllprotein ("coat protein")
cv	cultivar
d.h.	das heißt
DAPI	Diamidino-2-Phenylindol (Nukleinsäurefarbstoff)
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
DICER	dsRNAse im RNAi-Modell
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("desoxyribonucleic acid")
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat (G/A/T/C)
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DsRed	rot fluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma striata</i>
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym gekoppelter, Antikörper gebundener Nachweis ("enzyme-linked immunosorbent assay")
et al.	et alii (lat.: und andere)
EtOH	Ethanol
fg	Femtogramm (10^{-15} g)
g	Gramm
g	Gravitationskonstante, 9,81 m/s
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequoria victoria</i>
"glow over"	in der CLSM Software zuweisbare Falschfarbe, die übersteuerte Maximalwerte im digitalen Bild blau darstellt
"glow over/under"	Kombination von "glow over" und "glow under", CLSM Optionen
"glow under"	Falschfarbe, die Minimalwerte im digitalen Bild grün darstellt (CLSM)
gus	α -Glucuronidase aus <i>E. coli</i>
h	Stunde ("hour")

HC-Pro	Helferkomponente Protease ("helpercomponent protease")
Hrsg	Herausgeber
IPP	Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Universität Hannover
IPS	"Instrument Parameter Setting", definierter Aufnahmeparametersatz in der CLSM Software
IPTG	Isopropyl- α -D-thio-galactopyranosid
ISB	"Information Systems for Biotechnology", US amerikanische Datenbank (http://www.isb.vt.edu/)
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kn	Kanamycin
L	Liter
LM	niedrig schmelzend (low melting)
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	Mehrfachklonierungsort ("multiple cloning site")
MES	Morpholinethansulfonsäure
mg	Milligramm (10^{-3} g)
min	Minuten
ml	Milliliter (10^{-3} L)
mm	Millimeter (10^{-3} m)
mM	millimolar (10^{-3} M)
mRNA	messenger RNA
NCBI	Biotechnologieinformationszentrum der USA ("National Center for Biotechnology Information", http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
ng	Nanogramm (10^{-9} g)
nm	Nanometer (10^{-9} m)
nos	Nopalinsynthetase
nosA	Polyadenylierungssignal aus nos
nt	Nukleotide
NTR	nichttranslatierter Bereich ("nontranslated region")
OD	optische Dichte
OD550	optische Dichte gemessen bei 550 nm
ORF	offenes Leseraster ("open reading frame")
pA-CaMV	Polyadenylierungssignal des CaMV
PCR	Polymerase Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PEG	Polyethylenglykol

PIG	Partikelkanone ("partikel inflow gun")
pg	Picogramm (10^{-12} g)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
potyVTRP	potyvirusresistente transgene Pflanze
PTGS	posttranskriptionelles "gene silencing"
RISC	RNAi-spezifischer Komplex
RNA	Ribonukleinsäure ("ribonucleic acid")
RNAi	RNA-"interference"
RNase	Ribonuklease
rpm	Drehzahl ("revolutions per minute")
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur (20 – 22°C)
s	"sense"
S	Swedberg (Sedimentationskoeffizient)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ("Sodium-Dodecyl-Sulfate")
smBFP	GFP-Variante (Aminosäuresubstitutionen Y66H, F99S, M153T und V163A)
smGFP	GFP-Variante (Aminosäuresubstitutionen F99S, M153T und V163A)
smRS-GFP	GFP-Variante (Aminosäuresubstitutionen S65T, F99S, M153T und V163A)
sp.	Spezies
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure ("single stranded DNA")
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
T7	Bakteriophage T7
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TGB	"triple gene block" (z.B. PVX)
TKS	Torfkultursubstrat
Tm	Schmelztemperatur
TPIA	"tissue print immuno assay"
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit ("unit")
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
USDA	"United States Department of Agriculture"
UV	Ultraviolett

V	Volt
Vol.	Volumen
VPg	genomgebundenes virales Protein (Viral protein genome-linked)
VRTP	Virus-resistente transgene Pflanze
W	Watt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid
X-gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-beta-D-Glucoronid
z.B.	zum Beispiel

Nukleinsäuren und Aminosäuren

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
A (Ala)	Alanin
C (Cys)	Cystein
D (Asp)	Aspartatsäure
E (Glu)	Glutaminsäure
F (Phe)	Phenylalanin
G (Gly)	Glycin
H (His)	Histidin
I (Ileu)	Isoleucin
K (Lys)	Lysin
L (Leu)	Leucin
M (Met)	Methionin
N (Asn)	Asparagin
P (Pro)	Prolin
Q (Gln)	Glutamin
R (Arg)	Arginin
S (Ser)	Serin
T (Thr)	Threonin
V (Val)	Valin
W (Trp)	Tryptophan
Y (Tyr)	Tyrosin

Virusnamen und Akronyme

Virusnamen und deren Akronyme werden entsprechend der offiziellen Nomenklatur des International Committee on Taxonomy of Viruses (van Regenmortel *et al.*, 2000) verwendet.

<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)	<i>Plum pox virus</i> , "sour cherry" (PPV-SoC)
<i>Avian myeloblastosis virus</i> (AMV)	<i>Plum pox virus</i> (PPV)
<i>Barley yellow dwarf virus</i> (BYDV)	<i>Potato leafroll virus</i> (PLRV)
<i>Barley yellow mosaic virus</i> (BYMV)	<i>Potato virus A</i> (PVA)
<i>Bean common mosaic virus</i> (BCMV)	<i>Potato virus X</i> (PVX)
<i>Bean dwarf mosaic virus</i> (BDMV)	<i>Potato virus Y</i> (PVY)
<i>Bean yellow mosaic virus</i> (BYMV)	<i>Rabbit hemorrhagic disease virus</i> (RHDV)
<i>Beet necrotic yellow vein virus</i> (BNYVV)	<i>Raspberry bushy dwarf virus</i> (RBDV)
<i>Beet yellows virus</i> (BYV)	<i>Soil-borne wheat mosaic virus</i> (SBWMV)
<i>Brome mosaic virus</i> (BMV)	<i>Sorghum mosaic virus</i> (SrMV)
<i>Cacao yellow mosaic virus</i> (CYMV)	<i>Soybean mosaic virus</i> (SMV)
<i>Canine parvovirus</i> (CPV)	<i>Sugarcane mosaic virus</i> (SCMV)
<i>Cauliflower mosaic virus</i> (CaMV)	<i>Sweet potato feathery mottle virus</i> (SPFMV)
<i>Clover yellow vein virus</i> (CIYVV)	<i>Tobacco etch virus</i> (TEV)
<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i> (CCMV)	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)
<i>Cowpea mosaic virus</i> (CPMV)	<i>Tobacco rattle virus</i> (TRV)
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	<i>Tobacco vein mottling virus</i> (TVMV)
<i>Cucumber necrosis virus</i> (CNV)	<i>Tomato aspermy virus</i> (TAV)
<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV)	<i>Tomato bushy stunt virus</i> (TBSV)
<i>Groundnut rosette virus</i> (GRV)	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)
<i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV)	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)
<i>Maize dwarf mosaic virus</i> (MDMV)	<i>Turnip mosaic virus</i> (TuMV)
<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV)	<i>Turnip yellow mosaic virus</i> (TYMV)
<i>Pea early-brownig virus</i> (PEBV)	<i>Watermelon mosaic virus 2</i> (WMV-2)
<i>Pea seed-borne mosaic virus</i> (PsBMV)	<i>Wheat streak mosaic virus</i> (WSMV)
<i>Pepper ringspot virus</i> (PepRV)	<i>Yam mild mosaic virus</i> (YMV)
<i>Plum pox virus</i> , "non-aphid transmissible" (PPV-NAT)	<i>Yam mosaic virus</i> (YMMV)
<i>Plum pox virus</i> , "aphid transmissible" (PPV-AT)	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV)

1 Einleitung

1.1 Virusresistente transgene Pflanzen

Virusresistente transgene Pflanzen (VRTP) sind Pflanzen, die mit einer kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz eines Pflanzenvirus transformiert wurden und dadurch eine Resistenz gegenüber einem Pflanzenvirus aufweisen. Da diese Form der Virusresistenz auf der Expression viraler Sequenzen basiert, spricht man hierbei auch von Pathogenvermittelter Resistenz, einem Konzept, das auf Sanford & Johnston (1985) zurückgeht. Dieser Ansatz wurde erstmals erfolgreich von Powell-Abel et al. (1986) angewendet. Die Autoren transformierten Tabakpflanzen mit der für das Hüllprotein (CP) kodierenden Sequenz des *Tobacco mosaic virus* (TMV), woraufhin diese Pflanzen die TMV-mRNA und das Hüllprotein exprimierten. Wurden diese Pflanzen mit TMV inokuliert, zeigten sie eine stark verzögerte, im weiteren Versuchsverlauf abgeschwächte, Symptomausprägung im Vergleich zur nicht-transgenen Kontrolle. Allerdings war diese Resistenz nur bei niedrigen Inokulumsdichten ausgeprägt.

Seit diesem ersten Bericht wurde bis heute eine beachtliche Vielzahl von VRTP zur Klärung von wissenschaftlichen Fragestellungen und für kommerzielle Zwecke hergestellt. Die Herstellung von transgenen Pflanzen kann nach verschiedenen Methoden durchgeführt werden. Zum Einsatz kommen im Bereich der zweikeimblättrigen Pflanzen jedoch hauptsächlich Methoden, die auf der Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* aufbauen. Hierbei wird in dem Ti-Plasmid von *A. tumefaciens* die T-DNA, auf der Gene für die Tumor- und Opimbildung lokalisiert sind, gegen das interessierende Fremdgen ausgetauscht. Statt der T-DNA wird dann das Fremdgen durch die Bakterien in das Pflanzengenom integriert. Da die Herstellung transgener Pflanzen nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, sei für Details auf Übersichtsartikel von Grumet (1995), Lomonosoff (1995) und Baulcombe (1996) verwiesen.

Die Herstellung von VRTP zielte bislang fast ausschließlich auf Resistenzen gegenüber RNA-Viren ab, ist aber auch gegenüber DNA-Viren möglich (Pooggin et al., 2003). Die im Folgenden dargestellten Zusammenhänge beziehen sich daher auf RNA-Viren. Der einer Virusresistenz zu Grunde liegende Mechanismus kann bei den jeweiligen VRTP unterschiedlich sein. Es lassen sich prinzipiell zwei Mechanismen unterscheiden. Zum einen wurde im oben genannten Beispiel von Powell-Abel et al. (1986) die Protein-vermittelte Resistenz beschrieben. Danach kann ein TMV-*Virion* beim Eintritt in Zellen einer TMV-resistenten Pflanze seinen Hüllproteinmantel nicht ablegen ("uncoating"), was zur

Replikation des TMV-Genoms aber notwendig wäre. Stattdessen wird das Virus durch das von der Pflanze gebildete Hüllprotein immer wieder neu verpackt. Der zweite Mechanismus, der postuliert wurde, beschreibt eine RNA-vermittelte Resistenz. Frühe Beobachtungen von Harrison et al. (1987) und Gerlach et al. (1987) zeigten, dass die Expression von st-RNAs des *Cucumber mosaic virus* (CMV) bzw. des *Tobacco ringspot virus* (TRSV) wahrscheinlich zu einer Konkurrenzsituation bei der Replikation des infizierenden Virus und damit zur Unterdrückung der Infektion führt. Ein hohes Resistenzniveau gegenüber dem *Tobacco etch virus* (TEV) konnten Lindbo et al. (1993) in VRTP nachweisen, die als Transgen eine TEV-Hüllproteinsequenz trugen, deren mRNA nicht translatierbar war. In den Pflanzen konnten nach einer Inokulation mit TEV zwar systemische Symptome beobachtet werden, jedoch erholten sich die VRTP von diesen Infektionen ("recovery"). Die "recovery"-resistenten Pflanzen waren dann vollständig resistent gegenüber einer erneuten Infektion. Da in diesen Pflanzen auch die mRNA des Transgens auf ein nicht-detectierbares Niveau sank, wurde diese Resistenzform durch eine Sequenz-spezifische RNA-Degradation ("RNA interference", RNAi) erklärt und der zugrunde liegende Mechanismus als posttranskriptionelles "gene silencing" (PTGS) bezeichnet (Baulcombe, 1996). Prinzipiell werden beim PTGS dsRNAs von einer dsRNase (DICER) erkannt und in kleine, 21-25 Nukleotide lange RNAs ("short interfering" RNAs, siRNAs) prozessiert. DsRNAs entstehen im Falle einer Virusinfektion als replikative Intermediate oder bei VRTP z.B. bei der Verwendung sog. "inverted-repeat"-Konstrukte, in denen das Transgen aus einer sich gegensinnig wiederholenden Sequenz besteht, die als mRNA eine Schleifenstruktur mit doppelsträngigen Bereichen bildet. Die siRNAs werden dann in einen RNAi-spezifischen Komplex eingebunden (RISC), der durch Basenpaarung ssRNA (z.B. virale RNA) bindet, wenn diese homolog zur siRNA ist (Wassenegger, 1999; Baulcombe, 2002a). Die aus siRNA/Ziel-RNA entstehende dsRNA wird wiederum degradiert und der Prozess fortgesetzt, wobei sich das siRNA-Signal systemisch in der Pflanze ausbreiten kann (Voinnet & Baulcombe, 1997). Allerdings ist nach Waterhouse et al. (2001) der Mechanismus des "gene silencing" ein nicht auf transgene Pflanzen beschränkter Effekt, sondern vielmehr ein adaptiver Abwehrmechanismus von Pflanzen gegen Viren und Transposons. Es ist zu bemerken, dass Viren durch sog. Suppressoren in der Lage sind, PTGS zu unterdrücken und so die Pflanzen zu infizieren (Marathe et al., 2000; Baulcombe, 2002b; Roth et al., 2004). Zu diesen Suppressoren zählen die potyvirale HC-Pro, das 2b der Cucumoviren und das p25 der Potexviren (Carrington et al., 2001). Bei vielen VRTP jedoch können unterschiedliche Mechanismen an der Resistenzausprägung beteiligt sein. So zeigten Pang et al. (1996), dass die Resistenz transgener Salatpflanzen gegen das *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) RNA-vermittelt und gegen andere Tospoviren dagegen Protein-vermittelt war.

Eine aktuelle Übersicht zur weltweiten Situation des Anbaus bzw. der Freisetzung von VRTP lässt sich über den Internetauftritt der ISB-Datenbank ("Information Systems for Biotechnology"; <http://www.isb.vt.edu/>) beziehen. Von dieser Adresse aus können auch weitere Datenbanken bezüglich der Freisetzung oder des Inverkehrbringens genetisch modifizierter Organismen, wie die für das Gebiet der EU (<http://gmoinfo.jrc.it/>), angewählt werden. Da die meisten Antrags- bzw. Genehmigungsverfahren für VRTP Freisetzungen in den USA anhängig oder abgeschlossen sind und die Informationslage dort am umfangreichsten ist, beziehen sich die im Folgenden in Tabelle 1-1 zusammengestellten Daten auf Freisetzungsverfahren in den USA.

Tabelle 1-1 Anzahl autorisierter Freisetzungen* von VRTP in den USA

virale Sequenz	Virus	Anzahl der Freisetzungen**
CP, "sense"	verschiedene	541
CP, "antisense"	verschiedene	23
VPg	<i>Potato virus Y</i> (PVY)	5
HC-Pro	<i>Tobacco vein mottling virus</i> (TVMV)	5
CI	TVMV	3
MP	<i>Cacao yellow mosaic virus</i> (CYMV), <i>Raspberry bushy dwarf virus</i> (RBDV), <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV), <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	5
MP, nf	RBDV	3
Nla	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV), PVY, <i>Wheat streak mosaic virus</i> (WSMV)	17
Nib	PRSV, PVY, WSMV	22
17 kDa Protein	<i>Barley yellow dwarf virus</i> (BYDV), <i>Potato leafroll virus</i> (PLRV)	6
34 kDa Protein	TVMV	1
42 kDa Protein	TVMV	2
60 kDa Protein	<i>Tobacco rattle virus</i> (TRV)	3
ORF 1+2***	BYDV	1
Nukleokapsid	TSWV	22
Nukleoprotein	TSWV	3
Replikase***	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (CaMV), PLRV, <i>Potato virus A</i> (PVA), PRSV, <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)	106
Protease***	PVY, <i>Soybean mosaic virus</i> (SMV), TVMV	5
Satelliten RNA	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	1
Freisetzungen VRTP gesamt		856
Freisetzungen transgene Pflanzen gesamt		10373

*Antrags- bzw. Genehmigungsverfahren (Auszug aus <http://www.isb.vt.edu/>), Stand 08.03.2004; **verschiedene virale und nicht-virale Gensequenzen pro Freisetzung möglich; *** keine weiteren Angaben; nf = "nonfunctional", CP = Hüllprotein, VPg = virales genomgebundenes Protein, HC-Pro = Helferkomponente Protease; MP = Ausbreitungsprotein; Nla, Nib = Kerneinschlusskörper a bzw. b; ORF = offenes Leseraster

Wie Tabelle 1-1 zeigt, ist für die Schaffung von Pathogen-vermittelter Resistenz bei VRTP die Verwendung des Hüllproteins der betreffenden Viren von vorrangiger Bedeutung. Dies ist nach Tepfer (2002) in erster Linie historisch bedingt, da bei den ersten Transformationen von Pflanzen mit viralen Sequenzen Hüllproteingene benutzt wurden. Des Weiteren ist der Auflistung zu entnehmen, dass mit 856 Freisetzungen den VRTP ein relativ kleiner Teil (ca. 8,25%) der genehmigten Freisetzungen transgener Pflanzen zukommt. Andere transgene Phänotypen verteilen sich im Wesentlichen auf Herbizidresistenzen (ca. 31%), Insektenresistenzen (ca. 28%) und Pflanzen mit modifiziertem Metabolismus (ca. 20%).

Tabelle 1-2 Anzahl autorisierter Freisetzungsverfahren* von potyvirusresistenten transgenen Pflanzen (potyVRTP) in den USA

Resistenz gegen	Pflanze	Anzahl der Freisetzungen***
<i>Bean yellow mosaic virus</i> (BYMV)	Gladiolen, Erbsen	14
<i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV)	Salat	1
<i>Maize dwarf mosaic virus</i> (MDMV)	Mais	9
<i>Plum pox virus</i> (PPV)	Pflaume	1
<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV)	Papaya, Kürbis, Gurke, Melone, Wassermelone	57
<i>Pea seed-borne mosaic virus</i> (PsBMV)	Erbsen	2
<i>Potato virus A</i> (PVA)	Kartoffel	5
<i>Potato virus Y</i> (PVY)	Kartoffel, Tabak, Tomate	236
<i>Sugarcane mosaic virus</i> (SCMV)	Zuckerrohr	2
<i>Soybean mosaic virus</i> (SMV)	Soja, Gurke, Kürbis, Melone	14
<i>Sweet potato feathery mottle virus</i> (SPFMV)	Süßkartoffeln	3
<i>Sorghum mosaic virus</i> (SrMV)	Zuckerrohr	18
<i>Tobacco etch virus</i> (TEV)	Pfeffer, Tabak	25
<i>Tobacco vein mottling virus</i> (TVMV)	Tabak, Kartoffel	17
<i>Watermelon mosaic virus 2</i> (WMV-2)	Kürbis, Wassermelone, Gurke	130
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV)	Melone, Gurke, Kürbis	133
potyvirusresistent**	Tabak	2
Freisetzungen potyVRTP gesamt		669
Freisetzungen VRTP gesamt		856

*Antrags- bzw. Genehmigungsverfahren, Auszug aus <http://www.isb.vt.edu/>, Stand 08.03.2004; **keine Angaben zum Virus; ***mehrere Resistenzen pro Freisetzung möglich

Die Bedeutung von potyvirusresistenten transgenen Pflanzen (potyVRTP) kann aus Tabelle 1-2 abgeleitet werden. Nach diesen Angaben beinhalten 669 der 856 VRTP-Freisetzungsverfahren Resistenzen gegen Potyviren, was etwa 78% entspricht. Besondere Bedeutung kommt hierbei den Viren *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Potato virus Y* (PVY), *Watermelon mosaic virus 2* (WMV-2) und *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) zu, die zusammen über

80% der potyVRTP-Freisetzen ausmachen. Verglichen mit Tabelle 1-1 ist der Anteil der Freisetzenverfahren von potyVRTP an der gesamten Zahl der Freisetzen mit 6,45 % im Verhältnis zu 8,25% aller VRTP beachtlich hoch.

Kommerziell genutzte und nicht mehr der Regulierung durch APHIS ("Animal and Plant Health Inspection Service" des "United States Department of Agriculture", USDA) unterliegende VRTP sind in den USA transgene Papaya (PRSV-Resistenz), Kürbis (Resistenzen gegen CMV, WMV, ZYMV) und Kartoffel (Resistenzen gegen PVY, PLRV). Hierbei weisen von 95 kommerziell genutzten transgenen Kulturpflanzen neun eine Virusresistenz auf. Die Situation zur Freisetzen transgener Pflanzen in der Bundesrepublik Deutschland kann über den Internetauftritt des Robert Koch-Institutes (http://www.rki.de/GENTEC/GENENG/GENTEC_E.HTM) verfolgt werden. Demnach sind zurzeit von insgesamt 144 Freisetzen transgener Pflanzen sieben Freisetzen virusresistenter Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) und drei Freisetzen virusresistenter Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) beantragt bzw. genehmigt. Der kommerzielle Anbau von VRTP in der Bundesrepublik findet derzeit nicht statt.

1.1.1 Mit VRTP potenziell verbundene Risiken

Zu Beginn der 90er Jahre wurde die Herstellung bzw. der Anbau transgener Pflanzen dahingehend hinterfragt, ob diese Pflanzen auch ein biologisches Risiko darstellten (Tepfer, 1993). Hinsichtlich der VRTP können nach Angaben von Tepfer (2002) hierbei zwei generelle Risikoszenarien unterschieden werden. Auf der einen Seite stehen mit Heterologer Enkapsidierung, Komplementation und Synergie Effekte, die sich auf den Phänotyp der Viren auswirken und auf der anderen Seite Effekte, die durch Rekombination im Virusgenom fixiert werden.

Heterologe Enkapsidierung bezeichnet das (u.U. teilweise) Verpacken eines Virus mit dem Hüllprotein eines anderen Virus. Dies kann in Mischinfektionen (Bourdin & Lecoq, 1991) oder in Hüllprotein-transgenen Pflanzen (Lecoq et al., 1993) in Verbindung mit Komplementations-effekten vorkommen (Osborn et al., 1990). Ist das infizierende Virus aufgrund einer Mutation im Hüll- bzw. Ausbreitungsproteingen ausbreitungsdefekt, so kann dieser Defekt von einer transgenen Pflanze, die ein intaktes Gen für ein kompatibles Hüll- bzw. Ausbreitungsprotein exprimiert, komplementiert werden (Osborn et al., 1992; Ares et al., 1998). Die mutmaßliche Gefahr besteht z.B. in der Tatsache, dass durch das heterologe Hüllprotein ein Virus durch einen neuen Vektor übertragen werden kann und somit eventuell eine neue Wirtspflanze erreichen und infizieren kann. So wurde gezeigt, dass in transgenen Pflanzen, die das Hüllprotein eines aphidenübertragbaren *Plum pox virus* (PPV) exprimieren,

ein nicht-aphidenübertragbares ZYMV-Isolat (ZYMV-NAT) nach Infektion dieser Pflanzen von Aphiden übertragen werden konnte (Lecoq et al., 1993). Dies war möglich, da das Übertragungsdefekte ZYMV heterolog mit dem PPV-Hüllprotein enkapsidiert wurde. Das ZYMV-NAT selbst wurde nicht aphidenübertragbar, da die Übertragbarkeit nicht durch ein Rekombinationsereignis genetisch fixiert wurde. Weitere Beispiele für Heterologe Enkapsidierung sind z.B. die Transkapsidierung verschiedener Potyviren in *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) transgenen Pflanzen mit dem BYMV-Hüllprotein (Hammond & Dienelt, 1997) und die Enkapsidierung von CMV mit dem Hüllprotein des *Alfalfa mosaic virus* (AMV) in AMV-Hüllprotein transgenen Pflanzen (Candelier-Harvey & Hull, 1993). Heterologe Enkapsidierung und Komplementation können jedoch durch Mutationen in der transgenen Hüllproteinsequenz unterdrückt werden (Varrelmann & Maiss, 2000). Ebenfalls nicht genetisch fixiert werden synergistische Effekte die in der Regel bei taxonomisch nicht verwandten Viren zu beobachten sind. Dies wurde insbesondere am Beispiel von Mischinfektionen von PVX und PVY ausführlich beschrieben (Rochow & Ross, 1955; Goodman & Ross, 1974a; 1974b). In Untersuchungen transgener Pflanzen, die mit einer potyviralen Helferkomponente Protease (HC-Pro) transformiert waren, konnte bei Infektionen mit PVX nachgewiesen werden, dass dieses Gen für die synergistische Symptomausprägung verantwortlich war (Vance et al., 1995; Pruss et al., 1997). Aber auch die Expression der PPV-HC-pro durch einen PVX-Vektor führte zu synergistischen Effekten (Yang & Ravelonandro, 2002). Des Weiteren können virale PTGS-Suppressoren (siehe 1.1), wie z.B. die HC-Pro der Potyviren (Kasschau & Carrington, 1998; Brigneti et al., 1998; Anandalakshmi et al., 1998), zum Zusammenbruch einer Virusresistenz führen. Dies wurde z.B. am Beispiel von VRTP gezeigt, deren Resistenz gegen das *Potato virus A* (PVA) nach Infektion mit PVY zusammenbrach (Savenkov & Valkonen, 2001). Zudem zeigten Dzianott & Bujarski (2004), dass transgene *Arabidopsis thaliana*, die einen PTGS-Suppressor exprimierten, nach Infektion mit dem *Brome mosaic virus* (BMV) im Vergleich zu nicht-transgenen Pflanzen einen deutlich erhöhten Gehalt mit BMV-RNA aufwiesen. Dies könnte bedeuten, dass bestimmte VRTP möglicherweise die Vermehrung von Viren begünstigen. Während die oben genannten, möglichen Risiken nicht zu genetisch veränderten Viren führen, kann ein Austausch genetischen Materials infolge eines Rekombinationsereignisses zwischen einem Virus und der m-RNA eines Transgens im Genom des Virus fixiert sein und dementsprechend weitervererbt werden. Eine potenzielle Gefahr dieses Austauschs besteht in der Möglichkeit, dass das modifizierte Virus u.U. über veränderte biologische Eigenschaften verfügt, wie etwa einem erweiterten Wirtspflanzenkreis oder erhöhte Virulenz (Aaziz & Tepfer, 1999a). Da RNA-Rekombination ein zentraler Aspekt dieser Arbeit ist, wird er im Folgenden gesondert behandelt.

1.1.2 Rekombination in Mischinfektionen und VRTP

Rekombination gilt als wichtiger Aspekt in der Virusevolution, da durch diesen Mechanismus Fehler ausgeglichen werden können, die durch die Neustrangsynthese der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase im Zuge der Genomreplikation entstehen (Roossinck, 1997). RNA-Rekombination bei Pflanzenviren wurde erstmals von Bujarski & Kaesberg (1986) am Beispiel des BMV experimentell nachgewiesen. Als Erklärung für die RNA-Rekombination hat sich das "replicase-driven template-switching" Modell (Bujarski & Nagy, 1996; Nagy & Simon, 1997; Aaziz & Tepfer, 1999a) gegenüber dem "cleavage-ligation" Modell (Chetverin, 1997) durchgesetzt. Nach Lai et al. (1992) wird die RNA-Rekombination nach der Homologie der beteiligten RNA-Molekülen und der entstandenen Übergangssequenz ("crossover sites") charakterisiert. Demnach unterscheiden sich homologe und nicht-homologe Rekombination, wobei an ersterer verwandte Sequenzen bzw. gleiche RNAs beteiligt sind. Je nach Beschaffenheit der Kontinuität der Nukleotidsequenz gegenüber den elterlichen Sequenzen in der Übergangsregion spricht man bei der homologen Rekombination von präziser oder von unpräziser bzw. aberranter homologer Rekombination. Nicht-homologe RNA-Rekombination erfolgt dagegen bei unverwandten Viren. Eine neuere Charakterisierung nach Nagy & Simon (1997) mit der Unterscheidung von präziser und unpräziser "similarity essential", "similarity non-essential" und "similarity-assisted" Rekombination beschreibt den Sachverhalt genauer, weil auch der involvierte Rekombinationsmechanismus berücksichtigt wird. Jedoch hat sich diese Terminologie bis jetzt nicht durchgesetzt. Es wird daher in dieser Arbeit die Terminologie von Lai (1992) verwendet.

Bei der Untersuchung von RNA-Rekombination können nach Gibbs (1994) die selten vorkommenden Rekombinationsereignisse von Viren verschiedener Virusgruppen ("inter-group") von den häufiger dokumentierten Rekombinationsereignissen innerhalb einer Virusgruppe ("intra-group"), d.h. den Stämmen eines Virus, unterschieden werden. Ein großer Teil der Literatur bezieht sich auf Rekombinationsereignisse von sehr nahe verwandten Stämmen eines Virus (Jakab et al., 1997; Nie & Singh, 2002a; b) oder zwischen den Segmenten eines multipartiten Virus (Bujarski & Kaesberg, 1986; Cascone et al., 1990; 1993; Bujarski & Nagy, 1994; Bujarski et al., 1994). In einem artifiziellen System mit Tombusviren konnten White & Morris (1994) RNA-Rekombinationen zwischen replikationsdefekten RNAs des *Cucumber necrosis virus* (CNV) und replikationsdefekten oder -intakten RNAs des *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) nachweisen.

Natürliche Rekombination kann zwischen unterschiedlichen Stämmen bzw. Isolaten eines Virus auftreten, wie es z.B. bei PPV gezeigt werden konnte (Cervera et al., 1993; Glasa et al., 2002). Moreno et al. (2004) konnten kürzlich einen Anteil rekombinanter Viren in einer natürlichen Population des WMV in Spanien von 7% nachweisen. Silbernagel et al. (2001) konnten in Mischinfektionen der Potyviren *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV)

und *Bean common mosaic virus* (BCMV) keine Rekombinanten nachweisen. Wenn allerdings Pflanzen inokuliert wurden, die für das eine Virus anfällig, gegen das andere jedoch resistent waren, konnten 17 Klone isoliert werden, die hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften (z.B. Pathogenität oder serologische Eigenschaften) einen rekombinanten Phänotyp aufwiesen. Masuta et al. (1998) zeigten, dass nach Rekombination der RNA 2 des CMV und des *Tomato aspermy virus* (TAV) ein quadripartites Hybridvirus mit einer chimären Replikase des gebildet werden kann. Zwischen den gleichen Viren wiesen Aaziz & Tepfer (1999b) RNA-Rekombination in der RNA 3 unter geringem Selektionsdruck in mischinfizierten, nicht-transgenen Pflanzen nach. Die in dieser Viruskombination involvierten Sequenzen wurden von Suzuki et al. (2003) bestimmt. Allgemein jedoch ist zu erkennen, dass unter Versuchsbedingungen mit geringem Selektionsdruck rekombinante Viren nur selten nachgewiesen werden können. Bei der Untersuchung natürlicher Isolate dagegen, werden dagegen öfter rekombinante Viren beschrieben und im Falle einiger Potyviren auch als häufig angesehen (Revers et al., 1996; Glais et al., 2002; Moreno et al., 2004).

Die Rekombination eines Pflanzenvirus mit dem Transgen einer VRTP wurde für das *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) gezeigt (Gal et al., 1992; Schoelz & Wintermantel, 1993). Hierbei kann jedoch eine DNA-Rekombination nicht ausgeschlossen werden, da es sich um ein DNA-Virus handelt. Allerdings zeigten Wintermantel & Schoelz (1996), dass unter geringem Selektionsdruck entstandene CaMV-Rekombinante hohe kompetitive Eigenschaften gegenüber dem Wildtyp aufweisen können. Bei Greene & Allison (1994; 1996) konnten Mutanten des *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) mit Deletionen im Hüllprotein nach einer Rekombination in CCMV-Hüllprotein transgenen Pflanzen nicht-transgene *N. benthamiana* Pflanzen wieder systemisch infizieren. Ein Test dieser Rekombinanten ergab zwar, dass sie teilweise eine neuartige Symptomausprägung zeigten (Allison et al., 1997); sie waren jedoch in Mischinfektionen mit den Elternviren nicht kompetitiv (Allison et al., 1999). Ebenfalls in einem artifizialen System konnten Varrelmann et al. (2000) die Restauration eines assemblierungsdefekten PPV-NAT in PPV-NAT-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen, bzw. nach Co-Inokulation dieses Klons mit einer ausbreitungsdefekten PVX-Mutante, die ein intaktes PPV-Hüllprotein exprimiert, zeigen.

1.1.3 Risikobewertung von VRTP

Da Herstellung und Inverkehrbringen von VRTP häufig sehr kontrovers diskutiert werden, ist für eine wertneutrale Durchführung der Risikoanalyse von VRTP die Definition der Begrifflichkeiten Risikobewertung, Gefahr und Schaden hilfreich. In diesem Zusammenhang gibt Bartsch (2004) eine Übersicht über Schadensbegriffe der geplanten Europäischen

Richtlinie zur Umwelthaftung. Risikobewertung kann demnach als *"ein Prozess der Evaluierung bestehend aus der Identifikation bestehender Unsicherheiten sowie der Wahrscheinlichkeit und Höhe eines unerwünschten Ereignisses für Mensch und Umwelt, und zwar nach Exposition unter definierten Bedingungen zu ein oder mehreren Risikoquellen"* definiert werden (SSP, 2000). Hiervon zu unterscheiden ist die Gefahr, die als *"Potenzial einer Risikoquelle, einen unerwünschten Effekt zu verursachen"* verstanden wird (SSP, 2002). Schaden wird als *"eine direkt oder indirekt eintretende feststellbare nachteilige Veränderung einer natürlichen Ressource oder Beeinträchtigung der Funktion einer natürlichen Ressource"* definiert. Nach Bartsch (2004) ist Risiko als eine Funktion der Eintrittswahrscheinlichkeit eines Schadens und der Schadenshöhe zu verstehen. Hervorgehoben werden muss in diesem Zusammenhang, dass die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines transgenen Organismus nicht als Risiko verstanden werden kann, da hierin noch keine Bewertung möglicher Schäden berücksichtigt wird (Bartsch, 2004). Bereits Hull (1994) forderte analog zu den o.g. genannten Begrifflichkeiten, dass die Risikobewertung von VRTP auf zwei zentrale Aspekte fokussieren soll: die Häufigkeit ("frequency") des Auftretens eines möglichen Risikos und die potenzielle, dem Risiko innewohnende Gefahr ("hazard").

Da die Häufigkeit der Rekombination in VRTP aus der momentanen Datenlage (1.1.2) nicht abzuleiten ist, erscheint eine Abschätzung als problematisch. Hinzu kommt, dass in den bisher veröffentlichten Arbeiten die Häufigkeit des Auftretens von Rekombinanten in VRTP nicht Gegenstand der Untersuchungen war, sondern nur das Auftreten bzw. der Rekombinationsmechanismus an sich (Aaziz & Tepfer, 1999a). Für vergleichende Rückschlüsse auf die tatsächliche Häufigkeit von RNA-Rekombination in VRTP schlagen Aaziz & Tepfer (1999a) und Tepfer (2002) vor, in Versuchen die Rekombinationsraten von einzeln infizierten VRTP und doppelt infizierten, nicht-transgenen Pflanzen zu vergleichen. Das hätte den Vorteil, dass doppelt infizierte, nicht-transgene Pflanzen natürliche Gegebenheiten widerspiegeln, von welchen ausgehend Abweichungen in den Verhältnissen von VRTP abgeschätzt werden können. Dies bedeutet letztendlich, dass die Häufigkeit des Auftretens von Rekombination in VRTP entweder als den natürlichen Verhältnissen entsprechend einzustufen oder als von natürlichen Gegebenheiten abweichend zu bewerten ist. In diesem Sinne kann eine Abweichung positiv oder negativ sein; d.h. es treten mehr oder u.U. weniger Rekombinante auf. Neben der Bestimmung der Eintrittswahrscheinlichkeit von Rekombinationsereignissen muss dann deren biologische Konsequenz berücksichtigt werden, um den Ansprüchen der Risikobewertung gerecht zu werden. D.h., dass untersucht werden muss, ob bei den biologischen Eigenschaften der Rekombinanten negative Abweichungen von den natürlichen Verhältnissen, wie z.B. erhöhte Virulenz oder erweiterter Wirtspflanzenkreis, zu erkennen sind. *Ex definitione* würde dies dann eine Gefahr darstellen. Weichen sowohl Häufigkeit, als auch Gefahr des Auftretens von natürlichen Rekombinanten

negativ im Sinne des Schadens von den natürlichen Verhältnissen ab, so ist im jeweiligen Fall das Auftreten von Rekombinanten als Risiko anzusprechen. Allerdings sind Untersuchungen von Mischinfektionen, mit Ausnahme der synergistischen PVX/Potyvirus-kombinationen (1.1.1), bisher nur in vergleichbar geringem Umfang durchgeführt worden (siehe 1.2). Besonders Untersuchungen zur Verteilung von Viren in Mischinfektionen sind aber aus den folgenden Gründen in der Risikobewertung von VRTP von entscheidender Bedeutung: da bei VRTP in der Regel in allen Zellen das Transgen konstitutiv exprimiert wird, ist Rekombination theoretisch in allen virusinfizierten Zellen möglich. Soll ein Vergleich mit mischinfizierten, nicht-transgenen Pflanzen durchgeführt werden, so müssen beide Viren das Pflanzengewebe doppelinfizieren, da der subzelluläre Kontakt beider viraler RNAs die Grundvoraussetzung für ein Rekombinationsereignis ist. Da über die Verteilung in Mischinfektionen nicht viel bekannt ist, bedarf es auf diesem Gebiet noch intensiver Forschungsarbeit (Aaziz & Tepfer, 1999a).

Ein Ansatz zur Evaluierung des zweiten zentralen Aspekts ist das Erzeugen von artifiziellen bzw. *in vitro*-Rekombinanten. Der Vorteil ist, dass gezielt genetisches Material zwischen Viren ausgetauscht werden kann, um Effekte dieser Fragmente vor dem Hintergrund eines heterologen Genoms zu untersuchen. Diese künstlichen Rekombinanten wurden z.B. dafür verwendet, um Symptomausprägung oder Wirtsspezifität bei Cucumoviren zu untersuchen (Ding et al., 1996; Salánki et al., 1997; Carrere et al., 1999). Allerdings besitzen derartige Untersuchungen den Nachteil, dass der Selektionsdruck, unter dem sich eine artifizielle Rekombinante befindet, nicht immer mit dem einer *in vivo*-Rekombinanten vergleichen lässt, da eine *in vivo*-Rekombinante bereits vom Zeitpunkt ihres Entstehens unter dem kompetitiven Einfluß der Elternviren steht, eine *in vitro*-Rekombinante jedoch nicht. Außerdem lassen artifizielle Rekombinante keine Rückschlüsse auf natürliche "crossover" Sequenzen zu, da diese künstlich sind und meist aus versuchs- bzw. klonierungstechnischen Motiven heraus gewählt werden. Paalme et al. (2004) konnten zwar nachweisen, dass der Austausch von Sequenzen zweier Isolate des *Potato virus A* (PVA) zu veränderter Pathogenität bzw. Virulenz führen kann. Jedoch handelte es sich hierbei um *in vitro* generierte Rekombinante, so dass fraglich ist, ob diese auch unter natürlichen Bedingungen entstehen und sich gegen die Elternviren durchsetzen können.

Grundsätzlich sollten in derartigen Studien Vergleiche zum kompetitiven Verhalten der Rekombinanten in Mischinfektionen erfolgen, um Rückschlüsse auf das Risiko bzw. die Gefahr der erzeugten Rekombinanten ziehen zu können. Denn nur wenn eine Rekombinante mit den Eltern erfolgreich konkurriert, kann sie sich mit ihren neuen Eigenschaften durchsetzen und biologische Relevanz erlangen. Diese Fragestellung lag bei der Erforschung von Rekombinanten den o.g. Studien aber nicht zugrunde. Fernández-Cuatero

et al. (1994) konnten für eine CMV/TAV-Rekombinante stark kompetitive Eigenschaften in einer Mischinfektion gegenüber den Elternviren zeigen.

1.2 Verteilung von Pflanzenviren in Mischinfektionen

Mischinfektionen von Pflanzenviren sind ein seit langem bekanntes Phänomen, das bereits in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts beschrieben wurde (McKinney, 1929). Es kann in Mischinfektionen je nach Anzahl und Art der beteiligten Viren zu unterschiedlichen Wechselwirkungen kommen. Im Vergleich zu den jeweiligen Einzelinfektionen ist eine neuartige Symptomausprägung möglich, wobei die Interaktionen von unveränderter Symptomatologie oder symptomloser Koexistenz mehrerer Viren (Bennett, 1953; Németh, 1986) bis hin zu synergistischen Effekten reichen (Pio-Riberio et al., 1978; vergl. auch 1.1.1). Sehr früh erkannte McKinney (1929), dass zwei TMV-Mutanten, die farblich unterschiedliche Mosaiksymptome verursachten, in einer Doppelinfektion unterschiedliche Areale der Blattspreite infizieren. Es gibt Anhaltspunkte in der älteren Literatur, dass bei Mosaikvirosen eine Infektion mit einer Mischung von Sequenzvarianten eines Virus vorlag. Nach diesen Angaben können sich während des Wachstums der Pflanze diese Varianten teilweise in verschiedenen Zellen etablieren, wobei die aus der Zellteilung hervorgehenden Zellen dann von einer der jeweiligen Varianten okkupiert wurden. Den Varianten entsprechend entstand daraufhin ein Mosaik. Demnach konnten in *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) Infektionen aus farblich leicht variierenden Arealen auch unterschiedliche Sequenzvarianten isoliert werden (Chalcroft & Matthews, 1966; Reid & Matthews, 1966; Chalcroft & Matthews, 1967a; b). Hinweise für morphologische bzw. histologische Barrieren, die eine Trennung bedingen könnten, sind in der Literatur nicht vorhanden. Hull & Plaskitt (1970) konnten elektronenmikroskopisch nachweisen, dass zwei unterschiedliche Stämme des AMV nur die selben Zellen infizieren konnten, wenn sie in simultan oder in kurz aufeinanderfolgenden Abständen inokuliert wurden. Divéki et al. (2002) zeigten für zwei identische, aber mit unterschiedlichen Varianten des "green fluorescent protein" (GFP) markierte PVX-Populationen eine diskrete Verteilung in der Blattspreite. Im Gegensatz hierzu steht der Nachweis von Goodman & Ross (1974a), die zeigten, dass PVX und PVY Zellen doppelinfizieren. Auch Hall et al. (2001) berichten von einer heterogenen Verteilung verschiedener Isolate des *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) in doppelinfizierten Weizenpflanzen.

Die geringe Anzahl verfügbarer Literatur über Doppelinfektionen unterschiedlicher Viren ("inter group") begründet sich nach Aaziz & Tepfer (1999a) mit der Tatsache, dass in experimentell herbeigeführten Mischinfektionen ein Virus meist das andere verdrängt. Dies

kann zwar durch zeitlich verzögerte Inokulationen teilweise ausgeglichen werden (Aaziz & Tepfer, 1999b), bleibt aber ein Problem. Zudem handelt es sich nur bei den o.g. Untersuchungen von TMV bzw. TYMV und bei der Arbeit von Divéki et al. (2002) um *in vivo*-Beobachtungen.

Interessant ist, dass einige der hier aufgeführten Arbeiten, die Trennungseffekte zwischen Viruspopulationen andeuten, von Hull (2002) mit "cross protection" in Verbindung gebracht werden. Hierbei kann ein in der Pflanze etabliertes, milde Symptome verursachendes Virus vor einer Zweitinfektion mit einem zweiten, virulenteren Virus schützen (Fulton, 1986; Pennazio et al., 2001). Bislang wurden als mögliche Ursachen für das "cross protection" Phänomen z.B. die Erschöpfung essentieller Metaboliten, limitierte Möglichkeiten (Orte) für die Replikation, Enkapsidierung superinfizierender RNA oder spezifische Adsorption an Zellkomponenten angenommen, aber nicht abschließend bewiesen (Pennazio et al., 2001). Neuerdings wird als Mechanismus der "cross protection" ein RNA-vermittelter "gene silencing"-Effekt angenommen, der sich auf ein von Ratcliff et al. (1999) publiziertes Potex-/Tobravirusssystem stützt.

1.3 Vorstellung der Viren

1.3.1 *Plum pox virus* (PPV)

Krankheiten & Wirtspflanzenspektrum

Das *Plum pox virus* (PPV) ist der Erreger der Scharkakrankheit an Pflaumen (*Prunus domestica* L.) und wird daher auch als Scharka-Virus bezeichnet. Die umfangreiche Literatur zum PPV ist über einen längeren Zeitraum wiederholt in entsprechenden Übersichtsartikeln zusammengefasst worden (Kegler & Schade, 1971; Riechmann et al., 1992; López-Moya et al., 2000).

PPV gehört zum Genus Potyvirus (Barnett, 1991) der Familie der Potyviren (*Potyviridae*; Hollings & Brunt, 1981; Shukla et al., 1994), der größten Familie der Pflanzenviren, in die sich etwa ein Drittel der bekannten Pflanzenviren einordnen lassen. Die erste Beschreibung des PPV geht auf Atanasoff aus dem Jahre 1932 zurück (zit. in: Kegler & Schade, 1971). In der Zwischenzeit hat sich die Scharkakrankheit weltweit ausgebreitet, und die verursachten Verluste haben dementsprechend ökonomische Bedeutung erlangt (Dunez & Sutic, 1988; Németh, 1994). In der Bundesrepublik schlägt sich dies in der Tatsache nieder, dass 1971 eine "Verordnung zur Bekämpfung der Scharkakrankheit" erlassen wurde (Anonym, 1988).

Neben der bereits erwähnten Pflaume gehören weitere Pflanzen der *Rosaceae*, wie z.B. Pfirsich (*P. persica* L.), Aprikose (*P. armeniaca* L.) und Kirschen (*P. mahaleb* L., *P. cerasus* L., *P. avium* L.) zum natürlichen Wirtspflanzenkreis des PPV (Dosba et al., 1987; Nemchinov et al., 1996). Für Versuchszwecke wird für PPV in erster Linie *Nicotiana benthamiana* DOMIN verwendet. Allerdings ist PPV auch auf *Nicotiana clevelandii* GRAY infektiös und breitet sich systemisch aus. Nach der systemischen Ausbreitung kann PPV im Allgemeinen sehr hohe Titer erreichen (Kegler & Schade, 1971; Maiss, 1993). Verschiedene *Chenopodium*-Arten (z.B. *C. foetidum*, *C. quinoa*) und *Nicandra physalodes* reagieren mit Lokalläsionen und eignen sich daher als Indikatorpflanzen.

Genomorganisation

Die Partikel des PPV sind flexible Fäden und weisen eine Länge von ca. 850 nm und einen Durchmesser von ca. 20 nm auf. Das PPV verfügt mit einer ca. 9750 Nukleotiden langen, monopartiten ssRNA über ein typisches Potyvirusgenom, das vom viruseigenem Hüllprotein enkapsidiert wird (Maiss et al., 1989; Riechmann et al., 1992). Komplette Sequenzen des PPV wurde von Maiss et al. (1989) und Lain et al. (1989) bestimmt.

Die folgenden Angaben über die Größe einzelner Abschnitte auf einem PPV-Genom beziehen sich auf ein nicht-aphidenübertragbares PPV-Isolat (PPV-NAT; Maiss et al., 1989; 1992). An die genomische RNA ist am 5'-Ende ein virales Protein gebunden ("viral protein, genome-linked", VPg). Das 5'-Ende ist durch eine nicht-translatierte Region (NTR) mit einer Länge von 147 Nukleotiden gekennzeichnet. Das 3'-Ende besteht aus einer 3'-NTR (221 nt) und einem polyA-Tail. Auf der RNA ist ein offenes Leseraster (ORF) lokalisiert, das in ein ca. 360 kDa großes Polyprotein translatiert wird (siehe Abbildung 1-1). Nach der Translation wird das Polyprotein durch viruseigene Proteasen in *cis* und *trans* in die funktionellen Proteine prozessiert (Polyproteinprozessierung). Vom 5'-Ende zum 3'-Ende sind das Protein 1 (P1), die HC-Pro, das Protein 3 (P3), ein 6 kDa großes Protein (6K1), ein zylindrischer Einschlusskörper (CI), ein zweites 6 kDa großes Protein (6K2), der Kerneinschlusskörper a (NIa) mit dem VPg, der Kerneinschlusskörper b (NIb) und das Hüllprotein lokalisiert. Die Prozessierung des Polyproteins erfolgt durch die autokatalytische Abspaltung der C-terminalen Enden von P1 und HC-Pro und die Trennung der verbleibenden Bindungen zwischen den Proteinen durch die NIa-Protease, wie anhand von TEV und TMVMV gezeigt werden konnte (Carrington et al., 1988, 1989; Verchot et al., 1991). Die Prozessierung des PPV-Polyproteins erfolgt an bestimmten Aminosäuremotiven, die in Abbildung 1-1 hervorgehoben werden. Bedingt durch die Polyproteinprozessierung werden die Proteine der Potyviren in äquimolaren Mengen gebildet. Das TEV benötigt etwa 2000 Hüllprotein-Untereinheiten (Matthews, 1991); die restlichen Proteine werden in verschiedenen Zellbereichen

akkumuliert. Aus den Proteinaggregationen entstehen die charakteristischen, auch lichtmikroskopisch erkennbaren Einschlusskörper (Lesemann, 1988; Riedel et al., 1998).

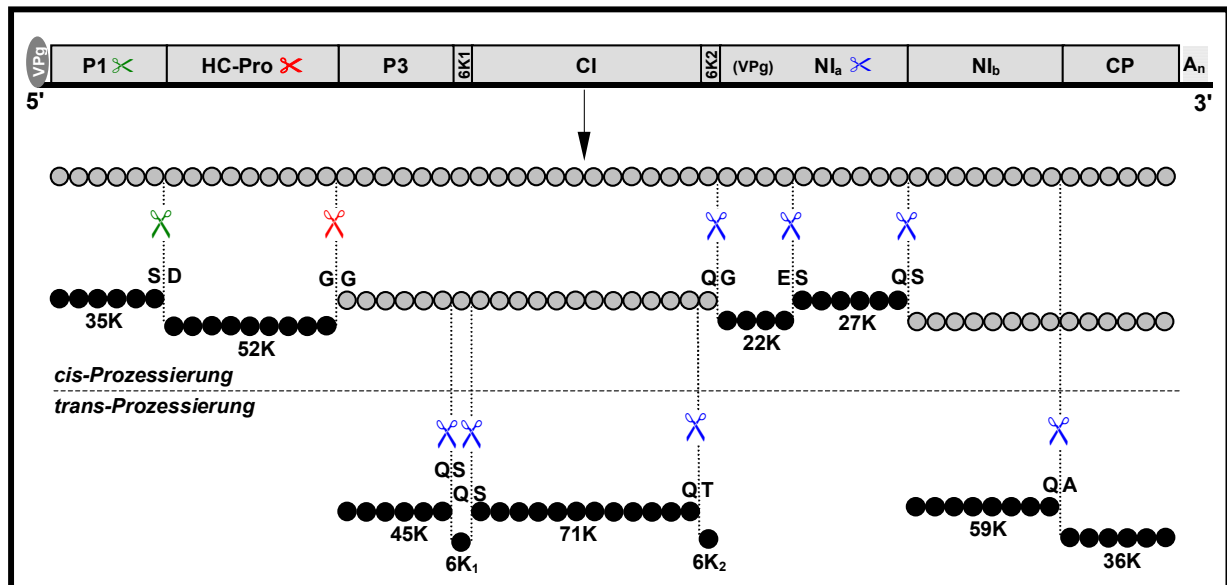


Abbildung 1-1 Genomorganisation und Polyproteinprozessierung des nicht-aphidenübertragbaren *Plum pox virus* (PPV-NAT)

Das offene Leseraster (ORF) für das Polyprotein (lange graue Kette) ist als Kasten mit den Abschnitten für die einzelnen Virusproteine dargestellt. ✂ = Proteine mit Proteaseaktivität, die an spezifischen Aminosäuremotiven das Polyprotein in *cis* bzw. in *trans* prozessieren. Die aus der Polyproteinprozessierung hervorgegangenen funktionellen Proteine (schwarze Ketten) sind mit deren Molekulargewichten aufgeführt. Am 5'-Ende kovalent gebunden befindet sich das VPg. P1 und P3 = Protein 1 bzw. 3; HC-Pro = Helferkomponente-Protease; CI = zylindrischer Einschlusskörper; NIa, NIb = Kerneinschlusskörper a bzw. b; VPg = virales, genomgebundenes Protein; CP = Hüllprotein; 6K₁ und 6K₂ = kleinere 6 kDa große Proteine; A_n = polyA-Tail

(verändert nach Angaben von Maiss, 1993 und López-Moya et al., 2000)

Bedeutung und Bekämpfung

Die vom PPV verursachten Symptome lassen nicht immer eine eindeutige Diagnose zu, da auch latente Infektionen möglich sind. An Pflaumen kommt es in der Regel zur Bildung von chlorotischen Flecken bzw. diffusen oliv-grünen Ringen auf den Blättern. Die Früchte sind von einer rauhen, pockenartigen Oberfläche ("pox") gekennzeichnet, wobei im Innern braunen Flecken auf dem Stein und braun-rötliche Verfärbungen des Fruchtfleisches häufig anzutreffende Symptome sind. Da bis zu 90% der Früchte bereits vor der Fruchtreife vom Baum fallen, sind die Ertragsausfälle entsprechend hoch. Hinzu kommt, dass die am Baum verbleibenden Früchte reduzierte Zuckergehalte und einen erhöhten Säureanteil aufweisen und daher von der Vermarktung ausgeschlossen sind (Kegler & Schade, 1971).

Um den Anbau PPV-gefährdeter Obstbäume zu gewährleisten, kann auf eine Reihe von toleranten Sorten aus der konventionellen Resistenzzüchtung zurückgegriffen werden

(Hartmann, 1995; Polák et al., 1997). Allerdings ist darauf zu achten, dass diese Sorten hinsichtlich Fruchtqualität und Ertrag auch den am Markt geforderten Qualitätsmerkmalen entsprechen (Petruschke, 1990). Sorten, die diesen Ansprüchen gerecht werden, sind zunehmend auf dem Markt vertreten (Hartmann et al., 1997). Kegler et al. (1998) berichten von über 300 resistenten bzw. toleranten Pflaumen-, Pfirsich- und Aprikosensorten, auf die im Anbau ausgewichen werden kann. Für den Pflaumenanbau in der Bundesrepublik Deutschland werden zur Zeit einige tolerante Hauptsorten, wie z.B. 'Ruth Gerstetter', 'Katinka', 'Cacaks Schöne' und 'Elena' empfohlen (Petzold, 2000). Besonders interessant scheint die Sorte 'Jojo' zu sein, die als PPV-resistent getestet worden ist und für die Resistenzzüchtung verwendet wurde (Hartmann, 1999; 2002). Jedoch können Resistenzzüchtungen auch gegenteilige Effekte hervorrufen, wie Rubio et al. (2003) für die Kreuzung *P. mandshurica* x *P. armeniaca* zeigten, die eine Resistenz schaffen sollte, aber nur stark anfällige Nachkommen produzierte. Petruschke & Schröder (1999) berichten von Sortenkreuzungen, die auf Inokulation mit PPV hypersensitiv reagierten und nach sieben Jahren noch frei von systemischen Infektionen waren.

Es wurde eine Vielzahl PPV-transgener Pflanzen vornehmlich für Versuchszwecke hergestellt. Den Großteil stellten PPV-Hüllprotein-transgene *N. benthamiana* Pflanzen dar, die unterschiedlich ausgeprägte Resistenzen aufwiesen (Ravelonandro et al., 1993; Regner et al., 1992; Palkovics et al., 1995; Jacquet et al., 1998; Korte et al., 1995; Timpe et al., 1992; Guo et al., 1998). Ebenfalls PPV-transgene *N. benthamiana* wurden mit dem P1 (Tavert-Roudet et al., 1998), dem CI (Korte et al., 1995; Wittner et al., 1998), dem NIa (Guo et al., 1998) und dem NIb (Guo & García, 1997; Guo et al., 1998) transformiert. Interessant ist aber, dass es auch gelang PPV-Resistenzen in den natürlichen Wirten mit Hilfe des PPV-Hüllproteins zu erzeugen. So konnten Laimer da Camara Machado et al. (1992) erstmals von Hüllprotein-transgenen *P. armeniaca* berichten, die gegen PPV resistent waren. Malinowski et al. (1998) und Scorza et al. (2001) transformierten *P. domestica*, ebenfalls mit dem Ergebnis einer PPV-Resistenz. Ein kommerzieller Anbau dieser Pflanzen ist jedoch bis jetzt nicht erfolgt.

Übertragung

Das PPV kann mechanisch und durch Aphiden übertragen werden (Kegler & Schade, 1971). Noch heute sind für den praktischen Anbau beide Übertragungswege relevant, weil das Virus durch infizierte Unterlagen oder Reiser über große Distanzen in neue Obstanlagen verschleppt werden und innerhalb der Anlagen eine Ausbreitung über Blattläuse erfolgen kann (Lopéz-Moya et al., 2000). Für die Blattlausübertragung ist vor allem die nicht-persistente Übertragungsweg durch *Myzus persicae* SULZ., *Aphis craccivora* KOCH, *A. fabae* SCOPOLI, *Brachycaudus helichrysi* KALT. und *Phrodon humuli* SCHRANK

von Bedeutung. Bei der Übertragung selbst spielen HC-Pro und Hüllprotein eine wichtige Rolle, die in 1.3.3. eingehend behandelt wird.

Variabilität

Als Spezies weist PPV eine gewisse Variabilität auf, die sich in der Beschreibung einer Reihe von Isolaten bzw. Stämmen ausdrückt. Die Stämme werden in die vier Gruppen M (Marcus), D (Dideron) (Bousalem et al., 1994; Candresse et al., 1998; Glasa et al., 2002), EA (El Amar; Wetzel et al., 1991) and C (Kirsch-Isolate; Crescenzi et al., 1997; Nemchinov et al., 1995; 1996; 1998) eingeteilt. Soweit die 3'-terminalen Sequenzen bestimmt wurden, konnte gezeigt werden, dass die aus Süß- bzw. Sauerkirschen isolierten PPV-Stämme (SoC, SwC) sich von den Gruppen D, M und EA deutlicher unterscheiden, als die drei letztgenannten Gruppen untereinander. Komplette Sequenzen sind für die Gruppen C, D und M publiziert worden. Die einzelnen Gruppen lassen sich biologisch, serologisch und molekular gut unterscheiden (Fanigliulo et al., 2003). So werden z.B. M-Isolate sehr effektiv von Aphiden übertragen und verursachen auf Pfirsich stärkere Symptome als D Isolate, welche hingegen vorwiegend Pflaumen und Aprikosen infizieren (López-Moya et al., 2000). Serologisch können D- und M-Isolate mit monoklonalen Antikörpern unterschieden werden (Olmos et al., 1997). Als weitere Unterscheidungsmerkmale gelten nach López-Moya et al. (2000) die elektrophoretische Mobilität des Hüllproteins und die 3'-terminale Sequenz des Genoms, wobei insbesondere die 3'-terminale Region des Hüllprotein-Cistrons mit einem *Rsa*I-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) charakterisiert werden kann.

Ansätze zur biotechnologischen Nutzung des PPV

Eine Übersicht zum Thema der biotechnologischen Nutzung von RNA Viren gaben Pogue et al., (2002). Fernández-Fernández et al. (1998) zeigten anhand einer Hüllprotein-Fusion mit einem Peptid des *Canine parvovirus* (CPV), dass mit Hilfe des PPV heterologe Proteine in Pflanzen exprimiert werden können. Mit einem ähnlichen Ansatz konnten Fernández-Fernández et al. (2001) das Hüllprotein des *Rabbit hemorrhagic disease virus* (RHDV) als freies Protein exprimieren und daraufhin erfolgreich Kaninchen gegen RHDV immunisieren. López-Moya et al. (2000) heben hervor, dass bei der Nutzung des PPV (bzw. von Potyviren) ungewöhnlich große Mengen des heterologen Proteins gebildet werden, da aufgrund der Genomorganisation alle potyviralen Proteine in äquimolaren Mengen synthetisiert werden. Zudem entfallen durch die besseren Möglichkeiten zur Manipulation eines Virusgenoms eine Reihe von Schwierigkeiten welche die Verwendung entsprechender transgener Pflanzen einschränken, da z.B. der Insertionsort eines heterologen Gens von vornherein festgelegt und optimiert werden kann.

1.3.2 Tobacco vein mottling virus (TVMV)

Krankheiten & Wirtspflanzenspektrum

Das *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) ist, wie PPV auch, ein Vertreter des Potyvirusgenus (Barnett, 1991) und wurde 1974 von Sun et al. als neues Virus in Tabakpflanzen beschrieben. Obwohl das Virus ökonomisch bedeutende Schäden in acker- bzw. gartenbaulichen Kulturen verursachen kann, ist die Zahl der wissenschaftlichen Publikationen im Vergleich zu anderen Potyviren geringer. Die letzte zusammenfassende Darstellung zum TVMV geht auf das Jahr 1988 von Pirone & Shaw zurück.

Die vom TVMV verursachten Symptome unterscheiden sich prinzipiell von den Symptomen anderer Potyviren, jedoch kann es im Feld durchaus zu Verwechslungen mit PVY oder TEV kommen. Auf Tabak kommt es zur Bildung von Adernaufhellungen, die von diskontinuierlichen Aufwölbungen entlang der Blattadern begleitet werden. Mit fortschreitender Krankheitsentwicklung kommt es zur Nekrotisierung der Blattadern und zum Verlust ganzer Blätter. Die Symptomausprägung ist von der jeweiligen befallenen Sorte abhängig (Pirone & Shaw, 1988). In wissenschaftlichen Versuchsanstellungen können weitere Wirtspflanzen verwendet werden. Zu ihnen zählen z.B. *N. tabacum* 'Samsun', *N. tabacum* 'Xanthi', aber auch *N. benthamiana* oder *N. occidentalis*. Lokalläsionenwirte sind nicht bekannt.

Genomorganisation

Die Partikel des TVMV sind ca. 765 nm lang und haben einen Durchmesser von ca. 13 nm (Sun et al., 1974). Die komplette Sequenz des TVMV wurde 1986 von Domier et al. publiziert. Die Genomorganisation entspricht dem für das Genus Potyvirus charakteristischen Aufbau, der in Abbildung 1-1 bereits für das PPV beschrieben wurde. Es wird in diesem Abschnitt daher nur auf ausgewählte Merkmale des TVMV eingegangen.

Das monopartite ssRNA-Genom (9475 nt) weist ein offenes Leserraster von 9015 Nukleotiden auf, das für ein ca. 340 kDa großes Polyprotein kodiert. Domier et al. (1989) konnten auf der Basis der zuvor veröffentlichten Sequenz einen TVMV-"full-length"-Klon unter Kontrolle eines T7- bzw. T3-Promoters herstellen.

Shahabuddin et al. (1988) charakterisierten das im 5'-Terminus des NIa lokalisierte VPg für dessen Bindung an die virale RNA die Aminosäure Thyrosin an Position 1860 des Polyproteins essentiell ist (Murphy et al., 1991; 1996). Hellmann et al. (1988) konnten zeigen, dass es sich beim NIa um eine viruseigene Protease handelt, die den größten Teil des Polyproteins prozessiert. Der Nachweis zweier bis dahin nicht identifizierter nicht-struktureller Proteine des TVMV, dem 34 kDa großen P1 und das 42 kDa große P3, gelang Rodriguez-Cerezo & Shaw (1991). Brantley & Hunt (1993) konnten daraufhin für die P1-Protease die Fähigkeit zur Bindung von ssRNA nachweisen. Hong & Hunt (1996) bestätigten, dass es sich beim TVMV-NIb tatsächlich um die RNA-abhängige RNA-

Polymerase handelt und dass das bei Potyviren typische Aminosäuremotiv GDD auch bei der TVMV-Polymerase eine wichtige Funktion besitzt. Rodriguez-Cerezo et al. (1991) konnten am Beispiel der TVMV-3'-NTR belegen, dass bei der Symptomausprägung von Infektionen auch nicht-kodierende Bereiche eines RNA-Virus eine Rolle spielen.

Übertragung

TVMV ist mechanisch und blattlausübertragbar. Das Virus wird nicht-persistent von einer Reihe von Aphiden übertragen. Pirone & Shaw (1988) berichten von *M. persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *A. craccivora*, *A. gossypii*, *Rhopalosiphum maidis* und *R. padi* und schließen weitere Aphiden als Vektoren nicht aus. Wie bereits in 1.3.1 für PPV beschrieben sind bei der Blattlausübertragung die HC-Pro und das Hüllprotein von großer Bedeutung. Weitere Aspekte und molekulare Details zur Übertragung durch Blattläuse werden gesondert in 1.3.3 besprochen.

Bedeutung und Bekämpfung

In der Bundesrepublik hat TVMV bislang keine Bedeutung erlangt. TVMV kann Tomaten-, Kartoffel- aber hauptsächlich Tabakkulturen befallen. Besonders Tabakarten (*Nicotiana tabacum*) des Burley-Typs sind von Infektionen durch TVMV bedroht (Pirone & Shaw, 1988). Zwar stehen für die Eindämmung von TVMV-Infektionen konventionell gezüchtete, resistente Sorten bereit, jedoch gibt es auch einige biotechnologische Ansätze, die Möglichkeiten zur Resistenzbildung zu erweitern. In den USA wurden in den letzten Jahren 17 Freisetzungen TVMV-resistenter Kartoffeln bzw. Tabaksorten beantragt (Tabelle 1-2).

Maiti et al. (1993) stellten eine Reihe TVMV-transgener Pflanzen her. Die Tabakpflanzen ('Burley 21') wurden mit den kodierenden Regionen des NIa/VPg, CI bzw. Hüllproteins transformiert und die Resistenzen hinsichtlich TVMV, PVY und TEV überprüft. Interessanterweise waren die Hüllprotein-Transgenen gegen alle Viren resistent, die NIa/VPg waren TVMV-, aber nicht PVY- bzw. TEV-resistent und die CI-Transgenen waren anfällig für alle getesteten Viren. Moreno et al. (1998) stellten TVMV-transgene Pflanzen her, die auf P1 bzw. P3 basieren. Die Resistenzen waren ausschließlich gegen TVMV gerichtet, wobei unterschiedliche Resistenzniveaus erreicht wurden. Der Resistenz-brechende Stamm TVMV-S war in der Lage, die Resistenz der meisten P1, jedoch nicht die der P3 Linien, zu brechen. Darüber hinaus ist die Verwendung des P3 aber eingeschränkt, da diese Pflanzen sich schlecht entwickelten. TVMV-S wies Abweichungen von sechs Aminosäuren im VPg gegenüber dem TVMV-Wildtyp auf, wobei vier Austausch für die Brechung der Resistenz ausreichend waren (Nicolas et al., 1996; 1997).

Ansätze zur biotechnologischen Nutzung des TVMV

Die Möglichkeit zur biotechnologischen Nutzung der TVMV-Nla-Protease wurde von von Bodman et al. (1995) angedacht. Die Autoren nutzten die Nla-Protease für die *cis*-Prozessierung eines Polyproteins, das von einem synthetischen Konstrukt, bestehend aus dem Nla und zwei flankierenden Genen aus dem Opinstoffwechsel, in Tabakzellen exprimiert wurde. In einem weiterführenden Ansatz konnten Dasgupta et al. (1998) die Nla-Protease in einem System nutzen, in dem mehrere Enzyme via Polyproteinprozessierung simultan exprimiert und in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert werden konnten.

1.3.3 Replikation, Ausbreitung in der Pflanze und Aphidenübertragung bei Potyviren

Die in dieser Arbeit wichtigen Informationen zu Replikation und Ausbreitung in der Pflanze bei den Potyviren, sowie deren Übertragung durch Aphiden, sind im Folgenden separat dargestellt, da diese Sachverhalte weder für TVMV noch für PPV allein beschrieben wurden. Für eine generelle Übersicht über die Funktionen von potyviralen Proteinen sei auf die Zusammenfassungen von Revers et al. (1999) und Urcuqui-Inchima et al. (2001) verwiesen.

Potyvirale Proteine bei der Replikation

Nach Revers et al. (1999) sind bei den Potyviren mindestens 7 Proteine in die Genomreplikation involviert. Die P1-Protease kann *in vitro* einzelsträngige RNA binden (Brantley & Hunt, 1993) und wird als Transaktivator bzw. als Regulierungsfaktor bei der Replikation diskutiert (Verchot & Carrington, 1995). N-terminale Bereiche der HC-Pro spielen ebenfalls eine wichtige, aber nicht eindeutig aufgeklärte Rolle bei der RNA-Replikation (Klein et al., 1994; Kasschau et al., 1997). Die Helikaseaktivität des CI (Laín et al., 1990; Eagles et al., 1994) ist essentiell für die Genomreplikation, wobei die Bedeutung der *in vitro* nachgewiesenen N'-terminalen Selbstinteraktion des CI noch unklar ist (Férrandez et al., 1997). Das 6K2-Protein gilt als Membrananker für den Replikationskomplex (Restrepo-Hartwig & Carrington, 1994; Schaad et al., 1997). Das an die 5'-NTR des Genoms bindende VPg ist für die Replikationsinitiation von Bedeutung (Murphy et al., 1990; Shahabuddin et al., 1998) und kann mit pflanzlichen, cap-bindenden Proteinen interagieren (Wittmann et al., 1997; Léonard et al., 2000; Schaad et al., 2000). Der C-Terminus der Nla-Protease verfügt über die Fähigkeit RNA zu binden und ein Signal zur Lokalisation im Nukleus (Merits et al., 1998; Restrepo-Hartwig & Carrington, 1992). Als potyvirale RdRp wird das NIb angenommen (Merits et al., 1998), dessen Fähigkeit zur Interaktion mit dem VPg für TVMV nachgewiesen wurde (Fellers et al., 1998). Haldemann-Cahill et al. (1998) zeigten die Beteiligung des

Hüllproteins in Verbindung mit der 3'-NTR an der Genomreplikation und Hong et al. (1995) demonstrierten *in vitro*, dass die RNA-abhängige RNA-Polymerase des TVMV mit dem Hüllprotein und dem VPg interagieren kann. Da eine Mutation in der RNA-Bindungsstelle des NIa zum Ausbleiben der NIa/NIb-Interaktion führt, gehen Hong et al. (1995) davon aus, dass für diese Interaktion die RNA-Bindung essentiell ist. Die Assemblierung des potyviralen Replikationskomplexes beginnt demnach wahrscheinlich mit der Bindung viraler RNA durch das NIa und seiner Verankerung über das 6K2 an vesikulären Strukturen des ER. Durch eine NIa/NIb-Interaktion des NIa/6K2-Komplexes wird dann die Replikation eingeleitet (Hull, 2002).

Potyvirale Proteine bei der Ausbreitung in der Pflanze

Bei den Potyviren ist kein Ausbreitungsprotein *per se* bekannt. Die Kernregion des Hüllproteins spielt in der Ausbreitung von Zelle zu Zelle eine wichtige Rolle (Rojas et al., 1997), die N- und C-terminalen Enden dagegen im Langstreckentransport (Dolja et al., 1994; 1995). Das CI-Protein übernimmt Funktionen in der Zell-zu-Zell Ausbreitung (Rodríguez-Cerezo et al., 1997; Roberts et al., 1998, Carrington et al., 1998). Für die HC-Pro wurden u.a. Funktionen bei der Langstreckenausbreitung (Kasschau et al., 1997; Cronin et al., 1995), der Plasmodesmatapassage (Rojas et al., 1997) und die Möglichkeit zur Bindung von Nukleinsäuren (Maia & Bernardi, 1996) nachgewiesen. Das 6K2-Protein (Rajamäki & Valkonen, 1999) und das VPg (Schaad et al., 1997; Rajamäki & Valkonen, 1999, 2002, 2003) sind ebenfalls in die Ausbreitung involviert. Die Literaturdaten legen nahe, dass über eine VPg/HC-Pro-Interaktion die Bildung des Ausbreitungskomplexes erfolgt, der unter dem Einfluß des CI zu den Plasmodesmata geschleust wird. Varrelmann & Maiss (2000) konnten auch zeigen, dass eine Mutation in Hüllprotein des PPV-NAT zu einem assemblierungs- bzw. ausbreitungsdefekten Virus führt. Demnach hat ein intaktes Hüllprotein mindestens einen indirekten Einfluss auf die Ausbreitung. Zudem muss die Rolle weiterer viraler und pflanzlicher Proteine noch untersucht werden (Yamabo et al., 2003). Die Autoren schließen nicht aus, dass die Funktionen einiger Proteine bei verschiedenen Potyviren unterschiedlich ausgeprägt sein können.

Übertragung durch Blattläuse

Im Hüllprotein ist das Aminosäuremotiv Asparaginsäure-Alanin-Glycin (DAG) konserviert und für die Übertragung bei den Potyviren essentiell (Atreya et al., 1990; 1995; Nemchinov et al., 1998). PPV-Isolate, die wie z.B. PPV-NAT (Maiss et al., 1989) dieses Motiv nicht besitzen, sind dementsprechend nicht blattlausübertragbar. Am Beispiel des TVMV wurde demonstriert, dass ein einzelner Nukleotidaustausch im Hüllproteingen die Übertragung unterbinden kann (Atreya et al., 1990).

Atreya et al. (1992) konnten zudem die Rolle der TVMV-HC-Pro in der Blattlausübertragung charakterisieren und konnten überdies feststellen, dass sich einzelne Mutationen nicht nur auf die Übertragung, sondern auch auf die Symptomausprägung und den Virustiter auswirken. Die Funktion der HC-pro in der Blattlausübertragung von Potyviren ist verbunden mit den Aminosäuremotiven Lysin-Isoleucin-Threonin-Cystein im (KITC) und Prolin-Threonin-Lysin (PTK), das auch im PPV zu finden ist. Die Substitution des Lysins (K) im KITC-Motiv kann wie das Ersetzen des Threonin im PTK-Motiv zum Verlust der Übertragbarkeit führen (Atreya & Pirone, 1993, Huet et al., 1994). Blanc et al. (1997) konnten für die Interaktion von HC-Pro/CP des TVMV zeigen, dass diese von der Integrität des DAG-Motivs im Hüllprotein abhing und dass bei Modifikationen im DAG-Motiv sowohl die Interaktion, als auch die Blattlausübertragung beeinträchtigt war. Zum gleichen Schluss kommen Lopez-Moya et al. (1999), die Variationen im DAG-Motiv vornahmen, welche jedoch meist zum Verlust der Übertragbarkeit führten.

Es wird davon ausgegangen, dass die HC-pro aufgrund einer Selbstinteraktion bzw. als Dimer eine Bindung der Viruspartikel an Rezeptoren der Mundwerkzeuge ihrer Vektoren vermittelt. Das Hüllprotein geht über eine DAG/PTK-Interaktion eine Bindung mit der HC-Pro ein, die spezifisch durch das KITC-Motiv an den Rezeptor bindet (Blanc et al., 1998; Raccah et al., 2001).

1.3.4 *Potato virus X (PVX)*

Krankheiten & Wirtspflanzenspektrum

Das *Potato virus X (PVX)* ist das Typvirus des Genus der Potexviren, die bislang noch keiner Virusfamilie zugeordnet werden konnten (van Regenmortel et al., 2000). PVX wurde erstmals 1932 von Smith (zit. in: Koenig & Lesemann, 1989) beschrieben. PVX verursacht Schäden an Kartoffeln (*Solanum tuberosum*), ist aber auch in der Lage andere Nachtschattengewächse (*Solanaceae*), wie z.B. Tomaten (*Lycopersicon esculentum*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*), zu infizieren. Für die Viruserhaltung im Labor eignet sich neben *N. tabacum* auch *N. benthamiana*. An Kartoffeln verursacht PVX mosaikartige Aufhellungen der Blätter. Hier kann das Virus allerdings auch latent vorkommen. Die Ertragsausfälle können 10 bis 20% betragen (Koenig & Lesemann, 1989). An Tomaten ist ein PVX-Befall durch einen gestauchten Wuchs der Pflanzen und Mosaik auf den Blättern zu erkennen. In Tabak werden an den Blättern neben Mosaiksymptomen auch nekrotische Flecken hervorgerufen.

Genomorganisation

Die Genomorganisation und -expression, sowie die grundsätzlichen Funktionen der meisten Proteine sind bei Koenig & Lesemann (1989) und Hull (2002) zusammenfassend dargestellt. Die folgende Übersicht ist diesen Quellen entnommen.

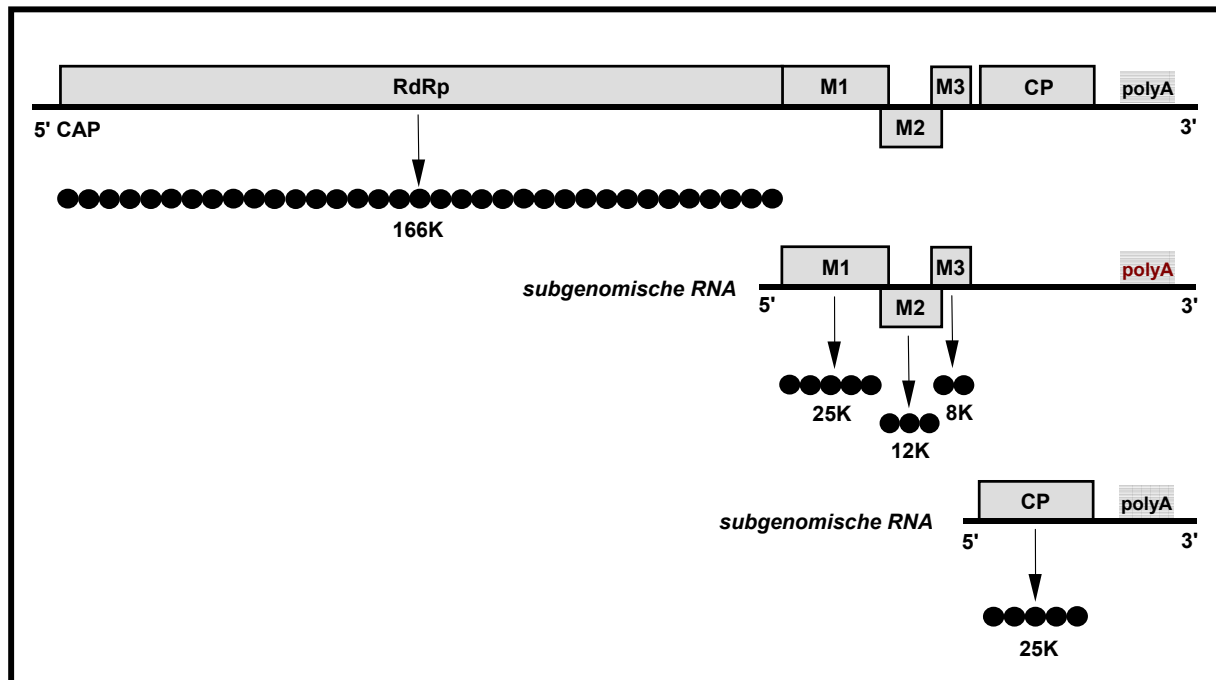


Abbildung 1-2 Genomorganisation und -expression des *Potato virus X* (PVX)

Graue Kästen stellen die offenen Leseraster (ORF) der einzelnen Gene, schwarze Ketten deren Proteine dar. Für die viralen Proteine werden die jeweiligen Molekulargewichte angegeben. Eine Synthese von subgenomischen RNAs erfolgt für den TGB und das CP. RdRp = RNA-abhängige RNA-Polymerase; M1 = "movement protein 1", analog M2 und M3; TGB = "triple gene block" (M1+M2+M3); CP = Hüllprotein

(verändert nach Angaben von Koenig & Lesemann, 1989 und Hull, 2002)

Bei PVX-Virionen handelt es sich um fadenförmige, ca. 515 nm lange Partikel mit einem Durchmesser von ca. 13 nm. Die Sequenz des sinnpositiven ssRNA-Genoms wurde von Huismann et al. (1988) bestimmt. Die Genomorganisation und -expression ist in Abbildung 1-2 graphisch dargestellt. Am 5'-Ende befindet sich ein m⁷GpppG-cap und der 3'-Terminus wird mit einem polyA-Tail abgeschlossen. Es gibt auf der genomischen RNA fünf offene Leseraster. Dem ORF 1 vorgelagert ist eine 84 Nukleotide große 5'-"leader"-Sequenz. Der ORF 1 selbst kodiert für die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase. Die sich teilweise überlappenden ORFs 2, 3 und 4 bilden den für die Potex- und Carlaviren charakteristischen sog. "triple gene block" (TGB). Dieser kodiert für drei Proteine, die ihrer Größe nach benannt werden: 25 K, 12 K und 8 K (alternativ werden in der Literatur häufig M1, M2 und M3 verwendet). Die TGB-Proteine sind in die Ausbreitung des Virus in der Pflanze involviert und

werden im Weiteren separat besprochen. Im Anschluss an den TGB befinden sich ORF 5 und die 76 Nukleotide große, 3'-NTR. ORF 5 stellt die kodierende Sequenz für das Hüllprotein des PVX dar, dass für die Enkapsidation der viralen RNA verantwortlich ist. Das Hüllprotein und die TGB-Proteine werden, wie aus Abbildung 1-2 ersichtlich ist, über zwei subgenomische RNAs exprimiert. Am 3'-Ende des (+)-Stranges befindet sich der Promoter für die Replikase zur (-)-Strangsynthese. Eine Polymerasebindungsstelle am 3'-Ende der (-)RNA gewährleistet die Synthese der (+)RNA. Entsprechend verfügen TGB und Hüllprotein über interne Promotoren als Ansatzstellen zur Synthese subgenomischer RNAs.

Bedeutung und Bekämpfung

In der Züchtung und Vermehrung von Kartoffeln wird aufgrund von Kartoffelvirosen verstärkt die Herstellung virusfreien Materials mittels *in vitro*-Propagation durchgeführt. Für den Anbau von Kartoffeln ist die konventionelle Züchtung nach wie vor bedeutend und baut auf der Nutzung von Resistenzgenen (*Nx*, *Nb*, *Rx_{adg}*, *Rx_{acl}*) gegenüber PVX auf. Eine generelle Übersicht über die Resistenzzüchtung bei Kartoffeln unter Berücksichtigung der Pathogenvermittelten Resistenz gegenüber PVX lieferten Solomon-Blackburn & Barker (2001a; b).

Übertragung und Verbreitung

Als Vektoren für das PVX werden in der Literatur die Grashüpferarten *Melanoplus differentialis* und *Tettigonia viridissima* genannt. Eine Übertragung durch *Synchytrium endobioticum*, einem den *Protozoa* zugeordneten "Pilz" wird entgegen früherer Annahmen (Campbell, 1979) als nicht evident angesehen (Adams, 1991; Campbell, 1996). Im Erwerbsanbau ist vor allem die mechanische Übertragung, verursacht durch den Gebrauch von landwirtschaftlichen Geräten, z.B. bei der Pflanzung oder der Unkrautbekämpfung, von Bedeutung. Dementsprechend kann eine großräumige Verbreitung durch infiziertes Pflanzgut erfolgen (Koenig & Lesemann, 1989).

Ausbreitung in der Pflanze

An der Ausbreitung des PVX sind die drei TGB-Proteine und das CP beteiligt. Unter Berücksichtigung mehrere Ansätze zur Erklärung der PVX-Ausbreitung wird ein Modell, das leichte Abweichungen von dem für das gesamte Genus der Potexviren postulierten Modell von Lough et al. (1998) aufweist, diskutiert. Demnach bilden das 25 K-Protein und das Hüllprotein einen Komplex mit dem 12 K- und dem 8 K-Protein, wobei letzteres als Membrananker am ER fungiert. Dieser Komplex bindet die virale RNA, um sie durch die Plasmodesmata zu schleusen (Lough et al., 1998; 2000; Yang et al., 2000, Krishnamurthy et al., 2002; 2003).

Replikation

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase wird, wie bereits beschrieben, vom ORF 1 des PVX Genoms kodiert. Am 3'-Ende eines Potexvirusgenoms ist ein konserviertes Hexanucleotid als Erkennungssignal für die Replikationsinitiation lokalisiert (White et al., 1992). Des Weiteren wurde ein acht Nukleotide großes, Uridin-reiches Sequenzmotiv vom Replikations-initiationsmotiv aus stromabwärts am 3'-Ende des PVX-Genoms identifiziert, welches essentiell für die Replikation ist und darüber hinaus an Proteine der Wirtspflanze bindet (Sriskanda et al., 1996). Demnach entsteht nach der Translation der viralen RNA die RdRp und initiiert am beschriebenen Hexanukleotid die Minusstrangsynthese. Für die Replikation ist auch die Bindung der PVX-5'-NTR über das Uridin-reiche Motiv an ein 54 kDa großes Wirtsprotein wichtig (Kim et al., 2002). Die Bindung an Wirtsproteine ist eventuell für die Stabilität der RNA und/oder die Lokalisierung des Replikationskomplexes wichtig (Sriskanda et al., 1996; Kim et al., 2002).

1.4 Reportergene

Im Folgenden wird ein kurzer Einblick in die Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten der Reportergene "green fluorescent protein" (GFP) und "red fluorescent protein" (DsRed) gegeben. Die enorme Anzahl an wissenschaftlichen Publikationen zum Thema macht es notwendig eingangs auf Übersichtsartikel von Chalfie (1995), Tsien (1998), Wouters et al. (2001) und Lippincott-Schwartz & Patterson (2003) zu verweisen.

Die Gene für die β -Glucuronidase (Jefferson et al., 1987) und die Luziferase (Ow et al., 1986) werden schon seit langem als Reporter genutzt. Jedoch ist für den Nachweis ihrer Reporteraktivität die Zugabe eines Substrates essentiell, was *in vivo*-Beobachtungen unmöglich macht (Baulcombe et al., 1995). Die Verwendung von autofluoreszierenden Reporterproteinen ermöglicht dagegen die Visualisierung biologischer Prozesse auf zellulärer Ebene *in vivo*, wobei außer Sauerstoff keinerlei Co-Faktoren oder Substrate erforderlich sind. Nach stabiler oder transients Transformation können die Reportergene frei oder als Fusionsprodukt heterlog exprimiert und nach Anregung mit den entsprechenden Wellenlängen deren Fluoreszenz detektiert werden (Tsien, 1998).

Der bekannteste Vertreter dieser neuen Generation von Reportergenen ist das Gen für das GFP, das aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Shimomura et al., 1962). Aber auch das aus der Koralle *Discosoma striata* isolierte Gen für DsRed (Matz et al., 1999) wird zunehmend häufig in der Molekularbiologie eingesetzt (Campbell et al., 2002). Durch

zahlreiche Modifikationen des GFP-Wildtyps (wt-GFP) und mittlerweile auch des DsRed, ist eine nur schwer überschaubare Anzahl an Markervarianten entstanden.

1.4.1 Das "green fluorescent protein" – GFP

Das wt-GFP von *A. victoria* besitzt 238 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 27 kDa auf. Es weist ein Hauptabsorptionsmaximum bei 395 nm und ein Nebenmaximum mit geringerer Amplitude bei 475 nm auf. Nach der entsprechenden Anregung des Chromophors (s.u.) emittiert das Protein Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von ca. 508 nm. Das Protein ist ein 11-strängiges β -"Faß" und wird in seiner Achse von einer α -Helix durchzogen (Abbildung 1-4). In der Mitte der α -Helix ist das Chromophor lokalisiert. Dieses ist ein p-Hydroxybenzylidenimidazolinon und entsteht in Folge einer Kondensationsreaktion durch die Faltung der zyklisch angeordneten Aminosäuren Serin (Position 65), Tyrosin (Position 66) und Glycin (Position 67) (Cubitt et al., 1995). Für die Chromophorbildung wird auch eine essentielle Rolle des Arginins an Position 96 (R96) angenommen (Ormö et al., 1996).

In vielen molekularbiologischen Anwendungen besitzt GFP eine hohe Stabilität. Das Protein kann Fluoreszenzlicht z.B. noch bei 65 °C, pH-Werten bis zu pH 11 oder aber auch nach Zugabe von SDS_{1%} bzw. 6 M Guanidin-HCL emittieren (Cubitt et al., 1995). Allerdings sind hierbei Unterschiede einzelner GFP-Varianten zu beachten. Es gibt GFP, bei welchen hohe pH-Werte (pH >10-11) und steigende Temperaturen eine Verlagerung der Absorption von 395 nm zum 475 nm Maximum bewirken. Dem gegenüber gibt es auch säureempfindliche Varianten, die bei pH-Werten unter 4,5 in ihrer Wirkung stark beeinträchtigt werden (Tsien, 1998).

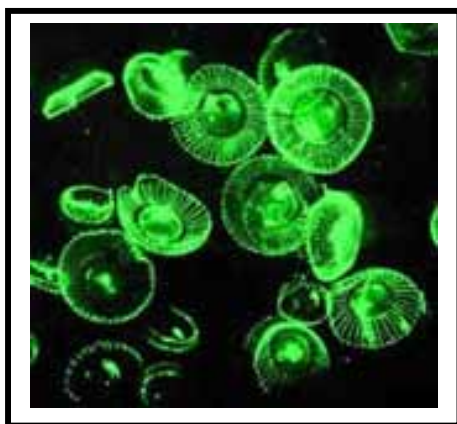


Abbildung 1-3 Die Qualle *Aequorea victoria* als Herkunft des "green fluorescent protein" (GFP).

(aus Haseloff, 2000)

GFP-Modifikationen

Aufgrund der enormen Vielfalt an modifizierten GFP-Varianten soll an dieser Stelle nur auf solche hingewiesen werden, die zum Verständnis der in dieser Arbeit verwendeten Variante beitragen. Für weitere Informationen sei insbesondere auf die Zusammenfassung von Lippincott-Schwartz & Patterson (2003) verwiesen.

Ein wichtiger Schritt in der GFP-Optimierung war das Einfügen der Mutation S65T, also dem Austausch von Serin an Position 65 durch Threonin. Dadurch wurden die beiden ursprünglichen Absorptionsmaxima durch ein neues Maximum ersetzt, dessen Absorption in den längerwelligen Bereich verschoben war. Durch das neue Absorptionsmaximum bei 488 nm (Emission bei 511 nm) konnten bisherige "photobleaching"-Effekte nur noch geringfügig und die Fotoisomerisation nicht mehr beobachtet werden. Zudem besaß die S65T-Mutante eine wesentlich erhöhte Leuchtkraft (Cubitt et al., 1995).

Ein erhebliches Problem war die extrem eingeschränkte Markerexpression in GFP-transgenen Pflanzen, die auf ein kryptisches Intron im wt-GFP Gen zurückzuführen war. Dieses wurde in Pflanzen auf der GFP-mRNA als Intron erkannt und durch Spleißen entfernt, was die Funktionalität des Markers zerstörte (Haseloff et al., 1997). Die Autoren modifizierten die "codon-usage" im Bereich des kryptischen Introns, wodurch das Spleißen verhindert wurde. Die hieraus hervorgegangene GFP-Variante wurde als m-GFP4 (modified-GFP4) bezeichnet. In diesem Zusammenhang wurde auch die für die Expression in Pflanzen wichtige optimale Umgebungssequenz des Startcodons generiert. Dies führte zur erfolgreichen GFP-Expression in *Arabidopsis thaliana* mit der neuen GFP-Variante.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der GFP-Optimierung war die Schaffung von Varianten mit veränderten spektralen Eigenschaften durch Modifikationen des Chromophors (Heim et al., 1994; 1995). Dies führte letztendlich zu einer Reihe von unterschiedlichen, heute kommerziell angebotenen GFP-Varianten, wie dem "blue fluorescent protein" (BFP), dem "cyan fluorescent protein" (CFP) oder dem "yellow fluorescent protein" (YFP).

Die u.U. toxische Wirkung von GFP durch Aggregation in heterologen Zellen wurde durch Cramer et al. (1996) durch die Selektion einer Mutante ("cycle-three mutant") mit erhöhter Löslichkeit durch die Aminosäuresubstitutionen Phenylalanin statt Serin (Position 99, F99S), Methionin statt Threonin (Position 153, M153T) und Valin statt Alanin (Position 163, V163A) stark reduziert.

Die von Davis & Vierstra (1998) erzeugte GFP-Variante kombiniert die o.g. Vorteile. Die Autoren verbanden die optimierte "codon-usage" des m-GFP4 mit der erhöhten Löslichkeit ("soluble-modified"-GFP, sm-GFP). Des Weiteren integrierten sie die Mutationen S65T bzw. Thyrosin statt Histidin an Position 66 (Y66H) im Chromophor, wodurch veränderte Fluoreszenzspektren im sm-GFP eingebracht wurden. Es entstanden ein S65T-GFP mit einem in den roten Bereich verschobenem Anregungsmaximum und erhöhter Löslichkeit

("soluble-modified red-shifted"-GFP, smRS-GFP) und die blau fluoreszierende Y66H-Variante, ebenfalls mit erhöhter Löslichkeit ("soluble-modified blue-shifted"-GFP, sm-BFP). Allerdings ist die Anwendung von BFP aufgrund des pH-Werts in pflanzliche Systemen stark eingeschränkt (Divéki et al., 2002).

Anwendung

GFP eignet sich aufgrund seiner Stabilität gut zur heterologen Expression (Heim et al., 1994) und wurde z.B. in prokaryotischen (*Escherichia coli*) und niederen tierischen Systemen (*Caenorhabditis elegans*), aber auch in Pflanzen und Mäusen exprimiert (Chalfie et al., 1994; Haseloff et al., 1997; Okabe, 1997).

GFP-Marker können laut Tsien (1998) als passive Reporter angewendet oder als aktive Indikatoren genutzt werden. Grundsätzlich können chemische, biochemische, biologische oder physikalische Prozesse mit GFP visualisiert werden. Die Fluoreszenz kann das Maß einer Genexpression in Promoterstudien oder als Fusionsprotein die Lokalisation von Genprodukten anzeigen (Tsien, 1998). Es ermöglicht die Untersuchung von "gene silencing"-Effekten in transgenen Pflanzen (Baulcombe, 1995), die Markierung transgener Zelllinien (Cubitt et al., 1995) und kann zum Monitoring der heterologen Expression biotechnologisch nutzbarer Proteine durch virale Vektoren in Pflanzen eingesetzt werden (MacFarlane & Popovic, 2000).

Die Markierung von Pflanzenviren mit GFP zur Visualisierung der Virusausbreitung in pflanzlichen Geweben wurde an einem PVX-Vektor erstmals von Baulcombe et al. (1995) demonstriert. Tabelle 1-3 ist eine Auswahl zu entnehmen, welche die unterschiedlichen Verwendungsmöglichkeiten von GFP in der Pflanzenvirologie verdeutlichen soll.

Tabelle 1-3 Beispiele für die Markierung von Pflanzenviren mit unterschiedlichen Varianten des Gens für das "green fluorescent protein" (GFP)

Virus	Art bzw. Ort der Insertion	GFP-Variante*	Quelle
<i>Bean dwarf mosaic virus</i> (BDMV)	RNA A, CP x GFP	m-GFP4 (Haselhoff et al., 1997)	Sudarshana et al. (1998)
<i>Beet yellows virus</i> (BYV)	CP _{minor} ~ GFP ~ CP	EGFP (Clontech)	Alzhanova et al. (2000)
<i>Beet necrotic yellow vein virus</i> (BNYVV)	MP _{P42} ::GFP	GFP (Reichel et al., 1996)	Erhardt et al. (2000)
<i>Clover yellow vein virus</i> (CIYVV)	P1 ~ GFP ~ HC-Pro P1 ~ GFP ~ GS ~ HC-Pro P1 ~ GFP:GS ~ HC-Pro	GFPcycle3 (Cramer et al., 1996)	Masuta et al. (2000)
<i>Cowpea mosaic virus</i> (CPMV)	RNA 2, MP ~ GFP ~ CP _{large} RNA 2, CP _{small} ~ GFP ~ polyA MP::CP RNA 2, CP x GFP RNA 2, MP x GFP RNA 2, MP _(GRV) ~ GFP ~ CP	GFP10 (Prasher et al., 1992) GFP10.1 (Chalfie et al., 1994)	Gopinath et al. (2000) Pouwels et al. (2003) Verver et al. (1998)

Fortsetzung Tabelle 1-3

Virus	Art bzw. Ort der Insertion	GFP-Variante*	Quelle
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	RNA 3, CP x GFP RNA 3, 3aMP x GFP RNA 3, CP x GFP RNA 3, GFP::3aMP RNA 3, 3aMP::GFP RNA 3, 3aMP ⁻ GFP ⁻ CP	GFP10.1 (Chalfie et al., 1994) pS65T-C1 (Clontech)	Ryabov et al. (1999) Canto et al. (1997)
<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV)	GFP::MP	EGFP (Clontech)	Laporte et al. (2003)
<i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV)	GFP::HC-Pro	m-GFP5-ER (Kirby et al., 1996)	German-Retana et al. (2000)
<i>Pea early-brownig virus</i> (PEBV)	RNA 2, 2b- und 2c-Gen x (P _{TRV})GFP	GFPcycle3 (Crameri et al., 1996)	MacFarlane & Popovic (2000)
<i>Plum pox virus</i> (PPV)	NI _b ⁻ GFP ⁻ CP	keine Angaben	López Moya et al. (2000)
<i>Pepper ringspot virus</i> (PepRV)	RNA 2, 2b- und 2c-Gen x (sgP _{PEBV})GFP	GFPcycle3 (Crameri et al., 1996)	MacFarlane & Popovic (2000)
<i>Potato virus X</i> (PVX)	GFP::CP TGB ⁻ GFP ⁻ CP GB ⁻ GFP::M1 ⁻ CP TGB ⁻ M1::GFP ⁻ CP TGB ⁻ GFP ⁻ CP CP x GFP GFP::CP TGB ⁻ MP _(TMV) ::GFP ⁻ CP TGB ⁻ MP _(CMV) ::GFP ⁻ CP TGB ⁻ GFP ⁻ CP	GFP10 (Prasher et al., 1992) GFP10 (Prasher et al., 1992) GFP10.1 (Chalfie et al., 1994) GFP10 (Prasher et al., 1992)	Santa Cruz et al. (1996) Yang et al. (2000) Oparka et al. (1995; 1997) Oparka et al. (1997) Baulcombe et al. (1995)
<i>Soil-borne wheat mosaic virus</i> (SBWMV)	37K::GFP CP::GFP CP(RT):GFP		An et al. (2003)
<i>Tobacco rattle virus</i> (TRV)	RNA 2, 2b(3')- und 2c-Gen x (sgP _{PEBV})GFP	GFPcycle3 (Crameri et al., 1996)	MacFarlane & Popovic (2000)
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	MP::GFP CP x GFP	GFP10.1 (Chalfie et al., 1994) GFP10.1 (Chalfie et al., 1994)	Reichel et al. (1999) Heinlein et al. (1995) Shivprasad et al. (1999)

entnommen und erweitert aus Dietrich (2000); *namensgebende Erstbeschreibung der Variante (nicht immer übereinstimmend mit der von "Quelle" angegebenen Publikation); :: = GFP-Fusion; x = Substitution; ⁻ GFP⁻ = GFP-Insertion als unabhängiges Cistron/ORF; TGB = Triple Gene Block; MP_(TMV) = "movement protein" (MP) aus *Tobacco mosaic virus*; MP_(GRV) = MP aus *Groundnut rosette virus*; sgP_{PEBV} = verdoppelter subgenomischer PEBV-Promoter; P_{TRV} = TRV-Promoter; RT = "read-through"

1.4.2 Das "red fluorescent protein" – DsRed

Das rot-orange fluoreszierende Protein DsRed von *Discosoma striata* (Abbildung 1-4) wurde zuerst von Matz et al. (1999) beschrieben. Das Protein besteht aus 225 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 25,9 kDa. Die Anregungswellenlänge des einzigen Absorptionsmaximums beträgt 558 nm und liegt damit relativ nahe dem Emissionsmaximum bei 583 nm. Matz et al. (1999) fanden bei einem Vergleich von DsRed und GFP, dass von den drei chromophorbildenden Aminosäuren Serin (S, Position 65), Tyrosin (Y, Position 66)

und Glycin (G, Position 67) des GFP das Motiv Y66-G67 konserviert vorlag. Das nach Ormö et al. (1996) beim GFP an der Chromophorbildung beteiligte R96 findet sich ebenfalls bei DsRed wieder. Es ist daher davon auszugehen, dass der Mechanismus zur Fluoreszenz-erzeugung dem des GFP ähnlich ist. Weitere konservierte Bereiche werden in Abbildung 1-4 dargestellt. Die aufgezeigten Homologien lassen sich darüber hinaus auf Fluoreszenzproteine weiterer *Anthozoa*-Spezies übertragen, so dass, zumindest für die Cnidarien (Nesseltiere), ein relativ hoch konservierter Mechanismus für die Funktion von Fluoreszenzproteinen vorliegen muss (Tsien, 1999).

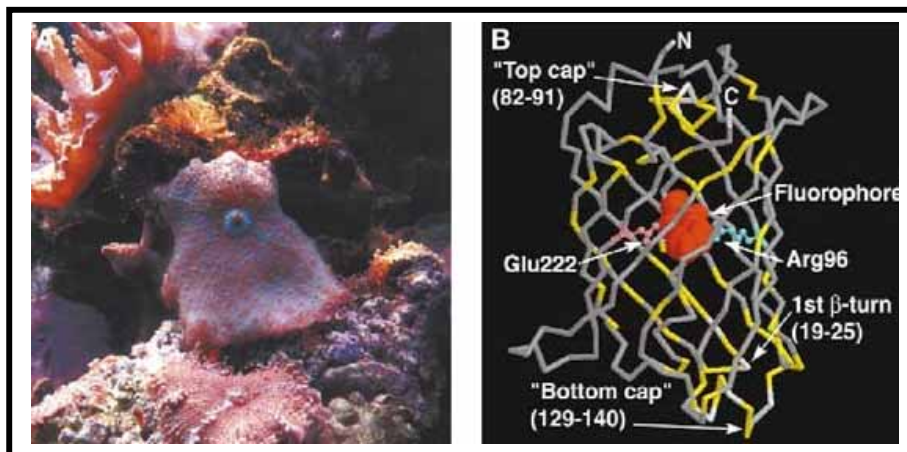


Abbildung 1-4 Herkunft von DsRed und Homologien zu GFP

(A) zeigt die Koralle *Discosoma* sp. als Quelle des Reportergens DsRed in ihrer natürlichen Umgebung; (B) verdeutlicht den schematischen Aufbau des GFP und Homologien zu DsRed. Das Chromophor ist rot, homologe Sequenzen von GFP und DsRed sind gelb hervorgehoben. (aus Tsien, 1999)

Nach Angaben von Baird et al. (2000) kann die Reifung des DsRed-Proteins mehrere Tage dauern. Während dieser Zeit wird teilweise grünes Licht emittiert, was zu einem internen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Signal führen kann. DsRed ist daher u.U. nur eingeschränkt für FRET-Experimente mit einigen GFP-Varianten geeignet. Allerdings ist DsRed im Bereich von pH 5 bis pH 12 wesentlich stabiler als die meisten GFP-Varianten. Entsprechend des noch jungen Datums seiner ersten Beschreibung und der sehr weit verbreiteten Anwendung von GFP als Fluoreszenzmarker wurden im Vergleich zu diesem noch entsprechend wenige Modifikationen zur Verbesserung der Markereigenschaften am DsRed vorgenommen.

Vom Lizenzinhaber Clontech wurden eine Reihe von DsRed-Varianten hergestellt, die durch Modifikationen in ihrer "codon usage" oder der Promoterregion auf die Expression in verschiedenen pro- und eukaryotischen Systemen abgestimmt wurden (Anonym, 1999).

Nach heterologer Expression von DsRed in verschiedenen Systemen (s.u.) konnten von Matz et al., (1999) keine Hinweise auf Toxizität des Proteins gefunden werden. Allerdings war neben der o.g. langsamen Reifung des Proteins die obligate Tetramerbildung von DsRed in vielen Anwendungen ein großer Nachteil und kann eventuell die Bildung von Aggregationen in einigen bakteriellen Expressionssystemen (Anonym, 1999) teilweise erklären. Dieses Problem wurde von Campbell et al. (2002) durch Mutagenisierung des DsRed Gens gelöst. Das Einfügen von 33 Aminosäuresubstitutionen war zwar mit einem geringeren Extinktionskoeffizienten und einer etwas geringeren Photostabilität verbunden, jedoch war die entstandene Variante (mRFP1) monomer und zeigte eine etwa 10fach schnellere Reifung. Ebenfalls eine deutlich schnellere Reifung und erhöhte Löslichkeit von DsRed erreichten Bevis & Glick (2002). Zudem ergaben sich in den roten Bereich verschobene Anregungs- und Emissionsspektren, was bei der kombinierten Verwendung mit vielen GFP-Varianten von großem Vorteil ist.

Grundsätzlich kann DsRed wie GFP in der Molekularbiologie eingesetzt werden. Limitationen bestehen beim Einsatz in Pflanzen, da diese ebenfalls rotes Fluoreszenzlicht emittieren, was die Detektion der Markerfluoreszenz erschwert.

Matz et al. (1999) zeigten, dass DsRed in *Escherichia coli* und unter Kontrolle des Cytomegalievirus-Promoters in HEK-293 Zellen exprimiert werden kann. Ebenfalls konnten die Autoren erfolgreich zeigen, dass die DsRed-mRNA nach Mikroinjektion in *Xenopus laevis* exprimiert wird. Hierbei konnte beobachtet werden, dass DsRed über einen Zeitraum von vier Wochen in *X. laevis* stabil war.

Die Spektralbereiche von den bisher bekannten GFP-Varianten liegen in Anregung und Emission meist deutlich unter dem Bereich von DsRed, was einen kombinierten Einsatz von DsRed mit verschiedenen GFP-Varianten in Doppelsexpressionen ermöglicht (Lippincott-Schwartz & Patterson, 2003). Die verschobenen Absorptions- und Emissionsspektren von DsRed und einigen GFP-Varianten, insbesondere mit S65T-GFP, YFP, CFP, BFP lassen Experimente mit bis zu drei farblich unterschiedlichen Proteinen zu. Mit DsRed ist ein neuer qualitativ hochwertiger Marker gefunden worden, der in Verbindung mit GFP-Varianten ein erweitertes Nutzungsspektrum für Fluoreszenzproteine bedeutet.

1.5 Zielsetzung

Die Arbeit wurde im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten Projektes VRTP IMPACT angefertigt. Dieses Projekt befasste sich mit dem Einfluss bzw. der biologischen Bedeutung (IMPACT) von VRTP auf ihre Umwelt, wobei der durch diese Arbeit vertretene

Teil schwerpunktmäßig auf den Sicherheitsaspekt des Austauschs von genetischem Material zwischen potyVRTP und einem Potyvirus durch Rekombination fokussierte. Grundsätzlich sollten die Untersuchungen des gesamten Projektes hinsichtlich Rekombinationsereignissen eine Datenlage schaffen, die eine Bewertung des potenziellen Risikos von VRTP zulässt.

Prinzipiell sollte ausgehend von den in Abschnitt 1.1.3 vorgestellten Bewertungskriterien für die Evaluierung von VRTP sowohl das Auftreten selbst, als auch die Häufigkeit des Auftretens von Rekombinationsereignissen in VRTP und in nicht-transgenen Pflanzen untersucht werden. Zusätzlich sollte die Gefahr, die Rekombinationsereignisse u.U. nach sich ziehen können evaluiert werden, um in Verbindung mit der Rekombinationshäufigkeit eine Aussage hinsichtlich eines potenziellen Risikos treffen zu können. Hierfür sollten die folgenden Versuchsansätze dienen:

1. Ein Teil der Untersuchungen zielte darauf ab, zu klären, ob und wie häufig RNA-Rekombination zwischen zwei nahe verwandten Viren des gleichen Genus in doppelinfizierten nicht-transgenen Pflanzen vorkommt. Diese Ergebnisse sollten die Rekombinationshäufigkeit unter natürlichen Bedingungen repräsentieren.
2. Der zweite Teil der Untersuchungen behandelte die Rekombination zwischen einem Virus und der mRNA des Transgens einer VRTP. Hierbei sollten das Virus und die taxonomische Herkunft des Transgens ebenfalls eine nahe Verwandtschaft aufweisen. Eine aus dieser Kombination ermittelte Rekombinationsrate sollte die Verhältnisse in VRTP widerspiegeln.

Ein Vergleich der VRTP-Rekombinationsrate (Punkt 1) und der natürlichen Rekombinationsrate (Punkt 2) sollte entsprechend dem Ansatz von Aaziz & Tepfer (1999a) eine Abschätzung der Rekombinationshäufigkeit in VRTP zulassen, bzw. zeigen, ob VRTP tatsächlich eine veränderte Rekombinationsrate aufweisen und eventuell das Auftreten von rekombinanten Viren fördern kann oder ob dies nicht der Fall ist.

Der Aufklärung der Rekombinationshäufigkeit sollte die Evaluierung einer möglichen Gefahr rekombinanter Viren folgen, in dem

3. rekombinante Viren hinsichtlich ihrer eventuell modifizierten biologischen Eigenschaften untersucht werden sollten.

Da die absolute Grundbedingung für ein Rekombinationsereignis die Anwesenheit der Rekombinationspartner in einer Zelle ist, es jedoch wenig Informationen zur Verteilung von Viren in Mischinfektionen gibt, sollte im Rahmen der o.g. Untersuchungen geprüft werden,

4. in welchem Ausmaß Viren in einer Mischinfektion Gewebe tatsächlich doppelinfizieren.

Für die Untersuchungen wurden die Viren PPV-NAT und TVMV als Vertreter der Potyviren ausgewählt. Es lagen für beide Viren infektiöse cDNA "full-length"-Klone und mit *N. benthamiana* ein gemeinsames, gut etabliertes Wirtssystem vor. Als VRTP wurden zwei PPV-transgene Linien gewählt, die das translatierte PPV-NAT-Hüllprotein mit 5'-NTR bzw. das PPV-AT-Hüllprotein mit nur einem Teil der 5'-NTR exprimieren. Für die Untersuchungen zur Verteilung der Viren in Mischinfektionen standen die Reportergene einer S65T-GFP - Variante (sm-RS-GFP; Davis & Vierstra, 1998) und des DsRed (Matz et al., 1999) zur Verfügung.

Die Methodik zur Durchführung der oben in Punkt 1 bis 4 genannten Aspekte beinhaltete

- A. die Entwicklung von Oligonukleotiden zur Detektion von TVMV, PPV-NAT und eventuell auftretenden PPV-NAT/TVMV-Rekombinanten. Hierbei sollte aufgrund des relativ großen Genoms und entsprechenden Berichten zum Auftreten von natürlichen Rekombinanten im Nlb/Hüllprotein-Bereich der 3'-Terminus des Genoms untersucht werden.
- B. die Entwicklung eines RT-PCR-Systems zur Detektion von rekombinanten PPV-NAT/TVMV-Sequenzen und die Bestimmung der Sensitivität des Systems.
- C. Untersuchungen zum Virulenzverhalten und Wirtspflanzenspektrum von rekombinanten Potyviren. Da im Verlauf der Arbeit keine natürlichen PPV-NAT/TVMV-Rekombinanten auftraten, wurde im Rahmen einer Masterarbeit (Al Abdallah, 2002) bei einem PPV-NAT "full-length"-Klon das Hüllprotein gegen das Hüllprotein von PPV-SoC ausgetauscht und entsprechend untersucht.
- D. die Markierung von Viren zur Charakterisierung ihrer Verteilung in Mischinfektionen mit den Reportergenen smRS-GFP und DsRed. In diesem Zusammenhang sollte zudem ein Vergleich der Verteilung nahe verwandter und nicht-verwandter Viren gezogen werden, in die aus diesem Grund das Potexvirus PVX für Vergleichszwecke miteinbezogen werden sollte.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Nicotiana benthamiana 17.27.1

Als experimentelle Wirtspflanze zur Erhaltung aller in dieser Arbeit verwendeten Viren und für die Durchführung von Versuchen wurde die *N. benthamiana* Linie 17.27.1 verwendet. Diese Linie hat Gewebekultur, Pflanzentransformation und Regeneration durchlaufen, ist aber nicht transgen (Timpe et al., 1992).

Nicotiana benthamiana 17.27.4

Die *N. benthamiana*-Linie 17.27.4 ist ebenfalls eine transgene homozygote T2-Linie. Die Transformation erfolgte mit einer pflanzlichen Expressionskassette (Abbildung 2-1), die in Tandemanordnung das vollständige, funktionsfähige Hüllproteingen des PPV-AT mit 54 bp der 3'-NTR enthält (Timpe et al., 1992) und führte zu einer Insertion (Varrelmann, 1999). Gegen PPV-NAT zeigten die Pflanzen der Linie 17.27.1 eine "recovery"-Resistenz, d.h. dass ca. zwei Wochen nach einer PPV-NAT-Infektion eine Erholung eintrat und die Neuaustriebe symptomfrei waren (Varrelmann, 1999).

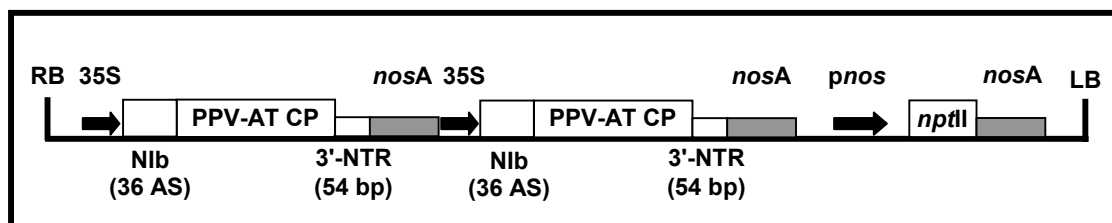


Abbildung 2-1 Expressionskassette der PPV-transgenen *N. benthamiana* Linie 17.27.4

AS = Aminosäuren; 35S = CaMV 35S-Promotor; pA-CaMV = Polyadenylierungssignal aus CaMV; pnos = Nopalinsynthetase Promotor; 3'-NTR = 3'-nicht translatierte Region; Nib = "nuclear inclusion body b"; nptII = Neomycin Phosphotransferase; LB = "left border"; RB = "right border"; GUS = β -Glucuronidase, nosA = Nopalinsynthetase Termination (verändert nach Varrelmann, 1999)

***Nicotiana benthamiana* 4.30.45**

Die *N. benthamiana*-Linie 4.30.45 ist eine transgene homozygote T2-Linie. Die für die Transformation verwendete pflanzliche Expressionskassette (Abbildung 2-2) enthält das komplette, funktionstüchtige Hüllproteingen des PPV-NAT mit der vollständigen, 220 bp umfassenden 3'-NTR (Korte et al., 1995). Die Linie weist eine transgene Insertion auf. Infektionsversuche ergaben für die Linie 4.30.45 eine "recovery"-Resistenz gegenüber PPV-NAT, wobei von 35 Pflanzen 25 eine "recovery"-Resistenz, 5 eine Infektionsresistenz und 5 keine Resistenz zeigten (Varrelmann, 1999).

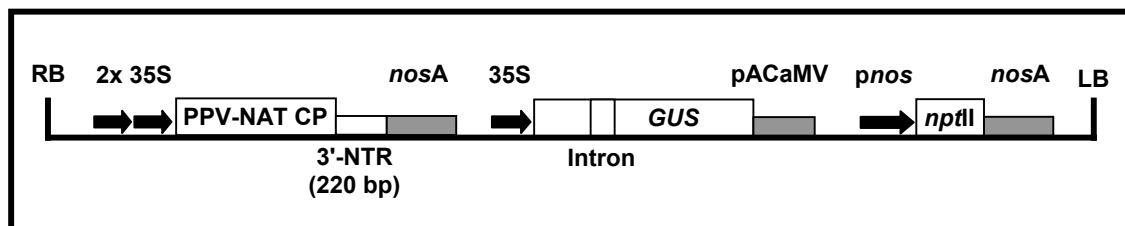


Abbildung 2-2 Expressionskassette der PPV-transgenen *N. benthamiana* Linie 4.30.45

AS = Aminosäuren; 35S = CaMV 35S-Promotor; pA-CaMV = Polyadenylierungssignal aus CaMV; *pnos* = Nopalinsynthetase Promotor; 3'-NTR = 3'-nicht translatierte Region; Nlb = "nuclear inclusion body b"; *nptII* = Neomycin Phosphotransferase; LB = "left border"; RB = "right border" (verändert nach Varrelmann, 1999)

Weitere Testpflanzen

Für einen Test hinsichtlich des Wirtspflanzenkreises von Viren wurden verschiedene, am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz (IPP) vorhandene Pflanzen verwendet. Hierzu zählen die *Nicotiana* Arten *N. rustica*, *N. debneyi*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, *N. glutinosa*, *N. tabaccum* 'Xanthi nc.', *N. tabaccum* 'Samsun nn' und *N. tabaccum* 'White Burley'. Des Weiteren wurden *Chenopodium quinoa*, *C. foetidum* (IPP) und *Nicandra physalodes* (Botanischer Garten München) verwendet.

2.1.2 Viren und virale Klone

Tabelle 2-1 Virusisolate

Virus	Referenz	Herkunft
<i>Tobacco vein mottling virus</i>	PV-0253	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)

Tabelle 2-2 Virale "full-length"-Klone*

Virus	Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
<i>Clover yellow vein virus</i>	p35CIYVV-GFP	Masuta et al. (2000)	Dr. I. Uyeda
<i>Plum pox virus</i> (nicht aphidenübertragbar)	p35PPV-NAT	Maiß et al. (1992)	Prof. Dr. E. Maiß
	p35PPV-NAT/SoC p35PPV-NAT/AT	Al Abdallah (2002)	Prof. Dr. E. Maiß Prof. Dr. E. Maiß
<i>Potato virus X</i>	p35PVX201- <i>gfp</i>	Dietrich (2000)	Prof. Dr. E. Maiß
	p35PVX201- <i>optRed</i>	Dietrich (2000)	Prof. Dr. E. Maiß
	p35PVX0014- <i>red</i>		Prof. Dr. E. Maiß
<i>Potato virus Y</i>	p35PVY- <i>gfp</i>		Dr. R. Götz
<i>Tobacco vein mottling virus</i>	pXBS7	Domier et al. (1986)	Dr. T. Pirone
	p35TVMV		Prof. Dr. E. Maiß

2.1.3 Antikörper

Tabelle 2-3 Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Herkunft, Referenz
Anti-Rabbit IgG (aus Ziege; AP-konjugiert)	Kaninchenantikörper	Sigma
AS 570 (aus Kaninchen; Rohserum)	PPV-CP	Prof. Dr. E. Maiß

2.1.4 Plasmide, Klonierungsvektoren und Nukleinsäuren

Tabelle 2-4 Plasmide, Klonierungsvektoren und Nukleinsäuren

Klonierungsvektoren und Nukleinsäuren	Herkunft, Referenz
pBluescript II SK ⁻	Stratagene
pREP-4	Qiagen
pTrueBlue	Slilaty & Lebel (1998)
pBC-Ascl	Prof. Dr. E. Maiß
pNEB193.3	New England Biolabs
pBSPPVSoCcp	Prof. Dr. E. Maiß
pDsRed1-C1	Clontech
pe35AscloptRed	Prof. Dr. E. Maiß

Fortsetzung Tabelle 2-4

Klonierungsvektoren und Nukleinsäuren	Herkunft, Referenz
CD3-328smRS-GFP	Arabidopsis Biological Resource Center, Columbus
λ -Phagen DNA	MBI Fermentas
Primer	MWG Biotech, Invitrogen

Tabelle 2-5 Oligonukleotidprimer

Name	Sequenz [5' – 3']	Verwendung
PPVAgfpSup	AAGAATTCAAACGTTGTTGTACATCAGG CTAGGCGCGCCATGAGTAAAGGAGAA	Klonierung p35PPV- NAT- <i>AgfpS</i>
PPVAgfpSlow	GGATGAACTATACAAACCTGCAGGAAA TGTCGTAGTGCACCAGGATCCT	
PPV-proRed1	AGGAATTCAAACGTTGTTGTACATCAGGC TATGGTGCGCTCCTCCA	Klonierung p35PPV- NAT- <i>red</i>
PPV-proRed2	CCTGCTCGACCGCCGAAATGTCGTTGT GCACCAAGCTGGATCCAG	
T10sAsc	AGGCGCGCCGGTTCATGTCTCACAGAG CACTCA	Klonierung rekombinanter TVMV/PPV-NAT- Fragmente
P10asXba	AGCTCTAGACAAGGGCCTGTGTTTCGAC AA	
T10asXba	AGCTCTAGAACGCTGCCATCCAGACAA A	Klonierung rekombinanter PPV-NAT/TVMV- Fragmente
P10sAsc	AGGCGCGCCCCAACGTTGTTGTGCACC AA	
TVMV-gfpup	AATCTAGAGAATTCCTTAGAGAGACAGT TAGGTTCCAGAGTATGAGTAAAGGAGA AGAA	Klonierung pe35TVMV- <i>gfp</i>
TVMV-gfplow	TTACACATGGCATGGATGAACTATACAA AGAATTCGGATCCTT	
TVMV-redup	AATCTAGAGAATTCCTTAGAGAGACAGT TAGGTTCCAGAGTATGGTGCCTCCTC CA	Klonierung pe35TVMV- <i>red</i>
TVMV-redlow	CGCCACCACCTGTTCTGCTCCGCGAA TTCGGATCCTT	
PPVdet1	TCTCTGCCAAAGGTGAAGGGA	Detektion von PPV
PPVdet2	GTTCCGACGTTTCCATCCA	

2.1.5 Reaktionskits

Tabelle 2-6 Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
pGEM [®] -T Easy	Promega
Plasmid Mini Kit	Qiagen*
Plasmid Midi Kit	Qiagen*
SuperScript [™] One-Step RT-PCR with Platinum [®] Taq	Invitrogen*
QIAex [™] II Gel Extraction Kit	Qiagen*

*keine Herstellerangaben zur Zusammensetzung der mitgelieferten Puffer

2x Ligationspuffer (pGEM[®]-T Easy)

60 mM Tris HCl (pH 7,4)
 20 mM MgCl₂
 20 mM DTT
 2 mM ATP
 10% PEG

2.1.6 Bakterienstamm zur Klonierung

Tabelle 2-7 Bakterienstamm zur Klonierung

Art/Gattung	Stamm	Beschreibung	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	NM 522	<i>supE</i> thi ⁻¹ Δ(<i>lac-proAB</i>) Δ (<i>mcrB-hsdSM</i>)5 (r _K -m _K -) [F' <i>proAB lac^qZΔM15</i>]	Pharmacia

2.1.7 Enzyme und Reaktionspuffer

Tabelle 2-8 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungsmotiv	Konzentration	Reaktionspuffer*	Hersteller
<i>Alw44</i> I	G [↓] TGCAC	10 U/μl	MBI Y ⁺ /Tango [™]	MBI Fermentas
<i>Asc</i> I	GG [↓] CGCGCC	10 U/μl	NEB 4	NEB
<i>Bam</i> HI	G [↓] GATCC	10 U/μl	MBI <i>Bam</i> HI ⁺	MBI Fermentas
<i>Bsh</i> TI	A [↓] CCGGT	10 U/μl	MBI O ⁺	MBI Fermentas
<i>Cl</i> aI	AT [↓] CGAT	5 U/μl	NEB 4	NEB

Fortsetzung Tabelle 2-8

Enzym	Erkennungsmotiv	Konzentration	Reaktionspuffer*	Hersteller
<i>EcoRI</i>	G [↓] AATTC	10 U/μl	MBI O ⁺	MBI Fermentas
<i>EcoRV</i>	GAT [↓] ATC	20 U/μl	NEB 3	NEB
<i>NotI</i>	GC [↓] GGCCGC	10 U/μl	MBI O ⁺	MBI Fermentas
<i>Psp1406I</i>	AA [↓] CGTT	10 U/μl	MBI Y ⁺ /Tango™	MBI Fermentas
<i>PstI</i>	CTGCA [↓] G	10 U/μl	MBI O ⁺	MBI Fermentas
<i>PvuII</i>	CAG [↓] CTG	10 U/μl	MBI G ⁺	MBI Fermentas
<i>SdaI</i>	CCTGCA [↓] GG	5 U/μl	MBI <i>SdaI</i>	MBI Fermentas
<i>SacI</i>	GAGCT [↓] C	10 U/μl	MBI <i>SacI</i>	MBI Fermentas
<i>StuI</i>	AGG [↓] CCT	10 U/μl	NEB 2	NEB
<i>SalI</i>	G [↓] TCGAC	10 U/μl	MBI O ⁺	MBI Fermentas
<i>XbaI</i>	T [↓] CTAGA	10 U/μl	MBI Y ⁺ /Tango™	MBI Fermentas
<i>XhoI</i>	C [↓] TCGAG	10 U/μl	MBI R ⁺	MBI Fermentas

[↓] kennzeichnet die Restriktionsschnittstelle; *vom Hersteller mitgelieferte Puffer; NEB = New England BioLabs

Zusammensetzung der Puffer

MBI G⁺

10 mM Tris HCl (pH 7,5)
10 mM MgCl₂
50 mM NaCl
0,1 mg/ml BSA

MBI O⁺

50 mM Tris HCl (pH 7,5)
10 mM MgCl₂
100 mM NaCl
0,1 mg/ml BSA

MBI R⁺

10 mM Tris HCl (pH 8,5)
10 mM MgCl₂
100 mM KCl
0,1 mg/ml BSA

MBI Y⁺/Tango™

33 mM Tris-Acetat (pH 7,9)
10 mM Mg-Acetat
66 mM K-Acetat
0,1 mg/ml BSA

MBI *BamHI*⁺

10 mM Tris HCl (pH 8,0)
5 mM MgCl₂
100 mM KCl
0,02% Triton X-100
0,1 mg/ml BSA

MBI *SacI*

10 mM Bis-Tris Propan (pH 6,5)
10 mM MgCl₂
0,1 mg/ml BSA

MBI *SdaI*

37 mM Tris-Acetat (pH 7,0)
15 mM Mg-Acetat
150 mM K-Acetat
0,1 mg/ml BSA

NEB 2

10 mM Tris HCl (pH 7,9)
50 mM NaCl
10 mM MgCl₂
1 mM DTT

NEB 3

20 mM Tris-Acetat (pH 7,9)
50 mM K-Acetat
100 mM Mg-Acetat
1 mM DTT

NEB 4

20 mM Tris-Acetat (pH 7,9)
50 mM K-Acetat
10 mM Mg-Acetat
1 mM DTT

Tabelle 2-9 DNA/RNA-modifizierende Enzyme

Enzym	Konzentration	Reaktionspuffer	Hersteller
RNaseA I*	75 U/mg		Fluka
RQ1 DNase	1 U/ μ l	10x RQ1 DNase-Puffer	Promega
Alkalische Phosphatase	20 mg/ml	10x CIP-Puffer	Roche
T4 DNA-Ligase	1 U/ μ l	10x Ligationspuffer	MBI Fermentas
Klenow-Fragment	1 U/ μ	10x Klenow DNA-Polymerase-Puffer	Promega

*es wurde kein spezieller Puffer verwendet

Zusammensetzung der Puffer

10x RQ1 DNase-Puffer

0,4 M Tris HCl (pH 8)
0,1 M MgSO₄
10 mM CaCl₂

10x Klenow DNA-Polymerase-Puffer

500 mM Tris HCl (pH 7,2)
100 mM MgSO₄
1 mM DTT

10x Ligationspuffer

0,4 M Tris HCl (pH 7,8)
0,1 M MgCl₂
0,1 M DTT
5 mM ATP

10x CIP-Puffer

0,5 M Tris HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA

Tabelle 2-10 Polymerasen

Enzym	Konzentration	Reaktionspuffer	Hersteller
SAWADY <i>Taq</i> -Polymerase	5 U/ μ l	10x Reaktionspuffer S	PeqLab
AMV-Reverse Transkriptase	10 U/ μ l	5x RT-Puffer	Promega
<i>Pfu</i> -Polymerase	2-3 U/ μ l	10x Reaktionspuffer (<i>Pfu</i>)	Promega
T7 RNA-Polymerase	20 U/ μ l	5x Transkriptionspuffer	MBI Fermentas
SuperScript™ II Reverse Transkriptase*			Invitrogen
Platinum® <i>Taq</i> -Polymerase*			Invitrogen

* beide Enzyme werden in einem Reaktionskit angeboten, siehe daher Tabelle 2-6

Zusammensetzung der Puffer

5x RT-Puffer

0,25 M Tris HCl (pH 8,3)
50 mM DTT
0,25 M KCl
50 mM Spermidin
50 mM MgCl₂

5x Transkriptionspuffer

200 mM Tris HCl (pH 7,9)
30 mM MgCl₂
10 mM Spermidin
50 mM NaCl
50 mM DTT

10x Reaktionspuffer (Pfu)

200 mM Tris HCl (pH 8,8)
 100 mM KCl
 100 mM (NH₄)₂SO₄
 20 mM MgSO₄
 1% Triton X-100
 1 mg/ml BSA

10x Reaktionspuffer S

100 mM Tris HCl (pH 8,8)
 500 mM KCl
 15 mM MgCl₂

Tabelle 2-11 Protein-abbauendes Enzym

Enzym	Konzentration	Hersteller
Proteinase K	20 mg/ml	Boehringer

Tabelle 2-12 Nukleotide

Nukleotide	Konzentration	Hersteller
Deoxynucleoside Triphosphat Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	je 100 mM	Roth/Sigma

2.1.8 Chemikalien**Tabelle 2-13 Feste Chemikalien**

Chemische Substanz	Abkürzung	Hersteller
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid	X-Gal	BioTech
Agarose		Biozym
Ampicillin	Ap	Serva
Bovine Serum Albumin	BSA	Sigma
Bromphenolblau		Serva
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂	Merck
Celite		Serva
Cetyltrimethylammoniumbromid	CTAB	Fluka
Chloramphenicol	Ch	Serva
D-Glucose		Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Na ₂ HPO ₄	Merck
Dithiotreitol	DTT	ICN

Fortsetzung Tabelle 2-13

Chemische Substanz	Abkürzung	Hersteller
Ethidiumbromid	EtBr	Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz	EDTA	Merck
Fast Red TR Salz	Fast Red	Sigma
Guanidin Hydrochlorid	G-HCl	Sigma
Hexamincobalttrichlorid	HaCoCl ₃	Sigma
Isopropyl-β-D-Thiogalactosidase	IPTG	BioTech
Kaliumacetat	KAc	Merck
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Merck
Kaliumhydroxid	KOH	Merck
Kanamycin	Kn	Roth
LM-Agarose		Biozym
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl ₂	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO ₄	Merck
Morpholinethansulfonsäure	MES	Roth
Naphthol AS-MX Phosphat, Dinatriumsalz	Naphthol	Sigma
Natriumacetat-Trihydrat	NaAc	Merck
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	Roth
Natriumchlorid	NaCl	Roth
Natriumdodecylsulfat Ultra Pure	SDS	Roth
Natriumhydroxyd	NaOH	Merck
Natriumjodid	NaI	Sigma
Natriumsulfit	Na ₂ SO ₃	Sigma
para-Nitrophenylphosphat		Serva
Polyvinyl Polypyrrolidone 40	PVP-40	Sigma
Rubidiumchlorid	RbCl	Sigma
Select Peptone 140		Gibco BRL
Silica Partikel (0,5-10µm; 80% 1-5µm)		Sigma
Sucrose		Merck
Trinatriumphosphat	Na ₃ PO ₄	Merck
Tris-Acetat		Roth
Trishydrochlorid	Tris HCl	Roth
Uranylacetat		Merck
Wolframpartikel M17		Biorad
Yeast Extract		Gibco BRL

Tabelle 2-14 Flüssige Chemikalien

Chemische Substanz	Abkürzung	Hersteller
2-Mercaptoethanol		Merck
Chloroform		Merck
Diethanolamin		Sigma
Dimethylformamid	DMF	Serva
Dimethylsulfoxid	DMSO	Serva
Eisessig (100%)		Roth
Ethanol (70%)	EtOH _{70%}	Roth
Ethanol (99,6%)	EtOH _{99%}	Roth
Glycerin (99,5%)		Roth
Isopropanol (99,7%)		Roth
Isoamylalkohol		Roth
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat	Tween 20	Fluka
Roti-Phenol	Phenol	Roth
Triton X-100		Serva

2.1.9 Geräte

Tabelle 2-15 Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Binokular mit Beleuchtung und Digitalkamera	165945 KL1500 LCD DC 200	Wild Heerbrugg Leica Leica
Elektrophoresekammer	Horizontal Midi	Harnischmacher
Feinwaage	Analytic 200 S	Satorius
Gradientencycler	PTC 200	MJ Research
Kühlzentrifuge mit Kühlung und Festwinkelrotoren	RC 5 B plus SS-34, GSA	Sorval Sorval
Kühlzentrifuge mit Kühlung und Festwinkelrotor bzw. Ausschwingrotor	4K10	Sigma Nr. 12167 Nr. 11140
Laborwaage	1205 MP	Satorius
Magnetrührer	MR 2000	Heidolph
Photometer	DU [®] 640 Spectrophotometer	Beckman
Pipetten	Pipetman 2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson

Fortsetzung Tabelle 2-15

Gerät	Typ	Hersteller
Schüttler	Certomat M	Braun
Schüttler (Temperaturregelung)	Certomat R+H	Braun Biotech
Spannungsquelle	E 714	Consort
Sterile Werkbank	Lamina Air HA 2448 GS	Heraeus
Template Tamer		QBiogene
Thermoblock	Thermostat 5320	Eppendorf
Thermocycler	T3	Biometra
Thermoschrank	H-Inkubator Pt 100	Biometra
Tischzentrifuge	113	Eppendorff
UV-Tische und Geldokumentation	TVL 312 A Intas MW 312	Spectroline Intas
Vakuumkonzentrator	Hetovac VR-1 + CT 60 e	Heto
Videoprinter	Video Copy Processor P 91 D	Mitsubishi Mitsubishi
Vortexer	MS 1 Minishaker	IKA
Wasserbad	F 3	Haake

2.1.9.1 Partikelkanone

Das Partikelbombardement zur Inokulation von Pflanzen mit viralen "full-length"-Klonen wurde mit einer nach den Angaben von Gray et al. (1994) selbst angefertigten "particle inflow gun" (PIG) durchgeführt. Mit der PIG können, im Gegensatz zu kommerziell erwerbbaaren Partikelkanonen, nicht nur einzelne Blätter oder Blattscheiben, sondern auch ganze Pflanzen behandelt werden. Der Aufbau der PIG ist in Abbildung 2-4 erläutert. Die Funktionen der einzelnen Bestandteile werden im Zusammenhang mit der Durchführung des Partikelbombardements unter 2.2.20.2 erläutert.

Tabelle 2-16 Bauteile der Partikelkanone nach Gray et al. (1994)

Bauteil	Hersteller
Magnetventil	Bürkert, Nr. 121297M
Spritzenfilter	Gelman Sciences Produkt Nr. 4317
Timer	Zander (Aachen), Modell Nr. 445020; 0,1"-10"; Ser. Nr. F100837
Vakuumkammer	Nalgene

2.1.9.2 Epifluoreszenzmikroskop

Als Epifluoreszenzmikroskop wurde ein Axiophot von Zeiss verwendet. Aufnahmen mit dem im Axiophot integrierten Fotoapparat erfolgten mit einem Kodak Ektachrome Dia-Film (400 ASA). Die Belichtungszeiten können variiert werden.

Für die Nutzung des Epifluoreszenzmikroskops wurden zwei speziell für die Reporterproteine smRS-GFP und DsRed entwickelte Filtersätze verwendet (siehe Tabelle 2-17), welche die spezifische Emission des jeweiligen Fluorochroms detektieren und die Autofluoreszenz des Gewebes unterdrücken. Die verwendeten Filter sind von ihren Eigenschaften her Bandpassfilter. Die DsRed bzw. smRS-GFP Filter werden mit konventionellen UV- bzw. Rhodaminfiltern verglichen. Charakterisiert werden Bandpassfilter durch die Angabe der Wellenlängen, des Filterschwerpunktes und durch einen Schrägstrich getrennt, die Halbwertsbreite. Die Halbwertsbreite bezeichnet den Bereich des Filters, der über- und unterhalb des Filterschwerpunktes liegt und für die angegebenen Wellenlängen durchlässig ist. Eine grafische Darstellung der Filterangaben findet sich im Anhang (6.1). Die Angabe für den Farbteiler wird in Transmission angegeben, da die Durchlässigkeit für die Wellenlängen im Anregungsbereich sehr niedrig ist (Reflexion).

Tabelle 2-17 Spektralbereiche der Filterkombinationen für das Axiophot

Markergen	Wellenlängen λ [nm]			Hersteller	Name
	Anregungsfilter*	Farbteiler	Sperrfilter*		
smRS-GFP	365/11	395	395	Zeiss	UV-Filter
DsRed1-C1	546/12	580	590	Zeiss	Rhodamin-Filter
smRS-GFP	470/40	495	525/50	AHF Analysentechnik	AHF _{EGFP}
DsRed1-C1	565/30	585	620/60	AHF Analysentechnik	AHF _{DsRed}

*Angaben als Filterschwerpunkt/Halbwertsbreite

Für die Anfertigung von Präparaten wurden Objektträger (76 x 26 x 1 mm, Menzel-Gläser) und 18 x 18 x 0,13 - 0,17 mm Deckgläser (Roth) als "spacer", sowie 24 x 50 x 0,13 - 0,17 mm Deckgläser (Roth) zum Abdecken der Probe verwendet. Als Immersionslösung wurde Wasser auf das Deckglas aufgetragen. Die Anfertigung von Proben zur Mikroskopie erfolgte wie unter 2.2.23 beschrieben.

2.1.9.3 Konfokales Laser Scan Mikroskop (CLSM)

Die Untersuchungen wurden an einem True Confocal Scanner SP2 (TCS SP2) von Leica Microsystems (Heidelberg) durchgeführt. Die Anlage besteht aus einem Forschungsmikroskop (Typ DM RE 13 TL/RF 4/1) mit 4-fach Fluoreszenzwechsler und Aufsicht-Fluoreszenzeinrichtung. Es verfügt über eine Durchlicht Halogen-Beleuchtung (LH106, 12V, 100W) und eine Hg-Beleuchtungseinrichtung (106Z, 50W HBO) zur Fluoreszenzanregung. Drei Filtersysteme stehen für die Epifluoreszenzmikroskopie am CLSM zur Verfügung: Filtersystem A, UV-Anregung (BP 450-380, LP 425); Filtersystem I 3, Blau-Anregung (BP 450-490, LP 590); Filtersystem N 2.1, Grün-Anregung (BP 515-560, LP 590). Für die Aufnahme wurden drei der vier installierten Objektive verwendet: HC PL FLUOTAR 10x/0.30, PL APO 20x/0.70 Ph2, HCX PL APO 63x/1,20 W Corr/0,17 CS.

Das konfokale Laser Scanningsystem besteht aus einem Multispektraldetektor. Eine Auflösung ist bis zu 2048 x 2048 Pixel mit 12 Bit pro Kanal möglich. Ein stufenloser Hardwarezoom erlaubt Vergrößerungen von 1x bis 32x. Wichtig für die Darstellung mehrerer unterschiedlich fluoreszierender Objekte ist das spektrale Dreikanal-Detektorsystem und eine Multi-Laser-Kombination, bestehend aus einem Ar-Laser (65mW; Laserlinien: 458 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm), einem grünen HeNe-Laser (1,2 mW; 543 nm) und einem roten HeNe-Laser (10 mW; 633 nm). Über den AOTF ("acousto-optical-tunable filter") sind alle sechs Laserlinien simultan und individuell steuerbar. Die Computereinheit besteht aus einem handelsüblichen Computer (Pentium III, 600 MHz) mit Windows NT Betriebssystem und der Leica LCS Software (2.1.11). Die zur Anfertigung von mikroskopischen Präparaten notwendigen Materialien sind in 2.1.9.2 aufgeführt.

2.1.10 Sonstige Materialien

Tabelle 2-18 Sonstige Materialien

Material	Hersteller, Herkunft
Nitrozellulosemembran (0,45 µm)	Schleicher & Schuell
Filterpapier (595 ½ Round Filter Paper Circles, Ø 90 mm)	Schleicher & Schuell
Petrischalen (94/16)	Greiner Bio-One GmbH
Parafilm "M" [®]	American National Can [™]
Blattdünger 22+4+6	Berghoff
Fruhstorfer Erde (Typ P)	Industrie-Erdenwerke Archut

2.1.11 Software

Tabelle 2-19 Software

Programm	Version	Herkunft, Vertreiber
ClustalX	1.64b, 1988	Higgins, D.G. & Sharp, P.M.
Gel-Dokumentation	Intas GDS, 2002	Intas
Vector NTI, Demoversion	4.0, 1997	InforMax Inc.
BioEdit	5.0.9, 1999	Hall (1999)
Leica Confocal Software TCS SP2 (inkl. LCS 3D und der LCS Physiologie Software)	2.5.1104, 2003	Leica Microsystems

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht des Pflanzenmaterials

Das Pflanzenmaterial für alle Versuche wurde unter den gleichen Gewächshausbedingungen kultiviert. Die Heizungs- und Lüftungstemperatur betragen über die gesamte Kulturdauer 20/22°C. In den Wintermonaten erfolgte eine Zusatzbeleuchtung mit Assimilationslicht (PAR). In Sommermonaten mit besonders hohen Temperaturen wurden die Kulturen, insbesondere solche, die mit PVX infiziert waren, bei Bedarf in einer Klimakammer bei 22/25°C vorübergehend kultiviert.

Die Aussaat des Saatgutes erfolgte in Pikiererde (TKS-P) in 10er Töpfe. Während der etwa einwöchigen Auflaufzeit der Saat wurden die Töpfe gegen Austrocknung mit Petrischalendeckeln abgedeckt. Daraufhin wurden die Sämlinge zu 50 Stück in Aussaatkisten pikiert und nach weiteren drei Wochen in 10er Töpfe getopft. Je nach Jahreszeit waren ca. sechs bis 10 Wochen Kulturzeit notwendig bis die Pflanzen inokuliert werden konnten.

2.2.2 DNA-Extraktion aus *N. benthamiana*

Die Extraktion von DNA aus *N. benthamiana* Pflanzen erfolgte nach der von Edwards (1991) beschriebenen Methode zur Gesamtnukleinsäure-Extraktion.

- ca. 25 mg Blattgewebe in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß geben
- Zugabe von 400 µl Extraktionspuffer (s.u.) und mit einem sterilen Pistill das Gewebe homogenisieren
- Zentrifugation für 1' bei 13000 rpm (RT)
- Überstand abnehmen (~300 µl) und in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen
- Zugabe von 300 µl Isopropanol (-20°C) und mischen
- Sedimentation für 2'
- Zentrifugation für 5' bei 13000 rpm (RT)
- Überstand möglichst vollständig verwerfen und Pellet trocknen (Speedvac)
- Zugabe von 100 µl TE 10/0.1
(bei -20°C mind. 6 Monate haltbar)

Wurde die extrahierte Nukleinsäure für einen PCR-Nachweis verwendet, konnten pro Reaktionsansatz 1-3 µl verwendet werden.

Zusammensetzung der Puffer

DNA-Extraktionspuffer (Edwards, 1991)

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

TE 10/0,1

10 mM Tris HCl (pH 8,0)
0,1 mM EDTA

2.2.3 RNA-Extraktion aus *N. benthamiana*

Es wurden zwei Methoden zur Extraktion von RNA in der vorliegenden Arbeit angewendet, wobei die Methode nach Verwoerd et al. (1989; 2.2.3.1) auf einer Phenol/Chloroform-Extraktion und die nach Menzel et al. (2002; 2.2.3.2) auf der Bindung der Nukleinsäuren an Silica Partikeln beruht.

2.2.3.1 RNA-Extraktion nach Verwoerd et al. (1989)

Für die RNA-Extraktion wurde die von Verwoerd et al. (1989) beschriebene Methode etwas modifiziert wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.

- Homogenisieren von 250-300 mg Blattmaterial mit Mörser und Pistill in 300-400 µl 0,03 M HEPES-Puffer (pH 7)

- Überführen des Presssaftes in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß und Zugabe von 300 µl Phenol und 300 µl RNA-Extraktionspuffer (80°C), für 30" mischen
- Zentrifugation für 5' bei 13000 rpm, Abnahme der oberen wässrigen Phase
- Zugabe von 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
- Zentrifugation für 5' bei 13000 rpm, Abnahme der oberen wässrigen Phase
- Zugabe von 1 Vol. 4 M LiCl und mischen
- Inkubation ü.N. bei 4°C (Fällung)
- Zentrifugation für 20' bei 13000 rpm und 4°C
- Überstand möglichst vollständig entfernen, Trocknen des Pellets für 5-10' (Speedvac)
- Resuspendieren des Pellets in 170 µl *A. bidest.*
- Zugabe von 5 µl RQ1DNase (1 U/µl) und 20 µl RQ1DNase-Puffer
- Inkubation für 30' bei 37°C
- Durchführung eines Proteinase K-Verdau (2.2.7)
- Durchführung einer Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.8)
- Fällung der RNA mit einer Na-Acetat/Ethanol-Fällung (2.2.9)
- Resuspendieren des Pellets in 50 µl TE 10/0,1 (2.2.2)

Für eine RT-PCR wurden 1 bis 2 µl des Nukleinsäureextrakts eingesetzt.

RNA-Extraktionspuffer (Verwoerd et al., 1989)

0,1 M LiCl
100 mM Tris
10 mM EDTA
1% SDS
pH 8,0 einstellen und autoklavieren

2.2.3.2 RNA-Extraktion nach Menzel et al. (2002)

Die Methode zur Gesamtnukleinsäureextraktion geht auf Boom et al. (1990) zurück und wurde entsprechend der Angaben von Menzel et al. (2002) modifiziert durchgeführt.

- 100 mg Blattgewebe werden mit Mörser und Pistill in 1 ml Extraktionspuffer homogenisiert
- Überführen des Homogenats in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß und Zentrifugation für 1' bei 13000 rpm
- Überführen von 500 µl Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß, Zugabe von 100 µl SDS_{10%} und mischen

- Inkubation für 10' bei 70°C (alle 2' kurz vortexen), dann für 5' auf Eis abkühlen
- Zentrifugation für 10' bei 13000 rpm
- Überführen von 300 µl Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß
- Zugabe von 150 µl EtOH_{99%} (-20°C), 300 µl 6 M NaI-Lösung, 25 µl Silica-Suspension und mischen
- Inkubation für 10' bei RT (alle 2' kurz mischen)
- Zentrifugation für 1' bei 6000 rpm und Überstand verwerfen
- Resuspendieren des Pellets nach Zugabe von 500 µl Waschpuffer
- Zentrifugation für 1' bei 6000 rpm und Überstand verwerfen
- Waschen wiederholen
- Resuspendieren des Pellets in 150-200 µl TE 10/0.1 (2.2.2)
- Inkubation für 4' bei 70°C
- Zentrifugation für 3' bei 13000 rpm, Überführen des Überstandes in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß und Lagerung bei -20°C
(Wird die Probe häufig benutzt, empfiehlt sich ein Aliquotieren des Extraktes.)

Für einen RT-PCR-Nachweis wurden 2 µl des Nukleinsäureextraktes pro Reaktionsansatz verwendet.

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Extraktionspuffer Silica-Methode

6 M Guanidine-HCl
0.2 M Na-Ac (pH 5.2)
25 mM EDTA
1 M K-Ac
2,5 % PVP-40

Waschpuffer

10 mM Tris (pH 7.5)
0.5 mM EDTA
50 mM NaCl
50 % EtOH_{99%}
Lagerung bei 4°C

NaI-Lösung

0,15 M Na₂SO₃
5 M NaI
Lagerung bei 4°C im Dunkeln

Silica-Suspension

- Suspendieren von 60 g Silica Partikeln in 500 ml sterilem *A. bidest.*
- Inkubieren für 24 h bei RT
- 470 ml Überstand verwerfen und mit 500 ml *A. bidest.* auffüllen
- Inkubieren für 5h bei RT
- 440 ml Überstand verwerfen und mit HCl auf pH 2 einstellen
- Autoklavieren 1,5 ml Aliquots dunkel bei 4°C lagern

2.2.4 "Tissue print immuno assay" (TPIA)

Dieses Verfahren ermöglicht die schnelle serologische Identifizierung von Viren durch die Visualisierung von virusinfiziertem Pflanzengewebe. Prinzipiell wird von einer virusinfizierten Pflanze ein Epidermisabzug genommen und auf eine Nitrozellulosemembran aufgedrückt. Alternativ können auch Blatt- oder Stängelquerschnitte verwendet werden. Durch die Fähigkeit zur Bindung von Proteinen, werden die Virionen an die Membran gebunden. Die Membran wird dann, ähnlich wie bei ELISA-Techniken, mit virusspezifischen Antikörpern (AK) behandelt, welche an das Antigen (Virus) binden. Nach dem Waschen der Membran zur Entfernung nicht gebundener Antikörper, erfolgt die Inkubation mit Goat-anti-Rabbit Antikörpern (GaR-AK), die mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind und an den AK/Antigen Komplex binden. Nach einem erneuten Waschschrift wird als Substrat eine Färbelösung aus Fast Red TR und Naphtol AS-MX zugegeben. Durch die Anwesenheit der alkalischen Phosphatase erfolgt eine Hydrolyse von Phosphorsäureestern im Substratgemisch, wodurch eine rötliche Verfärbung eintritt, welche die Gewebebereiche markiert, die Virus enthalten.

Bei der Herstellung eines TPIA wird entsprechend dem folgenden Protokoll in Anlehnung an Lin et al. (1990) vorgegangen:

- Aufdrücken der Gewebeprobe auf die Nitrozellulosemembran
- Blockieren der Membran in PBS-TO unter leichtem Schütteln für 1 h
- 2 x 5' in PBS-T waschen
- Inkubation der Membran unter leichtem Schütteln in PBS-TPO/PPV-AK (PPV AK 1:10000 in PBS-TPO; siehe Tabelle 2-3) für 1 h
- 2 x 5' in PBS-T waschen
- Inkubation der Membran unter leichtem Schütteln in PBS-TPO/ GaR-AK (GaR-AK 1:15000 in PBS-TPO; siehe Tabelle 2-3) für 1 h
- 2 x 5' in PBS-T waschen
- Membran in Substratlösung bestehend aus gleichen Teilen Fast Red TR und Naphthol AS-MX unter leichtem Schütteln bis zur erkennbaren Färbung inkubieren (ca. 10 bis 15')
- Waschen der Membran in *A. dest.* und trocknen

Der Farbumschlag des Abdrucks war mit bloßem Auge zu erkennen. Für Dokumentationszwecke wurde ein Binokular mit angeschlossener Digitalkamera verwendet (Tabelle 2-15).

Zusammensetzung der Lösungen

Fast Red-Lösung

0,6 % Fast Red TR Salz
0,2 M Tris-base (pH 8,0)
2 mM MgCl₂
in *A. bidest.*

PBS-T

137 mM NaCl
1,53 mM KH₂PO₄
2,7 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
3,07 mM NaN₃
0,05 % Tween-80

Naphthol-Lösung

0,04 % Naphtol in *A. bidest.*

PBS-TO

PBS-T
0,2 % Ovalbumin, Bovine Serum
Albumin

PBS-TPO

PBS-TO
2 % Polyvinylpyrolidone

2.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein sensitives und spezifisches Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien bzw. Nukleinsäurepräparationen. Mit dieser Methode können *in vitro* große Mengen einer spezifischen DNA-Sequenz synthetisiert werden. In dieser Arbeit wurde die PCR zum Nachweis von Viren, rekombinanten Virussequenzen, transgenen Sequenzen und zur Amplifikation von Reportergenen zur Klonierung eingesetzt.

Die Voraussetzung für eine spezifische Amplifizierung einer Nukleinsäure mittels PCR ist die Kenntnis der Zielsequenz. Hierfür müssen zwei synthetische Oligonukleotidprimer ("sense" und "antisense" Primer) von der Zielsequenz abgeleitet werden, welche die Randbereiche des gewünschten Fragments flankieren. Der "sense"-Primer muss zum 3'-Ende des sinnnegativen Strangs der Zielsequenz komplementär sein, und der "antisense"-Primer muss zum 3'-Ende des sinnpositiven Strangs komplementär ("antisense") sein. Die DNA-Synthese wird bei einer Standard-PCR in 5'-3' Richtung von einer DNA-abhängige DNA-Polymerase katalysiert. Als Polymerase wird eine thermostabile Polymerase verwendet, die i.d.R. aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) stammt. Die Thermostabilität reicht bis ca. 100°C, wobei das Temperaturoptimum der Enzymaktivität bei 72°C liegt.

Ein Syntheszyklus beginnt mit der Denaturierung der Nukleinsäure bei 94°C, worauf nach einer Abkühlung auf die spezifische Hybridisierungstemperatur ("annealing", z.B. 56°C) die Primer sich an die einzelsträngige Nukleinsäure anlagern. Die DNA-Synthese durch Verlängerung der Primer mit Hilfe der *Taq*-Polymerase erfolgt dann bei 72°C. In der Reaktion wird in der exponentiellen Phase bei jedem Zyklus die Anzahl der DNA-Moleküle verdoppelt, so dass nach n Zyklen 2ⁿ Moleküle entstehen. In den Reaktionsbedingungen spielen die Mg-Konzentration, die Salzkonzentration (Reaktionspuffer), der pH-Wert und ein Überschuss an

Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) eine wichtige Rolle und müssen im Zuge der PCR-Optimierung den jeweiligen Bedingungen entsprechend eingestellt werden. Entscheidend für eine einwandfreie Reaktion ist das Primerdesign, das in 2.2.5.1 eingehend besprochen wird.

In dieser Arbeit wurde, soweit dies nicht anders beschrieben wird, eine Standard-PCR in Thermocyclern (2.1.9) unter den in Tabelle 2-20 dargestellten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 2-20 Reaktionsbedingungen und Programm einer Standard-PCR

Reaktionsmix	Menge [µl]	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklus	
					fortsetzen	Wiederholung
<i>A. bidest.</i>	7,4	1	94	4'30"		
10x Puffer	5	2	94	30"		
MgCl ₂	5	3	37	30"		
dNTPs	0,5	4	72	1'30"	bei 2	4x*
Primer 1	1	5	94	30"		
Primer 2	1	6	53	30"		
<i>Taq</i> -Polymerase	0,1	7	72	1' 30"	bei 5	36x
DNA	2	8	72	10'		
Σ	50	9	4	∞		

* optionale Zyklen

2.2.5.1 Primerdesign

Bei der Etablierung eines RT-PCR gestützten Nachweisverfahrens zur Identifizierung rekombinanter Viren aus Mischinfektionen nicht transgener bzw. einzeln infizierter transgener Pflanzen kommt der Entwicklung der zu verwendenden Primer eine wichtige Bedeutung zu. Um eine möglichst einfache Durchführbarkeit des Verfahrens zu erreichen, wurden Primer entwickelt, die unter den gleichen Reaktionsbedingungen verwendet werden können. Damit war gewährleistet, dass verschiedene Primerkombinationen mit demselben RT-PCR-Programm zur Detektion verwendet werden konnten. Für die Ableitung der Primersequenzen für das System zur Detektion rekombinanter Viren dienten die Genome von PPV-NAT (Genbank Nr. D13751) und TVMV (Genbank Nr. X04083). Für jedes Genom wurden drei spezifische Primerpaare für den jeweiligen 3'-Terminus entwickelt (Tabelle 3-2). Diese und weitere in der Arbeit verwendeten Primer wurden entsprechend der folgenden Angaben entwickelt.

Bei der Primerentwicklung wurde entsprechend der Empfehlungen von Innis & Gelfand (1999) vorgegangen. Danach ist eine Länge der Primer von 20 bis 30 bp anzustreben. Es sollten sich innerhalb der Primersequenz keine stabilen Sekundärstrukturen ausbilden und längere GC-Abfolgen, die unspezifische Anlagerungen begünstigen, in der Sequenz vermieden werden. Um die Kompatibilität aller Primerkombinationen zu gewährleisten muss darauf geachtet werden, dass sich keine stabilen Dimere bilden oder komplementäre 3'-Enden existieren, die als Start für die Synthese aberranter Nukleotidstränge dienen können. Am 3'-Ende des Primers sollte ein Thymin (T) vermieden werden, da dies stabile Fehlpaarungen begünstigen kann. Die GC-Gehalte der Primer sollten 50% nicht überschreiten, wobei in der 3'-terminalen Hälfte der Gehalt über 50% liegen sollte. Das 3'-Ende von Primern sollte im Allgemeinen keine Fehlpaarungen aufweisen, da von hier die spezifische Neustrangsynthese beginnt. Dagegen können Fehlpaarungen oder sogar atypische Sequenzen am 5'-Ende toleriert werden, ein Sachverhalt, der z.B. bei der Flankierung eines Fragmentes mit Erkennungsmotiven für bestimmte Restriktionsendonukleasen ausgenutzt wird.

Das Primerdesign erfolgte mit dem Softwareprogramm Vector NTI. Alle oben aufgeführten Parameter werden von Vector NTI mit einem programminternen Index ("rating") bewertet. Für diesen Bewertungsindex werden für die Primerparameter (z.B. Schmelztemperatur, GC-Gehalt *etc.*) Gewichtungsfaktoren von 1 (geringste Priorität) bis 10 (höchste Priorität) vergeben, welche die Faktoren entsprechend ihrer Priorität in den Index einfließen lassen. Für die zur Detektion von rekombinanten potyviralen Sequenzen verwendeten Primerpaare wurden die Standardeinstellungen von Vector NTI verwendet und nur Primer mit dem besten, maximal möglichen Bewertungsindex von 173 verwendet. Vorgegeben wurde jedoch, dass die Primer am 3'-Ende ein Adenin (A) aufweisen, da dies die Möglichkeit von Fehlpaarungen reduzieren kann.

Die Sequenzen der abgeleiteten Primer finden sich im Ergebnisteil in Tabelle 3-2. Die Primer wurden im Auftrag bei Invitrogen, bzw. MWG Biotech synthetisiert. Die als lyophilisierte Proben gelieferten Primer wurden als Stammlösung mit einer Konzentration von 100 μM (TE 10/0,1 pH 8,0) angesetzt. Zur Herstellung einer Arbeitslösung wurde eine Verdünnung von 1:10 vorgenommen (10 μM). Für die Herstellung eines Reaktionsansatzes wird in dieser Arbeit in RT-PCR- bzw. PCR-Reaktionen eine Primerkonzentration von 0,1 μM bis 0,5 μM angestrebt.

2.2.5.2 RT-PCR

Eine Variante der PCR ist die RT-PCR. Mit dieser Methode kann durch die Verwendung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) mit einer einzelsträngigen

RNA als Vorlage eine cDNA synthetisiert werden. Die cDNA dient dann als Matrize für die darauf folgende PCR. Das Temperaturoptimum von Reversen Transkriptasen liegt mit 42°C bis 50°C deutlich unter dem der *Taq*-Polymerasen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Reverse Transkription und die folgende PCR in einem Reaktionsgefäß durchgeführt ("One Step RT-PCR"). Wie die *Taq*-Polymerase benötigt die Reverse Transkriptase freie 3'-Hydroxyl-Gruppen zur Syntheseinitiation. Nach Anlagerung des "antisense"-Primers an den sinnpositiven Strang dient dieser zunächst für die Reverse Transkriptase und in der nachfolgenden PCR für die *Taq*-Polymerase als Start. In beiden Fällen wird der sinnnegative Strang synthetisiert. Die Bedingungen für eine Standard-RT-PCR sind in Tabelle 2-21 dargestellt.

Tabelle 2-21 Reaktionsbedingungen und Programm einer Standard-RT-PCR

Reaktionsmix	Menge [μ l]	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklus	
					fortsetzen	Wiederholung
<i>A. bidest.</i>	35,35	1	42	45'		
10x Puffer	5	2	94	4'30"		
MgCl ₂	5	3	94	30"		
dNTPs	0,5	4	37	30"		
Primer 1	1	5	72	1' 30"	bei 3	5x*
Primer 2	1	6	94	30"		
<i>Taq</i> -Polymerase	0,1	7	53	30"		
AMV-RT	0,05	8	72	1' 30"	bei 6	32x
RNA	2	9	72	10'		
Σ	50	10	4	∞		

* optionale Zyklen

2.2.5.3 Reamplifikation von PCR- und RT-PCR-Produkten

Die Reamplifikation von RT-PCR-Produkten wurde durchgeführt, wenn in einer RT-PCR-Reaktion neben dem angestrebten Fragment noch ein oder mehrere unerwünschte Fragmente amplifiziert wurden. Um das entsprechende Fragment selektiv amplifizieren zu können, wurde die RT-PCR-Probe auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde parallel ein PCR-Reaktionsmix zur Reamplifikation des Fragments vorbereitet und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert. Um die Fehlerrate bei der Reamplifikation gering zu halten, wurde in dieser Reaktion eine "proof reading"-*Taq* Polymerase verwendet (Tabelle 2-10). Nach dem Auftrennen der Fragmente wurde mit einer

Pipettenspitze ein kleines Stück Agarose mit der darin enthaltenen DNA des richtigen Fragments aus dem Agarosegel ausgestochen und in den bereitgestellten Reaktionsmix überführt. Daraufhin erfolgte die Reamplifikation des Fragments in einer Standard-PCR Reaktion (2.2.5).

2.2.5.4 Identifikation von rekombinanten RNA-Sequenzen mittels RT-PCR

Kommt es zwischen zwei unterschiedlichen Nucleinsäuren zu einer Rekombination, so entsteht eine chimäre Nucleinsäure, die Teile beider parentalen Nucleinsäuren enthält.

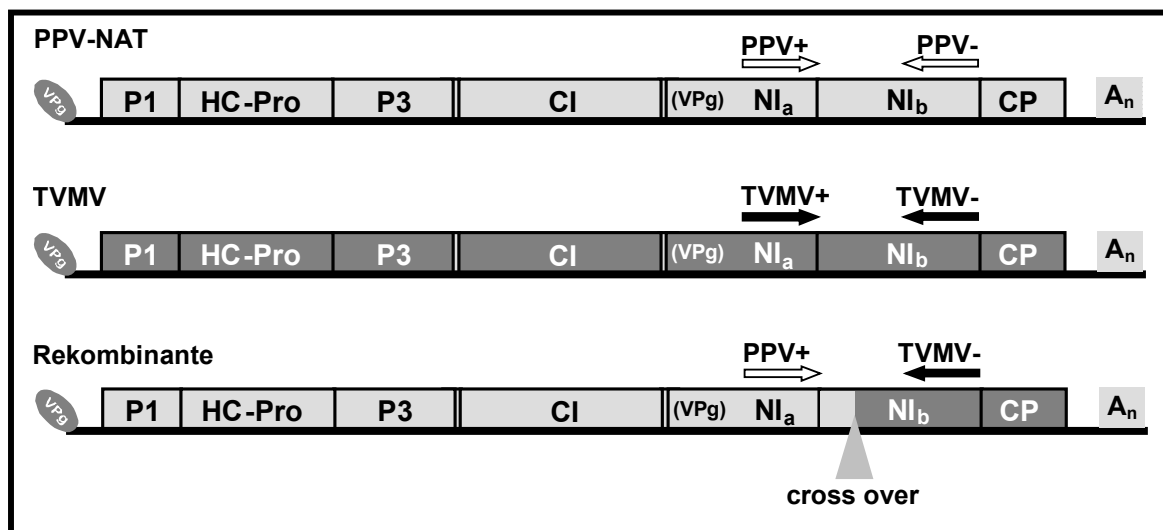


Abbildung 2-3 Heterologe Primerkombinationen zur Identifikation rekombinanter Nucleinsäuren

Primerkombinationen PPV+/PPV- und TVMV+/TVMV- zur Amplifikation parentaler RNA (PPV-NAT bzw. TVMV); PPV+/TVMV- ist die heterologe Primerkombination zur Identifizierung einer PPV-NAT/TVMV-Rekombinanten; P1 und P3 = Protein 1 bzw. 3; HC-Pro = Helferkomponente-Protease; CI = zylindrischer Einschlusskörper; NI_a, NI_b = Kerneinschlusskörper a bzw. b; VPg = virales, genomgebundenes Protein; CP = Hüllprotein; A_n = polyA-Tail

Dies ist z.B. auch bei zwei viralen Sequenzen auf RNA-Ebene möglich. Mit Hilfe einer RT-PCR können solche rekombinanten Sequenzen aus einem Gemisch der parentalen Nucleinsäuren detektiert werden. Hierfür müssen für jede parentale Sequenz Primer abgeleitet werden, die ein Fragment amplifizieren können, das einen möglichen Rekombinationsort umfasst. In einem Gemisch aus beiden parentalen Sequenzen, in welchem Rekombinante vermutet werden, können dann die "sense"- und "antisense"-Primer

der verschiedenen Ausgangssequenzen kombiniert werden (heterologe Primerpaare), um die chimäre Sequenz zu amplifizieren. In Abbildung 2-3 ist diese Vorgehensweise anhand eines möglichen Rekombinationsereignisses zwischen zwei Potyviren (PPV-NAT und TVMV) demonstriert.

2.2.6 Reinigung von PCR- und RT-PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR- und RT-PCR-Produkten wurde nach einer auf CTAB basierenden Methode von Zhang & Weiner (2000) durchgeführt.

- Überführen des PCR-Reaktionsansatzes in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß
- Zugabe von 12,5 µl CTAB-Puffer; mischen und Inkubation für 3' bei RT
- Zentrifugation für 3' bei 13000 rpm
- Überstand verwerfen
- vorsichtig 100 µl TE 10/0,1 zugeben und für 3' bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Lösen des Pellets in 50 µl 1,2 M NaCl and Zugabe von 100 µl EtOH_{95%} (-20°C)
- Zentrifugation für 20' bei 13000 rpm (4°C)
- vorsichtig 300 µl EtOH_{70%} zugeben
- Zentrifugation für 3' bei 13000 rpm
- vorsichtig 300 µl EtOH_{95%} zugeben
- Zentrifugation für 3' bei 13000 rpm
- Trocknen des Pellets und Aufnahme in 20 µl TE 10/0,1

CTAB-Puffer

5% CTAB
0,5 M NaCl
in A. *bidest.*

2.2.7 Proteinase K-Verdau

Für den Proteinase K-Verdau wurden 2 Vol. Proteinase K-Puffer und 1/10 Vol. Proteinase K (20mg/ml) zur Nukleinsäurelösung gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30' bei 37°C. Zur Reinigung des Ansatzes wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.8) und anschließend eine Fällung der Nukleinsäuren mit Na-Acetat/Ethanol (2.2.9) durchgeführt.

Proteinase K-Puffer

- 0,2 M Tris HCl (pH 7,0)
- 0,025 M EDTA
- 0,3 M NaCl
- 2% SDS

2.2.8 Phenol/Chloroform-Extraktion

Das Ausschütteln von Proteinen aus wässrigen Lösungen ist als Standardmethode Bestandteil vieler molekularbiologischer Verfahren (Sambrook et al., 1989). Sollen z.B. Enzyme aus Reaktionsansätzen entfernt werden, da diese eine weitere Arbeit mit dieser Probe stören würden, wird die Phenol/Chloroform-Extraktion angewendet (siehe z.B. 2.2.10). Die Proteine werden mit Phenol ausgeschüttelt und anschließend erfolgt die Entfernung von Phenolresten mit Chloroform. Zur weiteren Reinigung und Konzentration der Probe schließt sich i.d.R. eine Na-Acetat/Ethanol-Fällung (2.2.9) an. Es wird wie folgt vorgegangen:

- Zugabe von 1 Vol. Phenol zur Probe, 30" mischen
- Zenrifugation für 5' bei 13000 rpm und Überstand überführen
- Zugabe von 1 Vol. Chloroform, 30" mischen
- Zenrifugation für 5' bei 13000 rpm und Überstand überführen
- Chloroform-Extraktion wiederholen
- Aufnahme der Nukleinsäuren in *A. bidest.* (ca. 50 - 70% des Ausgangsvolumens)
- optional erfolgt eine Na-Acetat/Ethanol-Fällung (2.2.9)

2.2.9 Na-Acetat/Ethanol-Fällung

Mit dieser Methode können Salze aus einer nukleinsäurehaltigen Lösung entfernt und die Nukleinsäuren konzentriert werden. Dies dient z.B. dazu, Salze aus Reaktionspuffern in einem Doppelverdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen zu entfernen, wenn für beide Enzyme unterschiedliche Puffer verwendet werden mussten. Die Vorgehensweise wird im folgenden beschrieben.

- Zugabe von 0,1 Vol Na-Acetat (3 M) und 2,5 Vol. EtOH_{99%} (-20°C) zur Probe und mischen
- Inkubation bei -20°C für 20' (Fällung auch über Nacht möglich)
- Zenrifugation für 20' bei 13000 rpm (4°C) und Überstand verwerfen

- vorsichtige Zugabe von 300 µl EtOH_{70%} (-20°C) zum Pellet
- Zentrifugation für 10' bei 13000 rpm (4°C) und Überstand verwerfen
- Trocknen des Pellets (Speedvac)
- Aufnahme des Pellets in TE 10/0,1 (pH 8,0; siehe 2.2.2) und Lagerung bei -20°C

2.2.10 T7-Transkription

Mit diesem Verfahren kann mit Hilfe einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase (T7-Polymerase) RNA *in vitro* synthetisiert werden. Als Matrize kann ein rekombinantes Plasmid dienen, dessen Insert ein T7-Promoter vorgelagert ist. Im Falle von zirkulären Plasmiden sollten diese vor der Reaktion am 3'-Ende des Inserts linearisiert werden, da die T7-Polymerase sonst große Teile des Vektors mit amplifizieren würde. Hier wurde dieses Verfahren dazu benutzt eine rekombinante PPV-NAT/TVMV-Sequenz zu synthetisieren, die im RT-PCR-gestützten Nachweisverfahren zur Bestimmung des Detektionslimits herangezogen wurde. Die T7-Transkription wurde wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.

- präparativer Restriktionsverdau zur Linearisierung der Matrize (z.B. Plasmid); siehe 2.2.11
- Phenol/Chloroform-Extraktion und Na-Acetat/Ethanol-Fällung des Restriktionsansatzes; siehe 2.2.8 und 2.2.9
- T7-Transkriptionsansatz: 10 µl T7-Transkriptionspuffer (2.1.7)
 - 2 µl Ribonukleaseinhibitor
 - 10 µl rNTPs
 - 0,5 µg DNA (Matrize)
 - 1,5 µl T7-Polymerase (2.1.7)
 - A. bidest. ad* 50 µl
- T7-Transkriptionsansatz für 1,5 h bei 37°C inkubieren
- Reinigung des Reaktionsansatzes durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Na-Acetat/Ethanol-Fällung (2.2.8 und 2.2.9)
- Aufnahme des Pellets in 30 µl TE 10/0,1 und Lagerung bei -20°C

2.2.11 Präparativer und analytischer Restriktionsverdau

Durch den Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen entstehen linearisierte DNA-Fragmente charakteristischer Länge, die aufgrund der verwendeten Enzyme definierte 3'- und 5'-terminale Enden aufweisen. Um ein DNA-Fragment in ein Plasmid einzufügen, müssen die jeweiligen 3'- und 5'-terminalen Enden kompatibel sein. Durch einen präparativen Verdau mit Restriktionsendonukleasen werden ein linearisierter Vektor und ein Fragment mit kohäsiven oder glatten Enden hergestellt. Im Falle einer gerichteten Klonierung haben Vektor und Fragment übereinstimmende Enden, die später in einer Ligation (2.2.16) zusammengefügt werden können. Liegen bei Vektor und Fragment glatte Enden vor, erfolgt eine ungerichtete Klonierung. Statt des Verdau von Vektor und Fragment mit Restriktionsendonukleasen kann bei der Klonierung von PCR-Fragmenten auch ein T-Vektor verwendet werden.

Im Gegensatz zum präparativen Restriktionsverdau dient der analytische Verdau z.B. der Kontrolle rekombinanter Plasmide hinsichtlich der erfolgreichen Insertion eines Fragmentes in einen Vektor. Als Enzyme werden Restriktionsendonukleasen ausgesucht, mit deren Verdau eine charakteristische Größenverteilung von Fragmenten des Plasmids erreicht wird, die eine erfolgreiche Insertion anzeigt. Ein Beispiel für einen präparativen und einen analytischen Restriktionsverdau ist nachfolgend beschrieben.

Ansatz für einen präparativen Restriktionsverdau

- 3-5 ng Plasmid-DNA
- 0,1 Vol. 10x Restriktionspuffer
- 8-10 U der Restriktionsendonuklease
- *A. bidest. ad* 40µl

Ansatz für einen analytischen Restriktionsverdau

- 1-2 ng Plasmid-DNA
- 0,1 Vol. 10x Restriktionspuffer
- 8-10 U der Restriktionsendonuklease
- *A. bidest. ad* 15 µl

Es folgte die Inkubation der Proben für 1 bis 2 h bei 37°C und die Auftrennung mittels Gelelektrophorese (2.2.12).

2.2.12 Präparative und analytische Gelelektrophorese

DNA-Moleküle haben durch ihre negative Ladung die Eigenschaft im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode zu wandern. Diesen Sachverhalt macht man sich in der Molekularbiologie zunutze, um unterschiedliche DNA-Fragmente ihrer Größe nach in einer Gelmatrix unter Anlegung elektrischer Spannung zu trennen. Die Wanderung der DNA-Moleküle wird von der angelegten elektrischen Feldstärke, der Nettoladung der Moleküle und dem Einfluss der Reibung, die während der Wanderung durch die Matrix entsteht, beeinflusst. Die Reibung ist von der Durchlässigkeit der Matrix und von Gestalt und Größe des Moleküls abhängig. Zur Herstellung einer Gelmatrix können unterschiedliche polymere Verbindungen wie Agarose oder Polyacrylamid verwendet werden. Unter dem Einfluss der genannten Faktoren wandern die DNA-Fragmente durch die Gelmatrix, wobei kleine Moleküle schneller wandern als große ("Molekularsiebeffekt"). Da Laufstrecke und Fragmentgröße nicht in einem linearen Zusammenhang stehen, kann die Größe der Fragmente anhand einer parallel aufgetragenen Standard-DNA mit bekannten Fragmentgrößen ermittelt werden.

Im Folgenden wird die Durchführung einer analytischen Gelelektrophorese mit einem 1%igen horizontalen Agarosegel für 13 bis 26 Proben erläutert. Eine Erläuterung der notwendigen Abweichungen zur Durchführung einer präparativen Gelelektrophorese wird im Anschluss gegeben.

- Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer befüllen
- 0,5 g Agarose abwiegen und in 50 ml 1x TAE-Puffer durch mehrfaches Aufkochen vollständig lösen
- nach Abkühlen auf ca. 50°C Zugabe von 0,15 µg/ml EtBr
- Einsetzen des Probenkamms in den Gelträger (Taschenvolumen ca. 20 µl) und Zugabe der gelösten Agarose
- nach Abkühlen der Agarose Einlegen des Gelträgers in die Elektrophoresekammer; das Gel muss vollständig mit 1x TAE-Puffer bedeckt sein
- Versetzen der DNA-Proben mit 3 µl Gelbeladungspuffer
- Entfernen des Probenkamms und Auftragen der Proben und des Längenstandards λ -*PstI* in die Geltaschen
- Einlaufen der Proben in das Gel bei 80 V/260 mA
- im weiteren Verlauf 120 V/260 mA für ca. 20'

Die der Größe nach aufgetrennten Nukleinsäuren wurden auf einem UV-Transilluminator ($\lambda = 312 \text{ nm}$) sichtbar gemacht und ein Bild mit Hilfe der Videodokumentation (2.1.9) digital erstellt.

Zusammensetzung der Puffer

50x TAE-Puffer

2 M Tris-Acetat
50 mM EDTA
5,7% Essigsäure
pH 8,44 mit Essigsäure eingestellt
(für 1x TAE 1:50 mit *A. dest.* verdünnen)

Gelbeladungspuffer

3,45 ml Glycerin (100%)
6,55 ml *A. bidest.*
Spatelspitze Bromphenolblau

Präparative Gelelektrophorese

Ziel der präparativen Gelelektrophorese ist nicht allein die Darstellung unterschiedlicher Bandenmuster zu Auswertungszwecken, sondern in erster Linie die Trennung von Fragmenten bestimmter Größe aus einem Nukleinsäuregemisch (z.B. ein mit Restriktionsenzymen verdautes Plasmid) mit dem Ziel der nachfolgenden Isolierung der gewünschten DNA. Die Präparation von DNA aus einem Agarosegel wird durch die Verwendung einer speziellen Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt ("low-melting" bzw. LM-Agarose) durchgeführt, da sonst die DNA beim Schmelzen denaturieren kann.

Die Herstellung eines 1%igen LM-Agarosegels erfolgte wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, dass die Spannung zum Einlaufen der Proben in das Gel 60 V und im Weiteren 80 V betrug, um eine zu starke Erwärmung bzw. ein Schmelzen des Gels zu verhindern.

Herstellung des DNA-Größenmarkers λ -*Pst*I

Wird λ -Phagen-DNA mit dem Restriktionsenzym *Pst*I verdaut, so sind die entstehenden DNA-Fragmente bekannt. Der Größenmarker λ -*Pst*I kann in der Gelelektrophorese daher parallel zu z.B. PCR-Produkten im Agarosegel aufgetrennt werden und erlaubt durch den Vergleich der Fragmentgrößen eine ungefähre Abschätzung der Größe der PCR-Fragmente. Nähere Angaben zu den Fragmentgrößen finden sich im Anhang in Abbildung 6-4. Die Herstellung des Größenmarkers wurde folgendermaßen durchgeführt.

- 140 μ l λ -Phagen-DNA (0,4 mg/ml) mit 4 μ l *Pst*I (10 U/ μ l), 30 μ l 10x NEB-Puffer 3 (2.1.7) und *A. bidest.* ad 300 μ l mischen
- Inkubation für 3 h bei 37°C
- Inkubation 10' bei 70°C

- Zugabe von 100 µl Gelbeladungspuffer (2.2.12)
- Aliquotieren (50 µl) und Lagerung bei -20°C

2.2.13 Präparation von DNA aus Agarosegelen

Zur Präparation von DNA aus einem LM-Agarosegel wurde dieses auf dem UV-Transilluminator kurz mit reduzierter Lichtintensität betrachtet, um eine Zerstörung der DNA durch UV-Licht zu vermeiden. Die erwartete Bande wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Elution der DNA aus der LM-Agarose wurde mit dem QIAex™ II Gel Extraction Kit von Qiagen (2.1.5) wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.

- Zugabe von 300 µl Puffer QG zu dem Gelstück
- Lösen des Gelstückes durch Inkubation für 10' bei 50°C, alle 2' vortexen
- ein ggf. veränderter pH-Wert wird durch Farbumschlag des Puffers angezeigt; diesen dann durch Zugabe von 3 M Na-Acetat (pH 5,0) ausgleichen
- Zugabe von 8 µl Glasmilch und vortexen
- Zentrifugation für 30" bei 13000 rpm und Überstand verwerfen
- Zugabe von 500 µl Puffer QX1 und vortexen
- Zentrifugation für 30" bei 13000 rpm und Überstand verwerfen
- Zugabe von 500 µl Puffer PE und vortexen
- Zentrifugation für 30" bei 13000 rpm, Überstand verwerfen und das Pellet antrocknen lassen (ca. 10' bei RT)
- Zugabe von 20 µl des Puffers EB; Lösen des Pellets und Inkubation für 5' bei RT
- Zentrifugation für 30" bei 13000 rpm und Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen; Lagerung bei -20°C

2.2.14 Klenow-Reaktion

Mit Hilfe des Klenow-Fragments, einem Teil der DNA-Polymerase aus *E. coli*, können kohäsive, 5'-überstehende Enden eines DNA-Fragmentes (z.B. nach einem Verdau mit Restriktionsendonukleasen) mit dNTPs "aufgefüllt" und so in glatte Enden umgewandelt werden. Die Auffüllreaktion wurde wie im Weiteren beschrieben durchgeführt.

- 40 µl Nukleinsäurelösung
- Zugabe von 0,1 Vol. dNTPs (2,5 mM)
- Zugabe von 1 U Klenow-Fragment
- *A. bidest.* ad 50 µl
- Inkubation für 15' bei 37°C

Sollte nun z.B. ein Verdau mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt werden, so erfolgte jetzt die unter 2.2.8 beschriebene Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Na-Acetat/Ethanol-Fällung (2.2.9). Auf diese Prozedur wurde verzichtet, wenn das zu verwendende Enzym mit dem Puffer des Klenow-Fragments kompatibel war.

2.2.15 Dephosphorylierung von Vektoren

Für eine ungerichtete Klonierung, z.B. bei der Klonierung von Fragmenten mit stumpfen Enden ("blunt-ends"), wird der Vektor mit nur einem Enzym verdaut und das gewünschte Fragment eingefügt. Um in diesem Falle bei der Ligation eine Religation des Vektors ohne Inkorporation des Fragments zu verhindern, können die 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase ("calf intestine alkaline phosphatase"; CIP) entfernt werden (Dephosphorylierung).

Die CIP-Behandlung erfolgte entsprechend der Angaben von Sambrook et al. (1989). Die Vektor-DNA eines präparativen Restriktionsverdau wurde wie im Folgenden beschrieben einer Dephosphorylierung unterzogen.

- Ansatz aus Restriktionsverdau (40 µl) mit *A. bidest.* ad 45 µl auffüllen
- Zugabe von 5 µl 10x CIP-Puffer
- Zugabe von 1,5 µl CIP, Inkubation für 15' bei 37°C
- Zugabe von 1,0 µl CIP, Inkubation für 30' bei 56°C
- Proteinase K-Verdau bei 56°C (2.2.7)
- Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.8)
- Na-Acetat/Ethanol-Fällung (2.2.9)

Nach der Na-Acetat/Ethanol-Fällung wurde das DNA-Pellet in 20 µl bis 25 µl TE 10/0,1 Puffer (2.2.2) aufgenommen und 2 µl bis 8 µl in der Ligation (2.2.16) eingesetzt.

2.2.16 Ligation

Sollte ein durch den präparativen Restriktionsverdau vorbereitetes DNA-Fragment in einen ebenfalls präparativ verdauten Vektor eingefügt werden, wurde eine Ligation durchgeführt. Durch den Restriktionsverdau mit den geeigneten Enzymen lagen Vektor und Fragment mit kompatiblen Enden vor (2.2.11). In einer Ligationsreaktion katalysiert dann eine T4-Ligase (2.1.7) die Inkorporation des Fragmentes in den Vektor, wobei durch die Verknüpfung der 5'-Phosphatreste mit den 3'-Hydroxylresten von Vektor und Fragment stabile Phosphordiesterbindungen entstehen.

Ein Ligationsansatz enthielt neben Enzym und Puffer den Vektor und das zu inkorporierende Fragment im Überschuss. Die verwendeten Mengen von Fragment und Vektor wurden aus der Stärke der entsprechenden Banden im LM-Agarosegel abgeschätzt. Im Folgenden ist ein Beispiel für einen Ligationsansatz und den verwendeten Reaktionsmix gegeben.

Ligationsansatz (Beispiel)

- 3 µl Reaktionsmix
- 2 µl Vektor
- 8 µl Fragment
- 7 µl *A. bidest ad 20 µl*

Reaktionsmix

- 2 µl 10x Ligasepuffer (2.1.7)
- 0,5 µl T4-Ligase (1 U) (2.1.7)
- *A. bidest. ad 3 µl*

Zur Kontrolle der Ligation wurde parallel zum obigen Ansatz ein zweiter Ligationsansatz vorbereitet, der jedoch kein Fragment enthielt. Damit konnte nach der Transformation (2.2.17.5) ermittelt werden, in welchem Maße der Vektor z.B. religiert oder ob unverdauter Vektor im Reaktionsansatz vorhanden war.

Ligation von PCR-Produkten

Für die Ligation von PCR- bzw. RT-PCR-Produkten wurde das pGEM-T Easy Ligationskit (Promega, siehe 2.1.5) verwendet, sofern die Fragmente nicht durch die Wahl der Primer mit Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme flankiert und konventionell kloniert (2.2.17) werden konnten.

Mit Hilfe dieses Reaktionskits ist es möglich, eine sog. T/A Klonierung durchzuführen. Dabei wird ein durch Restriktionsverdau (*EcoRV*) linearisierter Klonierungsvektor mit glatten Enden verwendet. Die 3'-Enden sind um ein Thymin verlängert, wodurch der sog. T-Vektor entsteht. Der vorbereitete T-Vektor ist in dem Ligationskit enthalten. Da die *Taq*-Polymerase über die Eigenschaft verfügt den PCR-Produkten am 3'-Ende ein Adenosin anzufügen, kann das

Fragment aufgrund der mit dem T-Vektor komplementären Enden in diesen durch die Ligation stabil eingefügt werden. Die T/A-Klonierung wurde wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.

- 0,5 µl T-Vektor
- 5 µl 2x Reaktionspuffer
- 1 µl T4-Ligase
- 1 µl DNA (gereinigtes PCR-Fragment; 2.2.6)
- *A. bidest. ad* 10 µl
- Inkubation bei 4°C über Nacht oder für mind. 1 h bei RT

2.2.17 Klonierung

Als extrachromosomale DNA-Moleküle können Plasmide in Bakterienzellen autonom repliziert werden. "Full-length"-Klone sind in Plasmide integrierte infektiöse cDNA-Klone von RNA-Viren. Plasmide enthalten einen für die Replikation essentiellen Replikationsursprung und ein Markergen, das nach einer Transformation von Bakterien mit diesen Plasmiden eine Selektion transformierter Zellen erlaubt (2.2.17.5). Ein DNA-Fragment (Insert) kann z.B. mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen und einer Ligase in ein Plasmid (Vektor) eingefügt werden. Die rekombinanten Plasmide können dann in Bakterien transformiert und vermehrt werden. Anschließend können die Plasmide wieder isoliert und für weitere Verfahren genutzt werden.

Prinzipiell besteht eine Klonierung aus folgenden Schritten:

1. Präparativer Restriktionsverdau von Vektor und Fragment
2. Auftrennung der verdauten DNA-Isolierung von Vektor und Fragment aus dem Gel
3. Ligation von Vektor und Insert
4. Transformation des Ligationsansatzes und Selektion transformierter Bakterien
5. Plasmidpräparation aus den Bakterien und analytischer Restriktionsverdau zur Kontrolle des Inserts.

Die einzelnen Schritte zur Klonierung von PCR-Fragmenten und "full-length"-Klonen ist in den folgenden Kapiteln beschrieben.

2.2.17.1 Herstellung kompetenter Zellen

Der für die Transformation verwendete Bakterienstamm *E. coli* NM522 wurde als Dauerkultur (2.2.18.3) gelagert und am Vorabend der Transformation mit einer sterilen Impföse an der Sterilwerkbank auf LB-Medium ausgestrichen. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Einige der gewachsenen Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen Impföse in 1 ml SOB überführt und suspendiert. Nach dem Vorlegen von 30 ml SOB und 300 µl 2 M Mg²⁺-Lösung in einen 2000 ml Erlenmeyerkolben folgte die Überführung der Bakterien/SOB-Suspension und eine Inkubation bei 37°C und 180 rpm für ca. 2' (bis zum Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,45 bis 0,55). Daraufhin erfolgte die Zellernte und die Kompetenzinduktion nach dem folgenden Schema:

- Überführen der Bakteriensuspension in ein steriles 25 ml Zentrifugenröhrchen; Abdecken des Röhrchen mit Parafilm
- Inkubation für 10' auf Eis
- Zentrifugation für 12' bei 1130 rpm (4°C) (Sigma 4K10, Ausschwing-Rotor)
- Überstand verwerfen, vorsichtiges Resuspendieren des Pellets in 10 ml TFB
- Inkubation für 10' auf Eis
- Zentrifugation für 12' bei 1130 rpm (4°C) (Sigma 4K10, Ausschwing-Rotor)
- Überstand verwerfen, vorsichtiges Resuspendieren und Konzentrieren des Pellets in 4 ml TFB
- Zugabe von 140 µl DND, vorsichtig mischen
- Inkubation auf Eis für 15'
- nochmalige Zugabe von 140 µl DND, vorsichtig mischen
- Inkubation auf Eis für 15'

Die einmalige Durchführung des Protokolls war ausreichend für eine Transformation von etwa 20 Ligationsansätzen.

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Transformationspuffer (TFB)

10 mM K-MES pH 6,2 (1 M MES mit 10 M KOH auf pH 6,3 einstellen)
 100 mM RbCl
 45 mM MnCl₂ x H₂O
 10 mM CaCl x 2H₂O
 3 mM HACoCl₃

SOB-Medium

10 g Bacto Peptone 140
 5 g Yeast Extract
 0,584 g NaCl (Endkonz. 10 mM)
 0,186 g KCl (Endkonz. 2,5 mM)
A. desf. ad 1000 ml, pH 6,0 - 7,0
 autoklavieren

LB-Medium, flüssig

wie LB-Medium fest, ohne Agar

LB-Medium, fest

15 g Agar
 10 g Select Peptone 140
 5 g Yeast Extract
 10 g NaCl
 A. dest. ad 1000 ml, auf pH 7,5
 einstellen
 autoklavieren; Lagerung bei 4°C

2 M Mg²⁺-Lösung

1 M MgCl₂ x 6 H₂O
 1 M MgSO₄ x 7 H₂O

DND

1,53 mg/ml DTT
 90% DMSO
 1% 1 M KAc (pH 7,5)

2.2.17.2 Chemische Transformation kompetenter *E. coli* NM522

Die Transformation kompetenter *E. coli* NM522 (2.2.17.1) wurde modifiziert nach Angaben von Hanahan (1983) durchgeführt. Direkt nach der Kompetenzinduktion wurden 200 µl Aliquots der Bakterienzellen gemeinsam mit einem Ligationsansatz in ein 1,5 µl Eppendorfgefäß gegeben. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 20' bis 30' und eine Hitzeinduktion für 90" bei 42°C im Wasserbad. Die Bakterienzellen wurden für 2' auf Eis abgekühlt. Nach anschließender Zugabe von 800 µl SOC (SOB + 1% 2 M Glukose + 1% 2 M MgCl₂) pro Ansatz erfolgte eine Inkubation für 60' bei 37°C und 180 rpm. Von den transformierten Bakterien wurden 100 µl auf festem LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum und ggf. IPTG und X-Gal (2.2.17.5) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Als Anhaltspunkt für die Transformationseffizienz wurde parallel die Transformation eines kovalent zirkulär geschlossenen Plasmids (10 ng) durchgeführt. Für die Bestimmung der Transformationsrate wird das Plasmid in SOC-Medium verdünnt und in den Verdünnungsstufen 10⁻¹ bis 10⁻⁴ ausgestrichen. Die Angabe der Transformationsrate erfolgte in CfU/µg Plasmid-DNA.

Verwendete Selektivmedien

Die nachstehend aufgeführten Antibiotika, sowie IPTG und X-Gal (2.2.17.5) wurden im angegebenen Lösungsmittel gelöst und zu 1000 ml ca. 50°C warmen, autoklaviertem LB-Medium mit Agarose (2.2.17.1) zugegeben.

LB-AP-Medium

150 mg Ampicillin/ml H₂O

LB-Kn-Medium

50 mg Kanamycin/ml EtOH_{99%}

LB-Ch-Medium

25 mg Chloramphenicol/ml EtOH_{99%}

LB-AIX-Medium

150 mg Ampicillin/ml H₂O
 40 mg X-Gal/ml DMF
 46 mg IPTG/ml H₂O

LB-CIX-Medium

25 mg Chloramphenicol/ml EtOH_{99%}
 40 mg X-Gal/ml DMF
 46 mg IPTG/ml H₂O

2.2.17.3 Herstellung kompetenter *E. coli* NM522 zur Lagerung

Um den zeitlichen Aufwand von Transformationen zu minimieren, können kompetente Bakterienzellen auch gelagert und im Bedarfsfall für eine Transformation (Quick-Transformation, 2.2.17.3) verwendet werden. Für die Herstellung von kompetenten Bakterienzellen zur Lagerung wurde gemäß dem nachstehenden, auf der Verwendung von Rubidiumchlorid basierenden, Protokoll vorgegangen.

- Animpfen und Kultur der Bakterien über Nacht wie in 2.2.17.1 beschrieben
- 1 ml der über Nacht gewachsenen Bakterien in 100 ml Psi überimpfen und bei 37°C auf dem Schüttler (220 rpm) bis zu einer $OD_{550} = 0,48$ inkubieren
- Überführen der Bakteriensuspension in 30 ml Zentrifugenröhrchen (Corex)
- Zellernte bei 4000 g und 4°C für 5' im Ausschwingrotor (Nr. 11140) der Kühlzentrifuge (Sigma 4K10)
- Überstand verwerfen und Resuspension des Pellets 0,4 Vol. TfbI (bezogen auf das Ausgangsvolumen)
- Inkubation auf Eis für 15'
- Zellernte bei 4000 g und 4°C für 5' im Ausschwingrotor (Nr. 11140) der Kühlzentrifuge (Sigma 4K10)
- Überstand verwerfen und Resuspension des Pellets in 0,04 Vol. TfbII
- Aliquotieren der Bakteriensuspension (110 µl) in 1,5 ml Eppendorfgefäße und umgehend in flüssigem Stickstoff einfrieren; Lagerung bei -80°C

Zusammensetzung der Puffer und Medien

Psi (1000 ml)

5 g Yeast Extract
20 g Bacto Tryptone
5 g MgSO₄
mit KOH auf pH 7,6 einstellen

TfbI

30 mM K-Acetat
100 mM Rubidiumchlorid
10 mM CaCl₂
50 mM MnCl
15% (v/v) Glycerol
mit Essigsäure (verdünnter) auf pH 5,8 einstellen

TfbII

10 mM MOPS
75 mM CaCl₂
10 mM Rubidiumchlorid
15% (v/v) Glycerol
mit NaOH (verdünnt) auf pH 6,5 einstellen

2.2.17.4 Quick-Transformation

Die Quick-Transformation stellt eine wenig zeitaufwendige Methode zur Transformation von Bakterienzellen dar. Diese Methode wurde hier i.d.R. für die Transformation von gelagerten kompetenten Bakterienzellen mit intakten Plasmiden genutzt, während bei der Transformation von Ligationsansätzen auf die unter 2.2.17.2 beschriebene Transformationsmethode mit den entsprechenden kompetenten Zellen (2.2.17.1) zurückgegriffen wurde. Die Quick-Transformation erfolgte wie im Folgenden beschrieben.

- kompetente Bakterienzellen auf Eis auftauen, dabei vorsichtig mischen
- Optional: zur Erhöhung der Transformationsrate Zugabe 2 µl 2-Mercaptoethanol (1:10 in *A. bidest.*) pro Ansatz und vorsichtig mischen
- Inkubation 10' auf Eis, alle 2' vorsichtig mischen
- 10 µl des Ligationsansatzes auf die Zellen geben, vorsichtig mischen
- Inkubation auf Eis für 20'
- Transformationsansatz für 90" im Wasserbad (42°C) inkubieren
- Ansatz auf Eis für 2' abkühlen
- 500 µl Psi (2.2.17.3) auf den Ligationsansatz geben
- Inkubation bei 37°C und 225 rpm für 1h
- 200 µl des Ansatzes auf Selektivmedien ausplattieren

2.2.17.5 Selektion transformierter Zellen

Um Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien zu isolieren, müssen nach der Transformation diejenigen Bakterienkolonien identifiziert werden, die das Plasmid tatsächlich aufgenommen haben. Für diesen Zweck verfügen die Plasmide über ein Antibiotikaresistenzgen. Sind die Bakterien transformiert, so können sie auf Selektivmedien mit dem entsprechenden Antibiotikum wachsen und für die weitere Arbeit selektiert werden.

Werden Vektoren benutzt, die mit dem lacZ-Gen ausgestattet sind, können auch Kolonien mit rekombinanten Plasmiden mit Hilfe des "blue-white screenings" von Kolonien mit nicht-rekombinanten Plasmiden unterschieden werden. Diese Vektoren enthalten das lacZ-Gen, das für das N-terminale α -Fragment der β -Galactosidase kodiert. Die Wirtszellen verfügen über das C-terminale ω -Fragment der β -Galactosidase. Beide Fragmente allein besitzen keine β -Galactosidase-Aktivität. Liegen beide Fragmente vor, können diese sich ergänzen (α -Komplementation) und zeigen β -Galactosidase-Aktivität (Ullmann, 1967). Die β -

Galactosidase-Aktivität zeichnet sich dadurch aus, dass bei Zugabe des Substrats X-Gal und des Induktors IPTG zum Medium Bakterienkolonien blau erscheinen. In das lacZ-Gen der Vektoren ist eine multiple Klonierungssequenz (MCS) eingefügt, die jedoch die Funktionalität des Gens nicht beeinträchtigt. Demnach erscheinen Bakterienkolonien mit einem nicht-rekombinanten Plasmid blau. Ist jedoch ein DNA-Fragment erfolgreich in die MCS des Vektors kloniert worden, so ist das lacZ-Gen zerstört und die Kolonien der mit diesem Konstrukt transformierten Bakterien erscheinen weiß.

Die Zahl der zu kontrollierenden Kolonien richtet sich nach der Transformationsrate, die sich aus der Transformation eines Kontrollplasmids ergibt und der Blindrate des Vektors (2.2.16).

2.2.18 Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli* NM 522

Zur Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus Bakterien wurden je nach weiterem Verwendungszweck unterschiedliche Verfahren angewendet.

2.2.18.1 Analytische Plasmid-DNA Präparation (Klare Lysate)

Das Prinzip der Präparation von Plasmid-DNA ist die von Birnboim & Doly (1979) beschriebene alkalische Lyse. Da in den transformierten Bakterien sowohl Plasmid als auch chromosomale DNA vorliegen, wird mit NaOH und SDS eine alkalische Lyse durchgeführt (pH 12,0 bis pH 12,5), bei der die chromosomale DNA selektiv denaturiert wird. Nach Absenken des pH-Wertes durch die Zugabe von Na-Acetat präzipitiert die chromosomale DNA und kann durch Zentrifugation entfernt werden. Die Plasmid-DNA wird dann nach einer Isopropanol-Fällung erhalten.

Bei der analytischen Präparation von Plasmid-DNA wurden die selektierten Bakterienkolonien (2.2.17.5) mit einem sterilen Zahnstocher in ein steriles Reagenzglas mit LB-Flüssigmedium und dem entsprechenden Antibiotikum (2.2.18.1) überführt. Die Ansätze wurden für 6 bis 8' bei 37°C auf dem Schüttler (180 bis 200 rpm) inkubiert. Abweichend erfolgte die Inkubation von Bakterien, die mit viralen "full-length"-Klonen transformiert wurden, bei 30°C über Nacht auf dem Schüttler (160 bis 180 rpm). Im Weiteren wurde wie folgt vorgegangen:

- 2 ml Bakteriensuspension in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführen
- Zellernte bei 13000 rpm für 2', Überstand verwerfen

- Resuspension des Bakterienpellets in 200 µl Lösung A und für 10-15' bei RT inkubieren
- Zugabe von 400 µl Lösung B und vorsichtig invertieren
- Zugabe von 300 µl Lösung C, vorsichtig invertieren und 15' auf Eis inkubieren
- Zentrifugation für 10' bei 13000 rpm und Überstand in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen
- Zentrifugation für 10' bei 13000 rpm, Überstand in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen und mit 600 µl Isopropanol (-20°C) mischen
- Zentrifugation für 10' bei 13000 rpm, Überstand vollständig entfernen
- Zugabe von 200 µl Lösung D und Pellet vorsichtig resuspendieren
- Zugabe von 400 µl EtOH_{99%} (-20°C) und mischen
- Zentrifugation für 10' bei 13000 rpm, Überstand vollständig entfernen
- Trocknung des DNA-Pellets für ca. 5' im Vakuumtrockner
- Zugabe von 60-80 µl TE/RNase, resuspendieren und Lagerung bei -20°C

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Lösung A

15 mM Tris-base (pH 8,0)
10 mM EDTA
50 mM Glucose

Lösung B

0,2 M NaOH
1% SDS

Lösung C

3 M NAc (pH 4,8)

Lösung D

0,1 M NaAc (pH 7,0)
0,05 M Tris HCl (pH 8,0)

TE/RNase

10 µg RNase/ml TE 10/0,1 (pH 8,0)

2.2.18.2 Präparative Plasmid-DNA Präparation

Für bestimmte Zwecke, z.B. für Sequenzierungen oder Partikelbombardement (2.2.19, 2.2.20.1), war es notwendig Plasmid-DNA in hoher Reinheit zu präparieren. Es wurden je nach der Menge der zu isolierenden DNA zwei Reaktionskits der Firma Qiagen verwendet (Mini bzw. Midi Plasmid Präparations Kit). Beide Kits bauen ebenfalls auf einer alkalische Lyse (2.2.18.1) auf, wobei hier jedoch die Plasmid-DNA an eine Silica-Membran vorübergehend gebunden und nach dem Waschen wieder eluiert wird.

Im Folgenden wird erst die Mini-Präparation, dann die Midi-Präparation behandelt. Bei der Mini-Präparation wurde entsprechend der Angaben in 2.2.18.1 eine Bakteriensuspension vorbereitet.

Mini-Präparation

- 2 ml Bakteriensuspension werden in ein in 2 ml Eppendorfgefäß überführt
- Zellernte bei 13000 rpm für 2', Überstand verwerfen
- Resuspension des Bakterienpellets in 250 µl Puffer P1
- Zugabe von 250 µl Puffer P2, mehrmals vorsichtig invertieren
- Zugabe von 350 µl Puffer N3, mehrmals vorsichtig invertieren
- Zentrifugation für 10' bei 13000 rpm
- Mini-Säule auf das Auffanggefäß setzen und Überstand der Zentrifugation auf die Mini-Säule geben
- Zentrifugation für 45' bei 13000 rpm, Überstand verwerfen
- Zugabe von 500 µl Puffer PB auf die Minisäule
- Zentrifugation für 45' bei 13000 rpm, Überstand verwerfen
- Zugabe von 750 µl Puffer PE auf die Mini-Säule
- Zentrifugation für 45' bei 13000 rpm, Überstand verwerfen
- Zentrifugation wiederholen
- Mini-Säule auf ein 1,5 ml Eppendorfgefäß setzen, Zugabe von 50 µl Puffer EB (10 mM Tris HCl, pH 8,5) und Inkubation für 5' bei RT
- Zentrifugation für 45' bei 13000 rpm, Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen und bei -20°C lagern
- die Ausbeute beträgt bis zu 20 µg DNA

Midi-Präparation

Für die Bakteriensuspension wurden unter den gleichen Bedingungen wie oben für die Mini-Präparation Einzelkolonien in je 50 bis 100 ml Flüssigmedium mit dem entsprechenden Selektionsmedium über Nacht angeimpft.

- Zentrifugation der Bakteriensuspension zur Zellernte im 250 ml Becher (Rotor: GSA Festwinkel) bei 6000 rpm für 15' (4°C), Überstand verwerfen
- Resuspendieren des Bakterienpellets in 4 ml Puffer P1, dann
- Zugabe von 4 ml Puffer P2, Inkubation bei RT für 5'
- Zugabe von 4 ml Puffer P3, mischen und für 15' auf Eis inkubieren
- Zentrifugation im 250 ml Becher (Rotor: GSA Festwinkel) bei 13000 rpm für 30' (4°C)
- Aufsetzen eines Faltenfilters auf die Midi-Säule und mit 5 ml Puffer QBT äquilibrieren
- Überstand der Zentrifugation in den Filter geben
- 2 x Waschen der Midi-Säule mit 10 ml Puffer QC
- Midi-Säule auf 30 ml Zentrifugenröhrchen setzen, DNA mit 5 ml Puffer QF eluieren

- Fällung der DNA mit 0,7 Vol. Isopropanol (RT)
- Zentrifugation bei 13000 rpm für 30' (4°C) (Rotor: SS34 Festwinkel)
- Waschen des DNA-Pellets mit 2 ml EtOH_{70%}
- Zentrifugation bei 13000 rpm für 30' (4°C) (Rotor: SS34 Festwinkel)
- Trocknen des DNA-Pellets im Inkubator (37°C)
- Resuspendieren des DNA-Pellets in 200 - 300 µl TE 10/0,1 (pH 8,0; vergl. 2.2.2)
- die Ausbeute beträgt bis zu 100 µg DNA

2.2.18.3 Herstellung von Bakteriendauerkulturen

Es besteht die Möglichkeit mit Plasmiden transformierte Bakterienkulturen zu lagern. Diese Kulturen können bei Bedarf in ein entsprechendes Flüssigmedium überführt werden und nach einer Inkubation für die Isolierung von Plasmid-DNA verwendet werden (2.2.18.1 bzw. 2.2.18.2). Die Lagerung der mit Plasmiden transformierten Bakterienstämme erfolgte bei mindestens -20°C. Da bei den tiefen Temperaturen eine zellschädigende Eiskristallbildung in den Bakterienzellen auftreten kann, wurde zu der Bakteriensuspension Glycerin gegeben. Es wurden 500 µl Bakteriensuspension und 650 µl Glycerin (87%, autoklaviert) in einem 1,5 ml Eppendorfgemisch und eingefroren.

2.2.19 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden mit dem QIAprep[®] Miniprep Kit (2.2.18.2) gereinigte Plasmidlösungen verwendet. Wurden die Plasmide nach dem in 2.2.18.1 vorgestellten Verfahren präpariert, so erfolgte eine Reinigung nach der in 2.2.18.2 beschriebenen, jedoch verkürzten Vorgehensweise. Dabei wurde die wässrige DNA-Lösung direkt auf die Mini-Säule gegeben und bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Plasmid DNA wurde so in der Matrix der Säule gebunden und im Weiteren entsprechend dem in 2.2.18.2 beschriebenen Protokoll gewaschen und anschließend wieder eluiert. Von den gereinigten Proben wurden 2 bis 6 µl mit der unter 2.2.9 beschriebenen Na-Acetat/Ethanol-Fällung für die Sequenzierung vorbereitet. Es erfolgte eine Auftragssequenzierung bei der Firma MWG Biotech (<http://www.mwg-biotech.de/>).

2.2.20 Partikelbombardement von *Nicotiana benthamiana*

Mit Hilfe des Partikelbombardements können Nukleinsäuren sehr effizient in pflanzliche Zellen transferiert werden, ohne dass die getroffenen Zellen kollabieren (Gal-On et al., 1995). Diese Methode wird u.a. zur Blattscheibentransformation, transienten Expression von Markergenen, aber auch zur Infektion von Pflanzen mit infektiösen cDNAs angewendet. Die zu transferierende Nukleinsäure (i.d.R. DNA) wird dabei an Wolfram- oder Goldpartikel gebunden und mit Hilfe einer Partikelkanone (2.1.9.1) auf pflanzliches Gewebe geschossen.

2.2.20.1 Präparation von Plasmid-DNA zum Partikelbombardement

Für das Partikelbombardement wurde i.d.R. Plasmid-DNA aus präparativen Aufarbeitungen (2.2.18.2) verwendet und wie im Folgenden beschrieben an Wolframpartikel gebunden.

- 1 bis 2 µl Plasmid-DNA in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit *A. bidest.* ad 3 µl (1/3 Vol. des Ansatzes)
- 3 µl Wolframpartikel zugeben
- 3 µl 1,25 M Ca(NO₃)₂ zugeben und mischen
- Inkubation des Ansatzes (9 µl) bei RT für ca. 5' (die DNA präzipitiert und lagert sich an die Wolframpartikel an)
- 6 µl (2/3 Vol.) klaren Überstand abnehmen
- 3 µl verbleiben im Eppendorfgefäß
die Menge ist ausreichend für 1 Schuss mit der Partikelkanone

Sollte ein Co-Bombardement mit zwei verschiedenen Plasmid-DNAs durchgeführt werden, so wurden von jedem Plasmid 1 µl der präparativen Aufarbeitung eingesetzt.

2.2.20.2 Durchführung des Partikelbombardements

Die Wolframpartikel mit der gebundenen DNA wurden auf einen Spritzenfilter pipettiert und dieses in die Vakuumglocke der Partikelkanone eingesetzt (Abbildung 2-4). Daraufhin wurde die zu inokulierende Pflanze oder ein Blatt lotrecht unter das Spritzenfilter in Position gestellt bzw. gelegt. Durch Anlegen eines Vakuums mit Hilfe der Vakuumpumpe wurde ein Unterdruck erzeugt, damit die Partikel vom Luftwiderstand weitgehend ungehindert auf das Zielobjekt gelangen konnten. Bei Erreichen eines Unterdruckes von ca. 800 mbar wurde ein

Magnetventil für 0,1" geöffnet. Durch das Öffnen strömte kurzfristig Pressluft (3 bar) durch das Spritzenfilter und verbringt die Wolframpartikel auf bzw. in die Pflanze (oder das Blatt). Bei der Inokulation von Pflanzen erfolgte i.d.R. ein Schuss in den Vegetationskegel. Soweit im Ergebnisteil nicht anders beschrieben, wurden für das Bombardement mit einem Konstrukt i.d.R. 4 bis 8 Pflanzen verwendet. Die Pflanzen wurden nach der Behandlung im Gewächshaus unter Standardbedingungen weiter kultiviert (2.2.1). Wurden Blätter z.B. mit GFP-Expressionsplasmiden inokuliert, wurden diese in eine mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Petrischale gelegt und im Dunkeln für 48 h bis 72 h bei RT inkubiert.

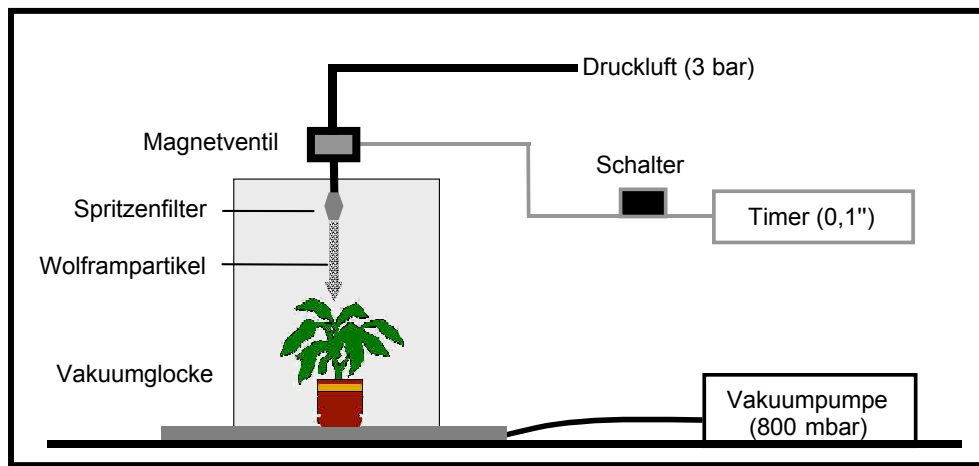


Abbildung 2-4 Aufbau einer Partikelkanone

(verändert aus Dietrich, 2000)

2.2.21 Mechanische Übertragung von Pflanzenviren

Sofern Pflanzenviren mechanisch übertragbar sind, spielt diese Art der Übertragung eine wichtige Rolle in der Pflanzenvirologie. Ist infektiöses Pflanzenmaterial vorhanden, können mit dieser Methode kostengünstig und wenig zeitaufwendig viele Pflanzen sehr effizient inokuliert werden.

Zur mechanischen Übertragung wurden ca. 0,5 g virusinfiziertes Blattmaterial unter Zugabe von 2 ml 0,03 M HEPES (pH 7,0) homogenisiert. Um eine Pflanze mit zwei Viren gleichzeitig zu inokulieren, wurden gleiche Teile infektiösen Pflanzenmaterials im Mörser homogenisiert. Auf drei bis vier Blätter einer zu infizierenden Pflanze wurde etwas Cellite gestäubt. Die Virussuspension wurde mit einem am Ende abgeflachten Glasstab ("Elefantenfuß") oder mit den zuvor mit NaPO₄-Seife gewaschenen Händen vorsichtig über die eingestäubte Blattfläche gerieben. Um zu starke Schädigungen des Pflanzengewebes zu vermeiden, wurde das zu inokulierende Blatt mit der zweiten Hand vorsichtig unterstützt. Durch die

Verwendung von Celite wurden leichte Verletzungen in der Kutikula und den Zellwänden erzeugt, die den Viren das Eindringen in die Pflanzenzellen ermöglichen. Nach der Behandlung wurden die Pflanzen leicht mit Wasser überbraust und unter Standardkulturbedingungen (2.2.1) im Gewächshaus aufgestellt.

Für die Durchführung von Doppelinfektionen mit zwei Viren wurde, wie oben beschrieben, ein Presssaft aus einzeln infizierten Pflanzen hergestellt, zu gleichen Teilen gemischt und auf Celite bestäubten Pflanzenblätter aufgerieben.

2.2.22 Konservieren von virusinfiziertem Pflanzenmaterial

Die Konservierung von virusinfiziertem Pflanzenmaterial wurde nach einer einfachen, wenig zeit- und kostenaufwendigen Methode nach Angaben von Dijkstra & de Jager (1998) durchgeführt. Hierfür wurde der Boden einer Petrischale mit CaCl_2 -Anhydrat bedeckt und mit einem runden Filterpapier abgedeckt. Ersatzweise wurde $\text{CaCl}_2 \cdot (5 \times \text{H}_2\text{O})$ für 3 h bei 160°C getrocknet und entsprechend weiterverwendet. Daraufhin wurde infiziertes Pflanzengewebe mit einer sterilen Pinzette von der Pflanze abgenommen und mit einer ebenfalls sterilen Rasierklinge in 1 bis 2 cm^2 große Stücke geschnitten. Es wurde darauf geachtet, dass große Blattadern entfernt wurden. Die Pflanzenstücke wurden dann auf das Filterpapier gelegt und die Petrischale nach dem Auflegen des Deckels mit Parafilm luftdicht verschlossen. Es erfolgte eine Lagerung der Petrischale bei 4°C für ca. 1 bis 2 Wochen. Danach konnte das getrocknete Pflanzenmaterial in sterile 15 ml Falcon Tubes überführt werden, deren Boden ebenfalls mit einer geringen Menge CaCl_2 -Anhydrat bedeckt war. Ein Wattestopfen trennte dabei CaCl_2 -Anhydrat und Pflanzenmaterial. Die Lagerung erfolgte bei 4°C . Das getrocknete Pflanzenmaterial ist nach Angaben von Dijkstra & de Jager (1998) bis zu 15 Jahre infektiös und kann wie frisches Pflanzenmaterial für die mechanische Inokulation (2.2.21) von Pflanzen verwendet werden.

2.2.23 Fluoreszenzmikroskopie

Die Ausbreitung und Verteilung fluoreszenzmarkierter Viren im Pflanzengewebe wurde mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Techniken untersucht. Allgemein baut die Fluoreszenzmikroskopie darauf auf, dass mit Licht bestrahlte Objekte Licht emittieren (Lumineszenz), wobei die Wellenlängen emittierten Lichts länger sind, als die der Anregung. Fluoreszieren Substanzen nach Anregung mit kurzwelligem Licht von sich aus, wird dies als Primär- bzw.

Autofluoreszenz bezeichnet. Dies trifft z.B. auf Chlorophyll a und die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzproteine zu. Je nach Beschaffenheit und chemisch-physikalischem Zustand bzw. Umweltbedingungen weisen unterschiedliche Objekte oder Substanzen charakteristische Anregungs- und Emissionsspektren auf. Aufgrund dieser Unterschiede können bestimmte Objekte während der Mikroskopie besser sichtbar gemacht und aus ihrer Umgebung hervorgehoben werden (z.B. Zellkerne im Zellverband mit DAPI-Färbung).

Herstellung von Präparaten zur Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Anfertigung von Präparaten für Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop wurden Blattproben von infizierten oder bombardierten Pflanzen genommen und mit einer Rasierklinge in kleine ca. 4 bis 8 mm² große Stücke geschnitten. Auf den Objektträger wurden ein bis zwei Tropfen *A. dest.* vorgelegt und die Blattprobe aufgelegt. Insbesondere für die CLSM-Technik war es von Vorteil, wenn neben der Probe zwei Deckgläschen (10 x 10 mm) positioniert wurden und über diese und die Probe ein großes Deckglas gelegt wurde. Dadurch wurde eine waagerechte Ausrichtung des Deckgläschens erreicht.

2.2.23.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Bei der Epifluoreszenzmikroskopie wird kurzwelliges Licht durch ein Anregungsfilter auf das zu untersuchende Objekt geleitet. Dies ist i.d.R. ein Kurzpassfilter das langwelliges Licht sperrt und kurzwelliges passieren lässt. Das Anregungslicht wird durch ein Reflexions-Kurzpassfilter (Farbteiler, dichromatischer Teiler) auf das Objekt reflektiert. Das abgelenkte Licht passiert das Objektiv, das die Funktion des Kondensors übernimmt und trifft auf das Objekt. Die durch die Anregung emittierte Gesamtfluoreszenz gelangt durch das Objektiv zurück zum Farbteiler, der für die Wellenlängen des Fluoreszenzlichtes durchlässig ist. Der Farbteiler ermöglicht also die Trennung von kurzwelligen Anregungs- und langwelligen Emissionswellenlängen. Ein nachgelagertes Langpassfilter (Sperrfilter) sperrt unerwünschte kurzwellige Strahlung und sorgt dafür, dass nur das Fluoreszenzlicht der Probe durch das Okular in das Auge des Betrachters gelangt.

2.2.23.2 Konfokale Laser Scan Mikroskopie (CLSM)

Im Unterschied zur konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie ermöglicht die konfokale Laser Scan Mikroskopie die Abbildung von Fluoreszenz- oder Reflektionslicht einer einzigen

Fokalebene, wobei Licht aus anderen Ebenen nicht detektiert wird. Im Folgenden wird eine kurze Beschreibung des konfokalen Prinzips gegeben (siehe auch Abbildung 2-5). Wie bei der Epifluoreszenzmikroskopie fungiert auch im CLSM das Objektiv als Kondensator. Ausgehend vom Lasermodul des CLSM wird ein durch die Apertur geleiteter Laserstrahl von einem Farbteiler in die Objektivlinse reflektiert, dadurch auf die Probe abgelenkt und fokussiert. Das CLSM verfügt über einen konfokalen Punktscanner, der über die Linsen des Mikroskops das Laserlicht auf einen Punkt der Probe fokussiert (Fokalpunkt). Durch Abtasten aller Punkte mit dem Laser entsteht die Fokalebene, deren emittiertes Fluoreszenz- bzw. Reflexionslicht durch das Objektiv zurückgeleitet wird. Das Emissionslicht wird im Mikroskop und dem Scan-Modul auf einen zweiten Punkt fokussiert (Konfokalpunkt). Durch das am Konfokalpunkt angebrachte "Detektionspinhole" gelangt das emittierte Licht in den Detektor, wobei außerkonfokales Licht das "Pinhole" nicht passieren kann. Im Detektor werden die einzelnen Fokalpunkte bzw. die Signale detektiert, digitalisiert und an den Computer weitergeleitet. Durch das punktweise Abtasten der Probe wird mit Hilfe der Software ein digitales Bild aus den Signalen zusammengesetzt.

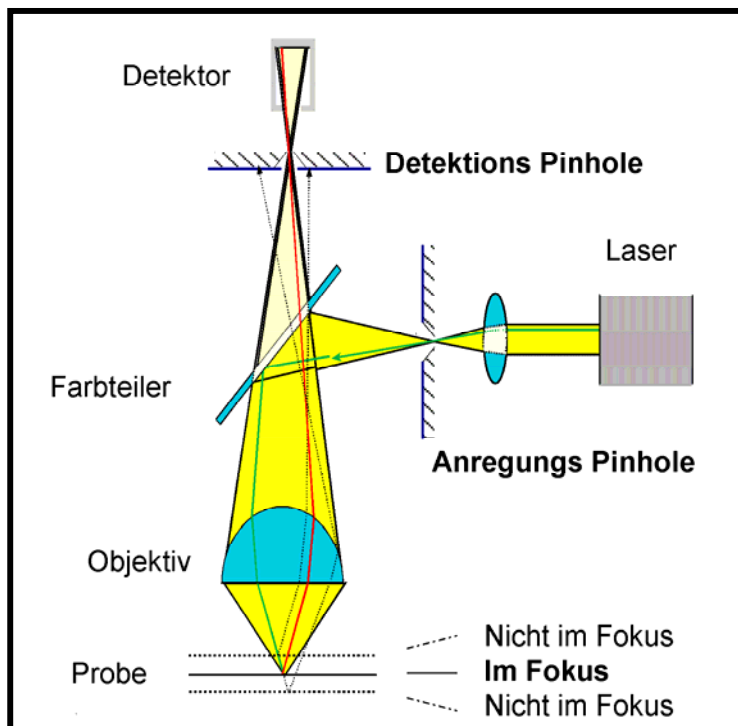


Abbildung 2-5 Schematische Darstellung des konfokalen Prinzips

(aus "Grundkurs Konfokalmikroskopie"; Leica)

Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über die zur Bildaufnahme wichtigsten Elemente und Funktionen des CSLM und eine generelle Vorgehensweise zur Abbildung eines

Objektes mit dieser Technik gegeben. Eine eingehende Beschreibung einzelner Hard- und Softwarekomponenten, sowie spezieller Techniken in CLSM-Anwendungen ist dem Benutzerhandbuch des TCS SP2 (Art. Nr.: 15-9330-052, Vers.: 01082001; Leica Microsystems) und den Schulungsunterlagen "Grundkurs Konfokalmikroskopie" (Leica Microsystems) zu entnehmen. Eine aktuelle Einführung in die Konfokalmikroskopie und ihre Anwendungen gibt Hibbs (2004).

Charakterisierung von Emissionsspektren

Zur Charakterisierung der pflanzlichen Autofluoreszenz bzw. der Fluoreszenz der verwendeten Reporterproteine oder anderer Farbstoffe unter den Bedingungen der Expression in pflanzlichen Zellen wird ein sog. λ -Scan durchgeführt. Nach Auswahl von Anregungswellenlänge (z.B. 488 nm) und Farbteiler werden eine eingeeengte Detektionsbandbreite (z.B. 10 nm) und das Scan-Spektrum definiert (z.B. 500 nm bis 680 nm). Im angeführten Beispiel werden 680 nm als Anfangs- und 500 nm als Endpunkt der λ -Serie festgelegt. Dann erfolgt der λ -Scan, in dem von dem Objekt bei gleichbleibender Anregungswellenlänge von 680 bis 500 nm in 10 nm Schritten die Emission ermittelt wird. Für das genannte Beispiel entsteht eine λ -Serie von 18 Bildern, jedes mit einem um 10 nm verschobenen Emissionsspektrum. Das erhaltene Spektrum kann quantifiziert und graphisch dargestellt werden. Soll wie im vorliegenden Falle die pflanzliche Autofluoreszenz eliminiert werden, so kann anhand des Auswertungsgraphen abgeleitet werden, dass z.B. bei der Darstellung von DsRed in Pflanzen Wellenlängen über 620 nm von der Detektion ausgenommen werden müssen.

Einstellen der Filtersettings am CLSM

Es besteht die Möglichkeit über die CLSM Software voreingestellte Filtersettings, z.B. für GFP oder DsRed, zu verwenden. Da diese Einstellungen für die Verhältnisse in Pflanzen nicht optimal sind, muss eine entsprechende Anpassung erfolgen. Zunächst wird gemäß dem Anregungsspektrum des Fluoreszenzmoleküls ein entsprechender Laser (bzw. Laserkennlinie) mit dem dazugehörigen Farbteiler ausgewählt, mit dem das Molekül angeregt wird. Insbesondere pflanzliches Gewebe verfügt über eine ausgeprägte Autofluoreszenz, die mit der Wahl des richtigen Emissionsspektrums aus dem Bereich der Detektionswellenlängen herausgefiltert werden kann (siehe "Charakterisierung von Emissionsspektren"). Nach erfolgter Feststellung aller Anregungs- und Emissionsspektren werden die Aufnahmeparameter als individueller Aufnahmeparametersatz ("instrument parameter setting", IPS) gespeichert. Ausgehend von dem optimierten IPS erfolgt die Bildaufnahme wie im Folgenden beschrieben.

Bildaufnahme am CLSM

Ziel der Bildaufnahme am CLSM ist die Anfertigung eines optimalen Bildes mit hoher Auflösung. Wie bei allen Mikroskopen bestimmt die numerische Apertur der verwendeten Objektive die Bildauflösung, also den minimalen Abstand zweier Punkte, die getrennt als Bild dargestellt werden können. Die Angaben zur numerischen Apertur sind in 2.1.9.3 aufgeführt. Darüber hinaus gibt es am CLSM eine Reihe von Funktionen, die während der Bildaufnahme die Auflösung beeinflussen. Bei der Bildaufnahme kann das dargestellte Bild bzw. Signal verstärkt oder abgeschwächt werden, so dass u.U. das digitale Bild nicht mehr dem realen Bild entspricht. Es ist daher sehr wichtig während der Bildaufnahme alle Parameter (s.u.) so zu wählen, dass ein unverfälschtes Bild entsteht.

Grundsätzlich wurde bei der ersten Bildaufnahme wie im Folgenden beschrieben vorgegangen. Allerdings konnte bei weiteren Aufnahmen auf die Optimierung einiger Parameter u.U. verzichtet werden (z.B. "Einstellung der Deckglaskorrektur").

1. Einstellung der Deckglaskorrektur

Mit Hilfe des Korrekturringes am Objektiv können Abweichungen in der Dicke der Deckglasdicke von 0,14 bis 0,18 mm kompensiert werden. Die Probe wird auf dem Feinfokussier-Z-Tisch der Mikroskops befestigt und der Fokus eingestellt. Der IPS für Reflektion wird ausgewählt und mit der Falschfarbe "glow over" belegt. Nach Einstellen des Scan-Modus auf "xzy" wird die kontinuierliche Bildaufnahme in Z-Richtung gestartet und das Reflektionsbild der Deckglas/Medium Grenze dargestellt. Für diese Funktion ist es hilfreich, das "Pinhole" weit zu öffnen. Durch Drehen des Korrekturringes wird das Bild so eingestellt, dass das Reflektionsbild des Deckglases am hellsten und schärfsten erscheint.

2. Erste Darstellung im kontinuierlichen Bildaufnahmemodus

Der entsprechende IPS wird ausgewählt und mit "glow over/under" belegt; alternativ kann während der Aufnahme auch in den Q-LUT-Modus gewechselt werden. Dieser Modus stellt Maximalwerte des eintreffenden Signals blau und Minimalwerte grün dar und erlaubt eine Anpassung der Signalverstärkung und des Schwellenwertes (siehe unten). Die Strahlaufweitung ("Beam Exp 6") wird kontrolliert. Diese Einstellung sollte nur bei schwachem Laser oder hochauflösendem Objektiv geändert werden (eine geringere Strahlaufweitung verbessert die Beleuchtung der Objektivlinse). Für den Beginn wird ein geringes Aufnahmeformat (z.B. 512 x 512 Pixel) und eine mittlere Aufnahmegeschwindigkeit (z.B. 400 Bildzeilen/Sekunde) festgelegt. Weitere Einstellungen (z.B. Bittiefe, bidirektionaler Scan) werden vorerst nicht verändert. Durch

Einschalten des kontinuierlichen Scan-Modus wird die Bildaufnahme gestartet. Das "Pinhole" wird kontrolliert und ggf. die "airy"-Einstellung wiederhergestellt.

3. Ermittlung der Bildebene

Durch die Änderung der Z-Position wird die gewünschte Fokusebene des Objektes ausgewählt. Soll eine Bildserie in Z-Richtung zur Generierung eines räumlichen oder eines zweidimensionalen, aber farbintensiveren Bildes gemacht werden, so erfolgt die Festsetzung von Start und Ende der Serie entlang der Z-Achse. Hierbei muss zusätzlich die Anzahl der optischen Schnitte und die Häufigkeit definiert werden mit der diese gescannt werden sollen.

4. Einstellung der Signalverstärkung und des Schwellenwertes

Ist die Fokusebene gefunden, kann im Q-LUT-Modus ("glow over/under") über den entsprechenden Detektionskanal das Signal verstärkt ("gain"-Funktion) und der Schwellenwert ("offset"-Funktion) korrigiert werden. Hierbei kann es von Vorteil sein, die Sensitivität zur Änderung der Signalverstärkung entsprechend anzupassen. Die Signalverstärkung wird dabei solange maximiert, bis die hellsten Punkte des Bildes blau erscheinen. Bei der Einstellung des Schwellenwertes ist zu beachten, dass nicht mehr als 50% des Bildhintergrundes grün dargestellt werden. Alternativ kann versucht werden, die Stärke des Lasers zu variieren. Durch die korrekte Einstellung des Signals kann bereits ein Teil des optischen Rauschens beseitigt werden.

5. Darstellung von Bildausschnitten und Anpassen der Auflösung

Die endgültige Einstellung der optimalen Auflösung hängt von der Wahl des Scanformats und der Scanfeldgröße ab. Die Optimierung erfolgt gemäß dem Nyquist-Theorem, wonach eine Struktur nur dann ohne Informationsverlust abgerastert werden kann, wenn der kleinste auflösbare Abstand mit zwei bis drei Rasterpunkten abgetastet wird (laterale Auflösung). Mit der Auswahl des Scanformats (z.B. 1024 x 1024 Pixel) wird das verwendete Bildraster (Anzahl der Punkte, mit der das Bild abgerastert wird) festgelegt. Im Weiteren bestimmen jetzt noch die numerische Apertur (z.B. NA = 1,4) und die Anregungswellenlänge ($\lambda = 488 \text{ nm}$) die Auflösung. Folgendes Beispiel verdeutlicht diesen letzten Schritt der Optimierung:

$$\begin{aligned} \text{Laterale Auflösung} &= 0,4 * \lambda_{\text{Anregung}} / \text{NA} \\ &\Rightarrow 0,4 * 488 \text{ nm} / 1,4 = \text{ca. } 140 \text{ nm} \end{aligned}$$

nach dem Nyquist-Theorem beträgt der Abstand der Rasterpunkte (für eine Aufnahme ohne Informationsverlust) dann

$$140 \text{ nm} / 3_{\text{Rasterpunkte}} = 47 \text{ nm.}$$

Wurde ein Objektiv mit einer maximalen Scanfeldgröße von 150 μm gewählt, beträgt der Abstand der Rasterpunkte jedoch

$$150 \mu\text{m} / 1024 = \text{ca. } 146 \text{ nm.}$$

Um den angestrebten Rasterabstand (47 nm) annähernd zu erreichen, muss nun entweder das Scanformat erhöht (z.B. 2048 x 2048 Pixel) oder die Scanfeldgröße mit dem elektronischen Zoom entsprechend verkleinert werden.

In der Software des CLSM ist die Berechnung der Auflösung vereinfacht durch die Angabe des jeweils aktuellen Rasterabstandes als "Voxel Size" (Volumen Pixel).

Vermeidung des Übersprechens ("crosstalk")

Bei der Verwendung der Reporterproteine DsRed und smRS-GFP ergibt sich in der simultanen Darstellung das Problem des Übersprechens. smRS-GFP wird mit dem Argon Laser (488 nm) und DsRed mit dem HeNe Laser (543 nm) angeregt. Als Übersprechen wird die Möglichkeit bezeichnet, dass DsRed zu einem gewissen Grad auch mit 488 nm angeregt werden kann. Wird die Anregung des DsRed mit der smRS-GFP-Anregungswellenlänge nicht berücksichtigt, entstünde ein falsches Bild.

Es gibt mehrere Möglichkeiten den sog. "crosstalk" zu eliminieren. Die einfachste Methode DsRed- und smRS-GFP-Fluoreszenz physikalisch getrennt abzubilden, ist die manuelle Regulierung des 488 nm Lasers, so dass DsRed nicht mehr angeregt wird. Eine optimale Einstellung kann durch die Durchführung eines λ -Scans (s.o.) erreicht werden. Zweitens besteht die Möglichkeit zur sequenziellen Bildaufnahme. Hierbei wird die Fluoreszenz der beiden Reporterproteine unter Zuhilfenahme zweier IPS (für DsRed und smRS-GFP) in getrennten Kanälen abwechselnd abgebildet. Auf weitere Möglichkeiten der "crosstalk"-Eliminierung mit Hilfe der CLSM-Software wurde nicht zurückgegriffen.

Herstellen von zwei- und dreidimensionalen Ansichten

Wurde bei der Abbildung eines Präparates nicht nur zweidimensional sondern auch mehrere Ebenen in Z-Richtung gescannt (siehe "Ermittlung der Bildebene"), so erlaubt die CLSM

Software eine verbesserte zweidimensionale, aber auch eine dreidimensionale, animierte Darstellung des abgebildeten Objektes. Eine verbesserte zweidimensionale Darstellung erfolgt, indem die Mittelwerte (Averageprojektion) oder die Maximalwerte (Maximalprojektion) aller im Bildstapel jeweils übereinanderliegenden Bildpunkte berechnet und dargestellt werden. Für die dreidimensionale Darstellung wird ein vorliegender Bildstapel einer Scan-Serie mit der 3D-Processing Option zu einem räumlichen Bild zusammengesetzt und animiert. Eine weitere Möglichkeit der Darstellung von einzelnen kleinen Objekten im Präparat oder von Querschnitten durch das Präparat ohne die aufwendige Verarbeitung zu einem 3D-Bild erlaubt die Sectioning-Option. Hierbei werden zwei Linien als rechtwinkliges Kreuz auf die Oberfläche einer Projektion gelegt. Daraufhin werden virtuelle Längsschnitte durch das Präparat entlang der sich kreuzenden Linien anhand der Daten des Bildstapels berechnet und an der unteren bzw. rechten Seite der Projektion abgebildet.

Weiterbearbeitung CLSM-generierter Bilder und Bildserien

In der Nachbearbeitung von Bildern und Bildserien mit der CLSM-Software können eine Vielzahl von Funktionen genutzt werden. Für die Nachbearbeitung der für die vorliegende Arbeit verwendeten Bilder wurden hauptsächlich die nachstehenden Optionen verwendet:

- "Contrast and Brightness"; zur linearen Veränderung aller Helligkeitswerte im Bild ("Brightness") bzw. zur Änderung des Verhältnisses von hellen zu dunklen Stellen im Bild (Kontrast)
- "Gamma Correction"; Einstellen der mittleren Helligkeitswerte, wobei helle und dunkle Maximalwerte unverändert bleiben
- "Baseline Correction"; zur nachträglichen Korrektur optischen Rauschens werden festzulegende Graustufen eliminiert

Darüber hinaus können in Bildserien über die Optionen "Separation" und "Merge" einzelne Bilder oder Bildausschnitte aus einer Serie herausgenommen bzw. aus einer anderen Serie eingefügt werden. Über dieselben Funktionen können zudem die Aufnahmekanäle nachträglich getrennt, separat bearbeitet und ggf. wieder zusammengefügt werden. Z.B. können in einer simultanen Aufnahme mit DsRed und smRS-GFP die DsRed-Bilder aus der Serie herausgenommen, bearbeitet und wieder in die smRS-GFP-Serie eingefügt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung einer RT-PCR zum Nachweis rekombinanter PPV-NAT/TVMV-Sequenzen

Es sollte ein RT-PCR-Verfahren entwickelt werden, mit dem rekombinante RNA-Sequenzen bestehend aus PPV-NAT und TVMV sowohl in Mischinfektionen dieser Viren, als auch in TVMV-infizierten PPV-transgenen Pflanzen nachgewiesen werden können. Durch einen Sequenzvergleich von PPV-NAT und TVMV sollten zunächst Regionen ermittelt werden, die aufgrund von Sequenzhomologien mögliche Orte für Rekombinationsereignisse sein könnten. Daraufhin erfolgte die Ermittlung von Primern für die identifizierten Regionen und die Entwicklung der RT-PCR.

3.1.1 Konservierte Regionen zwischen PPV-NAT und TVMV

Mit den Sequenzen der Genome von PPV-NAT und TVMV wurde ein Vergleich in ClustalX durchgeführt. Es wurden sowohl die gesamten Genome, als auch die einzelnen Cistrons beider Viren verglichen. Die verglichenen Sequenzen wurden zusammen mit der Konsensus-Sequenz in das Programm BioEdit eingelesen und auf konservierte Regionen hin untersucht. Bei der Suche wurde eine minimale Länge der konservierten Regionen von 15 Nukleotiden und die Akzeptanz von zwei Leerpositionen im Vergleich zugelassen.

Der Vergleich (Tabelle 3-1) ergab, dass die Genome von PPV-NAT und TVMV auf Nukleotidebene über eine Ähnlichkeit von 56% verfügen. Dabei besitzt der Bereich des N1b mit 62% die größten Übereinstimmungen. Das P1 (mit 5'-NTR) und die 3'-NTR haben im Vergleich zu den übrigen Regionen die geringste Übereinstimmung (44 bzw. 48%). Die übrigen Cistrons weisen Übereinstimmungen zwischen 51 und 56% auf. Es wurden zwei konservierte Regionen identifiziert, die länger als 15 Nukleotide sind (Tabelle 3-1). Die im N1b lokalisierte Region wurde als CR1 ("conserved region" 1), die im Hüllprotein lokalisierte Region entsprechend als CR2 ("conserved region" 2), bezeichnet (zur Lage von CR1 und CR2 siehe auch 6.2 und 6.3). Direkt am 5'-Ende von CR1 wurde eine weitere Sequenz mit Übereinstimmungen gefunden, die zudem besonders AT-reich ist (Abbildung 3-1).

Tabelle 3-1 Vergleich der Nukleinsäuresequenzen von PPV-NAT und TVMV

verglichene Region	Übereinstimmung [%]	konservierte Regionen [bp]	Lokalisierung † [bp]
Genom	56	s.u.	s.u.
P1 *	48	–	
HC-Pro	56	–	
P3 **	51	–	
CI ***	55	–	
Nla	52	–	
Nlb	62	16	PPV-NAT: 7585-7600 TVMV: 7442-7457
CP	54	18	PPV-NAT: 9137-9154 TVMV: 8838-8855
3'-NTR	46	–	

*mit 5'-NTR; **mit 6K1; ***mit 6K2; †Angaben für PPV-NAT D13751 (NCBI GenBank) und TVMV X04083 (NCBI GenBank)

CR1 im Nlb mit AT-reicher Sequenz am 5'-Ende von PPV-NAT/TVMV

```

PPV-NAT: 7572 5'-aataaaactcgatCATTACAGCAGCACC-3' 7600
TVMV: 7429 5'-aataaaacacggaCATTACAGCAGCACC-3' 7457
Konsensus: 5'-aataaaacWcgRWCATTACAGCAGCACC-3'

```

CR2 im CP von PPV-NAT/TVMV

```

PPV-NAT: 9137 5'-ACAAGTGGAGTATCCAAT-3' 9154
TVMV: 8838 5'-ACAAGTGGAGTATCCAAT-3' 8855
Konsensus: 5'-ACAAGTGGAGTATCCAAT-3'

```

Abbildung 3-1 Nukleotidsequenzen der konservierten Regionen CR1 und CR2 von PPV-NAT und TVMV

Nukleotide im perfekt konservierten Bereich sind groß-, die der AT-reichen Region klein gedruckt. Positionsangaben beziehen sich bei PPV-NAT auf D13751 (NCBI Genbank) und bei TVMV auf X04083 (NCBI Genbank); R = g/a, W = a/t; CP = "coat protein"; Nlb = "nuclear inclusion body b"

Die vergleichende Analyse der Genome von PPV-NAT und TVMV zeigte die größten Übereinstimmungen am 3'-Ende im Nlb- und im Hüllprotein-Cistron. Da in dieser Region auch bei natürlichen PPV-Rekombinanten die Stelle des "crossover" lokalisiert sein kann (Cervera et al., 1993; Glasa et al., 2002) und die zu untersuchenden PPV-transgenen

Pflanzen ebenfalls das Hüllprotein-Cistron als Transgen besitzen, wurden für das 3'-terminale Ende beider Viren Primer zur Identifizierung von Rekombinanten entwickelt (3.1.2).

3.1.2 Primer zur Detektion von TVMV/PPV-NAT-Rekombinanten

Der 3'-Teil des Genoms wurde unabhängig von der Lage der dort lokalisierten Cistrons in drei etwa 1000 bp große, sich überlappende Abschnitte untergliedert (Abbildung 3-2). Zur Vereinfachung der Bezeichnung wurden diese Abschnitte im Falle des PPV-NAT als P8, P9 und P10, im Falle von TVMV als T8, T9 und T10 benannt. Für jeden dieser Abschnitte wurde mit dem Programm Vector NTI ein passendes Primerpaar entwickelt. Die Sequenzen der entwickelten Primer sind am Kapitelende in Tabelle 3-2 aufgeführt.

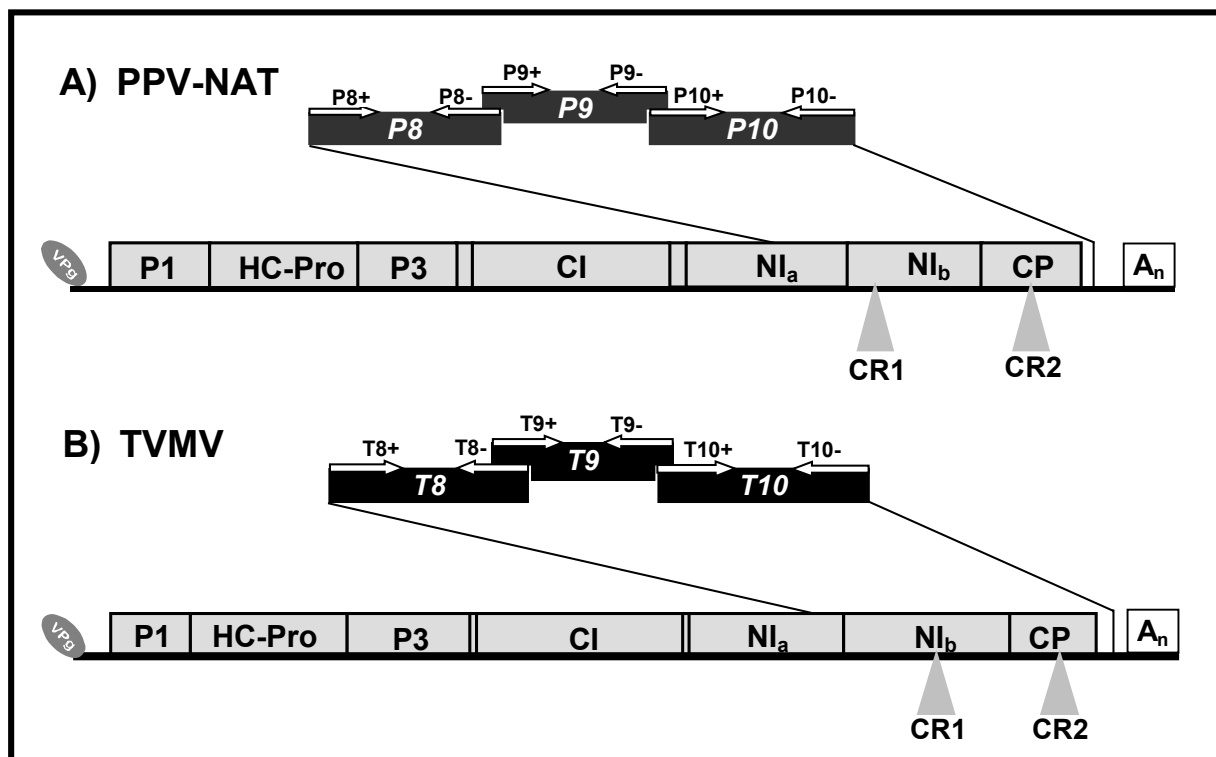


Abbildung 3-2 Graphische Darstellung der Lokalisation der Primerpaare und der zu amplifizierenden Fragmente auf dem jeweiligen 3'-terminalen Bereich der Genome von PPV-NAT (A) und TVMV (B)

Die zu amplifizierenden Fragmente sind als schwarze Boxen gekennzeichnet, die jeweiligen Primer als P8+/P8- für P8 etc. CR = konservierte Region; P1 und P3 = Protein 1 bzw. 3; HC-Pro = Helferkomponente-Protease; CI = zylindrischer Einschlusskörper; NI_a, NI_b = Kerneinschlusskörper a bzw. b; VPg = virales, genomgebundenes Protein; CP = Hüllprotein; A_n = polyA-Tail

Entsprechend der Benennung der Abschnitte erhielten die Primer zur Amplifikation von P8 die Bezeichnung P8+ ("sense"-Primer) und P8- ("antisense"-Primer) usw. Die einzelnen Primerpaare sollten nicht nur zur Amplifizierung der jeweiligen Abschnitte, sondern auch als heterologe Kombinationen (z.B. P10+/T10-) zur Identifizierung rekombinanter Sequenzen aus PPV-NAT und TVMV genutzt werden (2.2.5.4). Daher wurde beim Primerdesign der Bereich der Hybridisierungstemperatur mit 55 bis 56°C und die Länge der Oligonukleotide von 20 bis 24 Nukleotiden vorgegeben, um einen Teil der RT-PCR-Bedingungen für alle Primerkombinationen von Beginn an gleich zu gestalten. Des Weiteren wurde vorgegeben, dass alle Primer am 3'-Terminus über ein Adenin verfügen, da dies Fehlpaarungen reduzieren kann. Für alle weiteren Parameter hinsichtlich des Primerdesigns wurden die in 2.2.5.1 beschriebenen Einstellungen beibehalten.

Tabelle 3-2 Oligonukleotidprimer zur Detektion rekombinanter Potyvirussequenzen

Name	Virus	Lokalisation* [bp]	Produkt [bp]	Tm [°C]	Sequenz [5' – 3']*
P8+	PPV-NAT	6746 - 6765	1052	55,6	CGGATTACCCATCGTGAGCA
P8-	PPV-NAT	7776 - 7797		55,1	ACGGTGAGAGGGAAGTGTCAAA
P9+	PPV-NAT	7679 - 7698	1017	55,1	ATGGAGCGTTGGGATGACAA
P9-	PPV-NAT	8676 - 8695		55,0	TGAGTTGTTGCTGGCGTGAA
P10+	PPV-NAT	8557 - 8576	1129	55,1	CCAACGTTGTTGTGCACCAA
P10-	PPV-NAT	9666 - 9685		55,8	CAAGGGCCTGTGTTTCGACAA
T8+	TVMV	6884 - 6903	1023	55,4	TGGAAGTCCGCTGGTTTCAA
T8-	TVMV	7887 - 7906		55,7	TGTGAACCATCAGCATCGCA
T9+	TVMV	7643 - 7664	923	55,1	ACTAGGCGTCTGGAATGGATCA
T9-	TVMV	8543 - 8565		55,3	CCTGTTCTGCAAGGCTTCTGTAA
T10+	TVMV	8332 - 8355	1081	55,7	GGTTCATGTCTCACAGAGCACTCA
T10-	TVMV	9393 - 9412		55,5	ACGCTGCCATCCAGACAAAA

*Angaben für PPV-NAT D13751 (NCBI Genbank) und auf TVMV X04083 (NCBI Genbank)

Für die Primerpaare wurde beim Primerdesign bereits durch die Voreinstellungen des Programms Vector NTI die Möglichkeit zur Ausbildung von stabilen Dimeren und Haarnadelstrukturen ausgeschlossen. Die Kontrolle auf Dimerbildung heterologer Primerkombinationen mit dem Oligoduplexvergleich in Vector NTI ergab, dass für alle Kombinationen die Möglichkeit zur Bildung von Dimeren bestand. Jedoch wiesen diese meist Energiegehalte auf, die sich nicht im Rahmen der jeweiligen Grenzwerte (s.u.) befanden und daher vernachlässigt werden konnten. Die Kombinationen T8+/P9- bzw. T9+/P9- wiesen mit einer Basenpaarung von 4 Nukleotiden mit einem freien Energiegehalt von -4,8 kcal/mol bzw. mit

einer Paarung von 5 Basen mit $-6,2$ kcal/mol Werte auf, die den Grenzwerten noch am nächsten kamen. Die Primer wurden dennoch verwendet, da der Grenzwert der Primer/Primer-Komplementarität von weniger als -15 kcal/mol in beiden Fällen eingehalten wurde und die Basenpaarungen zudem im zentralen (T8+/P8-) bzw. im 5'-terminalen Bereich (T9+/P9+) lagen. Am 3'-terminalen Ende wären nur -3 kcal/mol toleriert worden.

3.1.3 Test der Primer unter Standardbedingungen

Die hier angewendeten Standard-PCR und -RT-PCR-Verfahren sind in 2.2.5 beschrieben. Alle in Abschnitt 3.1.3 aufgeführten Ergebnisse einer RT-PCR wurden mit RNA erzielt, die nach der Methode von Verwoerd et al. (1989) isoliert wurde (2.2.3.1). Hierfür wurden *N. benthamiana* Pflanzen mit den Presssäften, bzw. mit einem Gemisch aus Presssäften PPV-NAT- und TVMV-einzelinfizierter *N. benthamiana* Pflanze mechanisch inokuliert (2.2.21).

Die für das Nachweisverfahren entwickelten Primer wurden zunächst Paare mit den Sequenzen getestet, von welchen sie abgeleitet wurden. Zu Beginn wurde die beim Primerdesign vorgesehene Hybridisierungstemperatur von 56°C in einer Standard-PCR mit der *Taq*-Polymerase der Firma Peqlab über einen Temperaturgradienten von 50°C bis 65°C überprüft. Wie Abbildung 3-3 am Beispiel der Primerkombination P10+/P10- zeigt, konnte bei der Verwendung von Plasmid-DNA des PPV-NAT-"full-length"-Klons p35PPV-NAT das entsprechende Fragment (1129 bp) mit steigender Temperatur bis einschließlich 65°C amplifiziert werden. Dagegen wurde kein Fragment amplifiziert, wenn die Plasmid-DNA des TVMV-"full-length"-Klons pXBS7 verwendet wurde.

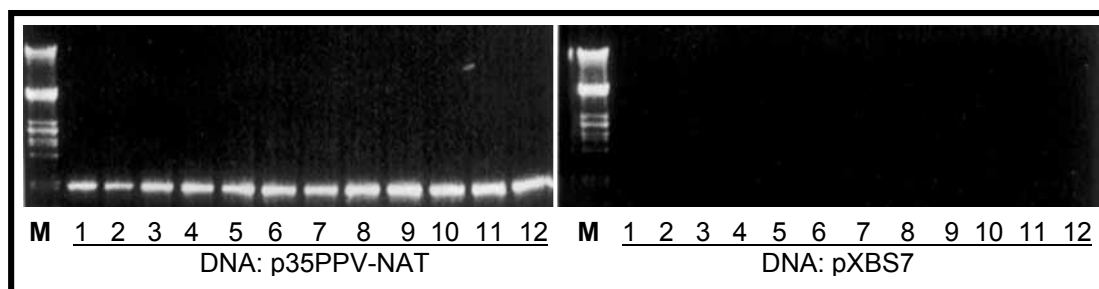


Abbildung 3-3 Temperaturgradient für das Primerpaar P10+/P10-

Amplifikationsprodukte des Primerpaares P10+/P10- (1129 bp) mit Plasmid-DNA von p35PPV-NAT bzw. pXBS7 als Matrize über einen Temperaturgradienten von 15°C . M = λ DNA, *Pst*I verdaut; Temperaturen: 1: 50°C ; 2: $50,4^{\circ}\text{C}$; 3: $51,2^{\circ}\text{C}$; 4: $52,5^{\circ}\text{C}$; 5: $54,2^{\circ}\text{C}$; 6: $56,4^{\circ}\text{C}$; 7: $58,9^{\circ}\text{C}$; 8: $61,0^{\circ}\text{C}$; 9: $62,7^{\circ}\text{C}$; 10: $63,9^{\circ}\text{C}$; 11: $64,7^{\circ}\text{C}$; 12: $65,0^{\circ}\text{C}$

In gleicher Weise erfolgte ein Test für alle übrigen Primerkombinationen sowohl auf der Ziel- als auch auf der cDNA-Sequenz des jeweils anderen Virus, um die Spezifität zu überprüfen. Für diesen Zweck wurde wieder jedes der Primerpaare in einer Standard-PCR eingesetzt. Als Matrize für jedes Paar wurde sowohl der "full-length"-Klon p35PPV-NAT als auch pXBS7 verwendet. Aufgrund der in Abbildung 3-3 gemachten Beobachtungen wurde eine etwas höhere Hybridisierungstemperatur von 58°C überprüft und nachfolgend für sämtliche Primerkombinationen übernommen (Abbildung 3-4, A).

Wie Abbildung 3-4 (A) zeigt, können die Primerpaare spezifisch das jeweilige Fragment amplifizieren, von dem sie abgeleitet wurden. Fehlerhafte Amplifikationen von heterologen Matrizen wurden auch in Wiederholungsexperimenten nicht beobachtet. Für die weiteren in Abschnitt 3.1.3 aufgeführten Versuche wurde daher entgegen der ursprünglich vorgegebenen Temperatur von 56°C die leicht erhöhte Hybridisierungstemperatur von 58°C beibehalten.

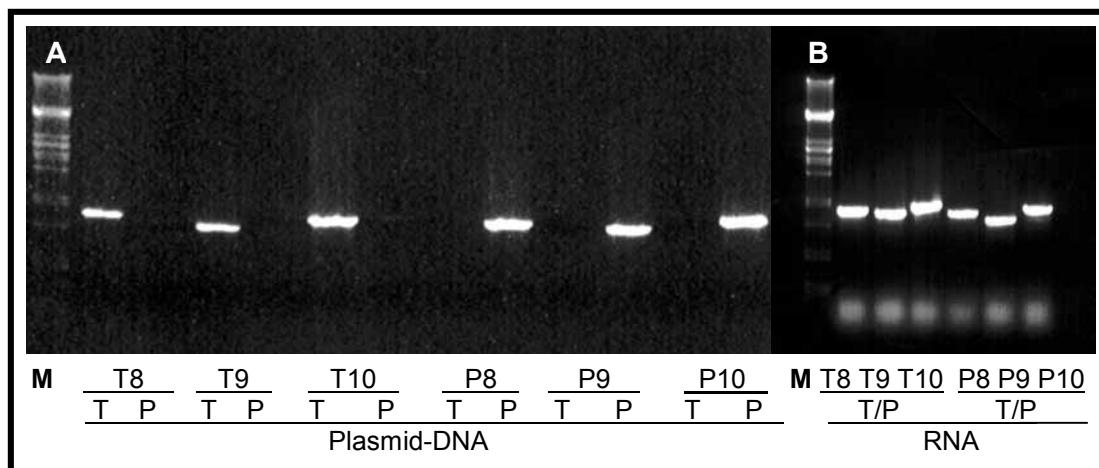


Abbildung 3-4 Überprüfung der Primerpaare mittels Standard-PCR und -RT-PCR

Amplifikationsprodukte der Primerpaare (T8+/T8- vereinfacht bezeichnet als T8; analog T9, T10, P8, P9 und P10). Als Matrize für die Reaktion diente in (A) Plasmid-DNA von p35 PPV-NAT (P) bzw. pXBS7 (T). In (B) wurde als Matrize RNA aus einer TVMV/PPV-NAT-mischinfizierten Pflanze (T/P) verwendet. M = λ DNA, *Pst*I verdaut

Eine weitere Überprüfung der entwickelten Primerpaare erfolgte mit RNA aus PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten *N. benthamiana* Pflanzen. Hierfür wurden in einer Standard-RT-PCR die Enzyme AMV-RT (Promega) und *Taq*-Polymerase (Peqlab) verwendet. Wie Abbildung 3-4 (B) zeigt, konnten die jeweiligen Fragmente aus einer Mischung beider Matrizen amplifiziert werden. Darüber hinaus erfolgte die Testung der Primerpaare mit RNA aus gesunden *N. benthamiana* Pflanzen. Hierbei wurden keine Fragmente amplifiziert.

In der Testphase wurden alle 18 möglichen Primerpaarungen in heterologen Kombinationen gemäß Tabelle 3-3 (siehe auch 2.2.5.4) in einer Standard-RT-PCR-Reaktion mit den o.g. Enzymen angewendet um Spezifität bzw. mögliche Fehlpaarungen zu überprüfen.

Tabelle 3-3 Heterologe Primerkombinationen*

"sense" Primer	"antisense" Primer		
P8+	T8-	T9-	T10-
P9+	T8-	T9-	T10-
P10+	T8-	T9-	T10-
T8+	P8-	P9-	P10-
T9+	P8-	P9-	P10-
T10+	P8-	P9-	P10-

*Jeder "sense"-Primer wird in drei Kombinationen mit jeweils einem der drei "antisense"-Primer des anderen Virus getestet.

Die Überprüfung der heterologen Primerkombinationen mit RNA aus nicht-infizierten bzw. mit RNA aus PPV-NAT- oder TVMV-einzelinfizierten *N. benthamiana* Pflanzen ergab keine Amplifikationsprodukte.

Die Ergebnisse einer Standard-RT-PCR mit heterologen Primerkombinationen und RNA aus PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten Pflanzen sind in Abbildung 3-5 dargestellt.

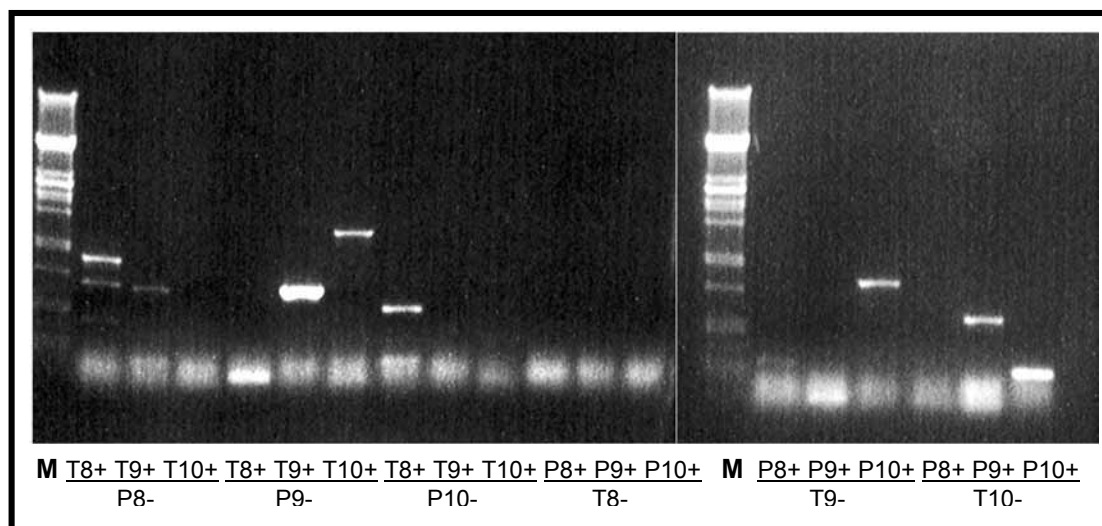


Abbildung 3-5 Standard-RT-PCR mit heterologen Primerkombinationen und RNA aus PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten Pflanzen

Amplifikationsprodukte heterologer Primerpaare. Als Paare wurde immer ein PPV-NAT-Primer mit einem TVMV-Primer verwendet; entsprechend sind die "sense"-Primer in der oberen, die "antisense"-Primer in der unteren Zeile aufgeführt. Als Matrize für die Reaktion diente RNA aus einer PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten Pflanze. M = λ DNA, *Pst*I verdaut

Mit den Kombinationen T8+/P8-, T9+/P8-, T9+/P9-, T10+/P9-, T8+/P10-, P10+/T9-, P9+/T10- und P10+/T10- wurden Fragmente erhalten. Eine Wiederholung dieses Versuchs zeigte Fragmente bei den Kombinationen P9+/T8- (ca. 200 bp), P10+/T8- (ca. 300 bp), T9+/P8- (ca. 350), T10+/P8- (ca. 200 bp, 350 bp), P9+/T9- (ca. 800 bp), T10+/P9- (ca. 300 bp), T9+/P10- (ca. 900 bp) und T10+/P10- (ca. 350 bp). In einer weiteren Wiederholung des Versuchs mit RNA aus einer anderen PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten Pflanze, wurde mit den Kombinationen T10+/P8- (ca. 300 bp), P9+/T9- (ca. 800 bp), P10+/T9- (ca. 400 bp) und T10+/P10- (ca. 350 bp) Fragmente amplifiziert.

Die Anwendung der heterologen Primerkombinationen mit einem RNA-Mix aus PPV-NAT- und TVMV-einzelinfizierten *N. benthamiana* Pflanzen ergab ebenfalls Amplifikationsprodukte für die Kombinationen T8+/P8- (ca. 1000 bp), T9+/P8- (ca. 100 bp), T10+/P8- (ca. 200 bp, 650 bp), T9+/P10- (ca. 800 bp), P10+/T9- (ca. 300 bp) und P10+/T10- (ca. 350 bp) (Abbildung 3-6).

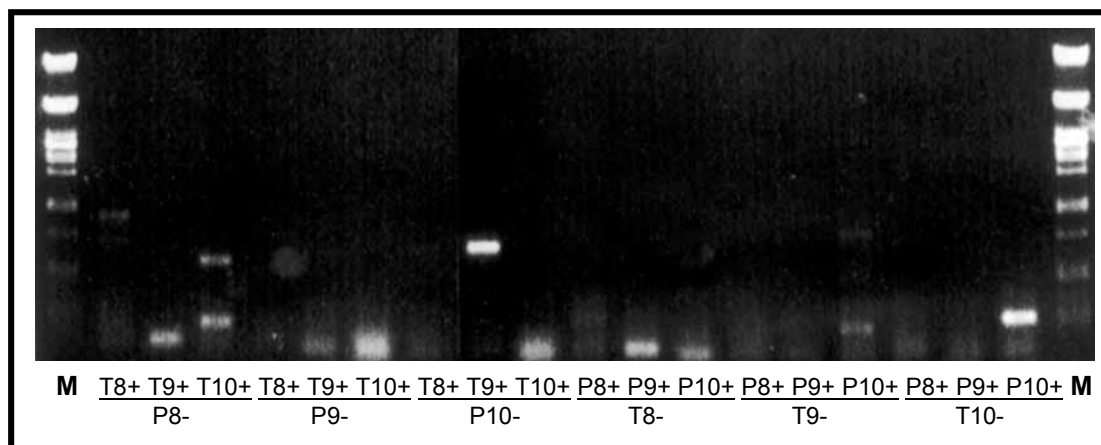


Abbildung 3-6 Standard-RT-PCR mit heterologen Primerkombinationen und RNA aus PPV-NAT- und TVMV-einzelinfizierten Pflanzen

Amplifikationsprodukte heterologer Primerpaare. Als Paare wurde immer ein PPV-NAT-Primer mit einem TVMV-Primer verwendet; entsprechend sind die "sense"-Primer in der oberen, die "antisense"-Primer in der unteren Zeile aufgeführt. Als Matrize für die Reaktion diente ein RNA-Mix aus TVMV- und PPV-NAT-einzelinfizierten Pflanzen. M = λ DNA, *Pst*I verdaut

Bei einer weiteren Überprüfung der heterologen Primerkombinationen in einer Standard-PCR mit einem DNA-Mix von p35PPV-NAT/pXBS7 zeigte sich, dass bei T9+/P10- ein deutliches Fragment von ca. 800 bp amplifiziert wurde. Des Weiteren wurden hierbei auch Fragmente mit den Kombinationen T9+/P8- (ca. 200 bp), T10+/P8- (ca. 500 bp) und P9+/T9- (ca. 700 bp, 1700 bp) amplifiziert.

Die entwickelten Primerpaare konnten unter Standardbedingungen zwar zuverlässig die jeweiligen Fragmente amplifizieren, jedoch kam es bei Verwendung der heterologen

Kombinationen mit Nukleinsäuregemischen auch zur Amplifikation von Fragmenten. Dies deutete darauf hin, dass entweder Fehlpaarungen der Primer oder *in vitro*-Rekombinationen durch einen Matrizenwechsel der Polymerasen stattgefunden hatten. Es musste daher eine Optimierung der RT-PCR zur Eliminierung dieser Fehler durchgeführt werden.

3.1.4 Optimierung der RT-PCR

In Versuchen zur Rekombination bei Cucumoviren konnte mit dem Reaktionskit "SuperScript™ II One-Step RT-PCR mit Platinum® Taq" der Firma Invitrogen (im Folgenden vereinfacht Invitrogen Kit genannt) erfolgreich das Auftreten von *in vitro*-Rekombinationen durch die Reverse Transkriptase minimiert werden (Dr. M. Tepfer, pers. Mitteilung). Da es unter Standard-RT-PCR Bedingungen wiederholt zu Artefakten kam, wurde für weitere Versuche ebenfalls auf das Invitrogen Kit zurückgegriffen, um mögliche *in vitro*-Rekombinationsereignisse von vornherein zu unterbinden. Die in Abschnitt 3.1.3 beschriebene Hybridisierungstemperatur wurde vorerst nicht modifiziert. Die RT-PCR wurde zunächst weitgehend den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

Der Empfehlung folgend wurde zunächst die MgSO_4 -Konzentration eingestellt. Die über den 2x Reaktionspuffer voreingestellte Mg^{2+} -Konzentration von 1,2 mM wurde durch die Zugabe von MgSO_4 (50 mM) variiert. Der MgSO_4 -Gradient wurde mit der Primerkombination T10+/T10- beispielhaft überprüft. Dabei reichte die MgSO_4 -Konzentration im Reaktionsansatz von 1,2 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM bis 5 mM (Abbildung 3-7).

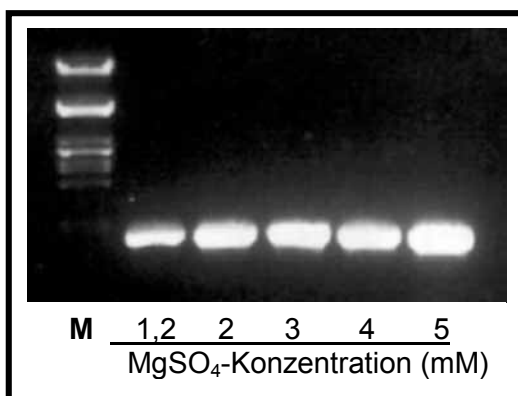


Abbildung 3-7 MgSO_4 -Gradient mit T10+/ T10- in einer RT-PCR (Invitrogen Kit)

Angabe der MgSO_4 -Konzentration im Endvolumen des Reaktionsansatzes; M = λ DNA, PstI verdaut

Wie Abbildung 3-7 zeigt, wird lediglich bei der Ausgangskonzentration mit 1,2 mM MgSO_4 das erwartete Fragment etwas weniger stark amplifiziert. Unterschiede in den weiteren Ansätzen sind dagegen kaum erkennbar. Für das weitere Vorgehen wurde eine

Konzentration von 2 mM im Reaktionsvolumen beibehalten und folgender Reaktionsansatz in Verbindung mit dem RT-PCR-Programm verwendet (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4 RT-PCR-Reaktionsansatz und Programm mit dem Invitrogen Kit zu Beginn der Optimierung

Reaktions- mix	Menge [μ l]	Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit	Zyklus	
					fortsetzen	Wiederholung
<i>A. bidest.</i>	9,2	1	45	30'		
2x Puffer	12,5	2	94	2'		
MgSO ₄	0,8	3	94	15"		
Primer 1	0,5	4	58	30"		
Primer 2	0,5	5	72	1' 30"	bei 3	34x
RT/ <i>Taq</i> Mix	0,5	6	72	10'		
RNA	1	7	4	∞		
Σ	25					

Die Primerpaare wurden unter den neuen Bedingungen zunächst mit RNA aus PPV-NAT- und TVMV-einzelfinanzierten *N. benthamiana* Pflanzen getestet. Dabei konnte mit jedem Primerpaar das jeweilige spezifische Fragment amplifiziert werden.

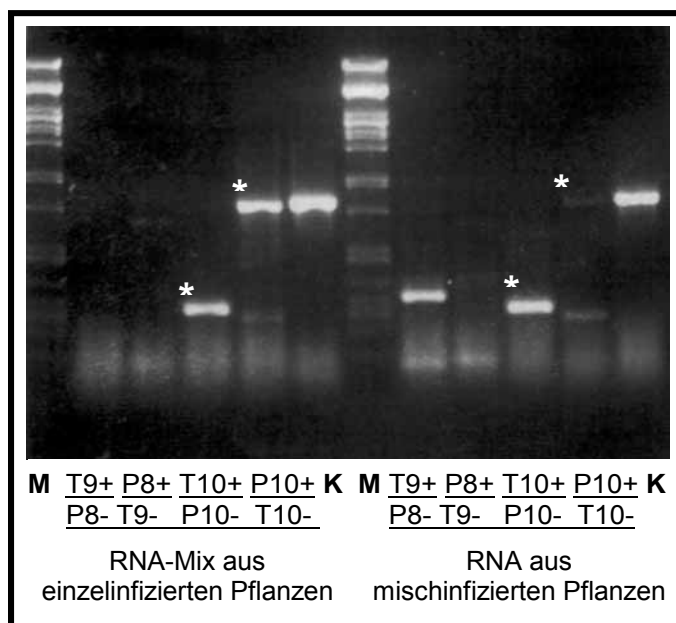


Abbildung 3-8 RT-PCR mit heterologen Primerkombinationen (Invitrogen Kit)

M = λ DNA, *Pst*I verdaut; K = T9+/T9-; * = Fragmente zur Reamplifikation verwendet

Während unter Standardbedingungen alle theoretisch möglichen, heterologen Primerkombinationen überprüft wurden, erfolgte mit dem Invitrogen Kit ein Test von Kombinationen, welche die konservierten Regionen CR1 und CR2 als mögliche Orte für Rekombinationsereignisse flankieren (3.1.1; T9+/P8-, P8+/T9-, T10+/P10- und P10+/T10-). Hierfür wurde ein RNA-Mix aus PPV-NAT- und TVMV-einzelinfizierten *N. benthamiana* Pflanzen bzw. RNA aus mischinfizierten *N. benthamiana* Pflanzen verwendet (Abbildung 3-8).

Wie aus Abbildung 3-8 ersichtlich ist, wurden unabhängig von den verwendeten Matrizen (RNA-Mix aus einzelinfizierten oder RNA aus mischinfizierten Pflanzen) Fragmente amplifiziert. Im Falle des RNA-Mixes wurden bei den Varianten T10+/P10- (ca. 200 bp) und P10+/T10- (ca. 900 bp) Amplifikationsprodukte sichtbar. Deutlich erkennbare Fragmente wurden bei Verwendung von RNA aus einer mischinfizierten *N. benthamiana* Pflanzen bei den Kombinationen T9+/P8- (ca. 300 bp), T10+/P10- (ca. 250 bp) amplifiziert. Zwei weniger deutlich erkennbare Fragmente sind bei der Kombination P10+/T10- (ca. 150 bp und ca. 900 bp) zu erkennen.

Die in Abbildung 3-8 mit * gekennzeichneten Fragmente wurden mit den Primern T10sAsc/P10asXba bzw. P10sAsc/T10asXba, wie in 2.2.5.3 beschrieben, reamplifiziert. Die Reamplifikation war, auch in der Wiederholung, nur mit den jeweils kleineren Produkten erfolgreich. Die Fragmente wurden mittels Restriktionsverdau (*AscI/XbaI*) in den Vektor pBSCAscI kloniert und sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass in beiden Fällen der "antisense"-Primer P10- unspezifisch gebunden hatte. Dieser hatte auf der RNA des TVMV-Genoms im Bereich 8279 bp bis 8288 bp gebunden, was in Kombination mit T10+ zur Amplifikation eines 230 bp großen Fragmentes führte.

Aufgrund des wiederholten Auftretens von Artefakten in den vorangegangenen Versuchen, erfolgte eine weitere Überprüfung der heterologen Primerkombination. Dafür wurde erneut eine Temperaturgradienten-RT-PCR durchgeführt. Der Gradient reichte von 58°C bis 68°C. Als Matrize für die RT-PCR wurde ein RNA-Mix aus PPV-NAT- und TVMV-einzelinfizierten *N. benthamiana* Pflanzen verwendet. Es wurde ermittelt, dass Artefakte bei einer Hybridisierungstemperatur von 64°C nicht mehr amplifiziert wurden. Dementsprechend wurde die in Tabelle 3-4 programmierte Hybridisierungstemperatur auf 64°C angehoben.

Es bestand die Möglichkeit, dass durch die auf Phenol/Chloroform/Li-Acetat-Fällung basierenden RNA-Extraktionsmethode von Verwoerd et al. (1989) sehr kleine RNAs mit isoliert wurden und diese in der RT-PCR das Auftreten von Artefakten förderten. Es wurde daher die auf Silica basierende Methode von Menzel et al. (2002) für die RNA-Isolierung angewendet, da Silica kleine RNAs (< 100 nt) nicht bindet (Hamilton et al., 2002). Aus diesem Grunde wurde im Reaktionsansatz auch die Menge an eingesetzter RNA von 1 µl auf 2 µl angehoben. Bei der Wahl dieser Reaktionsbedingungen hat sich eine herabgesetzte Zykluszahl von 26 als ausreichend zur Amplifikation erwiesen. Nach Informationen von Dr. I.

Fernandez (pers. Mitteilung) über Methoden zur Eliminierung von Artefakten in RT-PCR-Reaktionen mit dem Invitrogen Kit wurde zusätzlich die Menge an eingesetztem Enzym von 0,5 auf 0,3 µl reduziert und die Primermenge angehoben (Tabelle 3-5). Eine entsprechende Modifikation des RT-PCR-Programms und des Reaktionsansatzes wurde vorgenommen (siehe Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5 RT-PCR-Reaktionsansatz und Programm mit dem Invitrogen Kit nach der Optimierung

Reaktions- mix	Menge [µl]	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklus	
					fortsetzen	Wiederholung
<i>A. bidest.</i>	7,4	1	45	30'		
2x Puffer	12,5	2	94	2'		
MgSO ₄	0,8	3	94	15"		
Primer 1	1	4	64	30"		
Primer 2	1	5	72	1' 30"	bei 3	25x
RT/ <i>Taq</i> Mix	0,3	6	72	10'		
RNA	2	7	4	∞		
Σ	25					

Wie in Abbildung 3-9 für die Primerkombinationen T8+/P8-, P8+/T8-, T10+/P10- und P10+/T10- dargestellt, wurde unter optimierten RT-PCR-Bedingungen die Amplifikation falsch positiver Fragmente unterdrückt. Die Positivkontrolle zeigte zudem, dass die RT-PCR auch bei der stark erhöhten Hybridisierungstemperatur von 64°C durchführbar ist. Dies wurde für alle Primerpaare (Tabelle 3-2) bestätigt. In weiteren Versuchen zeigte sich auch, dass bei der erhöhten Hybridisierungstemperatur auf die Zugabe der in Tabelle 3-5 angegebenen MgSO₄-Menge nicht verzichtet werden konnte, da sonst die erwarteten Fragmente nicht mehr zuverlässig amplifiziert werden konnten. Allerdings kam es in unregelmäßigen Abständen (siehe auch 3.1.5) bei der Kombination T10+/P10- zur Amplifikation eines Fragmentes. Da es sich jedoch immer um ein Fragment handelte, das der Größe des Fragments entsprach, dessen Entstehen bereits charakterisiert wurde (s.o.), erfolgte keine weitere Optimierung der RT-PCR-Bedingungen oder Entwicklung neuer Primer.

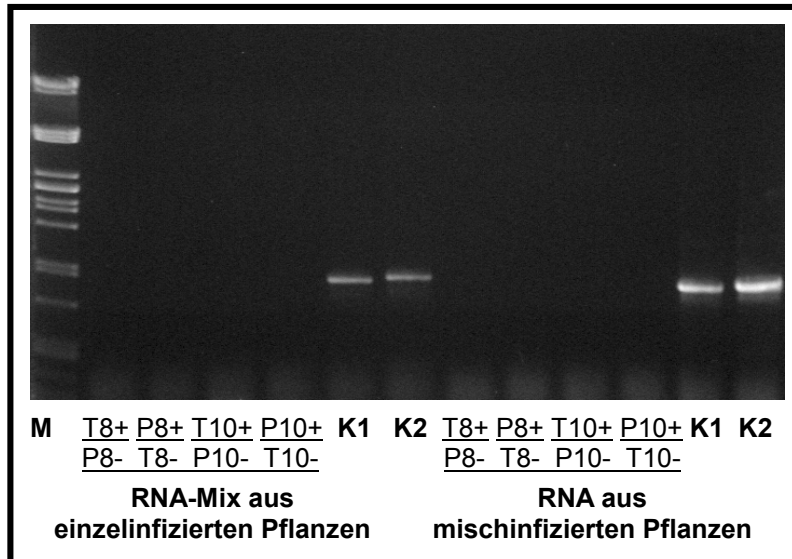


Abbildung 3-9 RT-PCR mit heterologen Primerkombinationen mit dem Invitrogen Kit unter optimierten Bedingungen (Tabelle 3-5)

M = λ DNA, *Pst*I verdaut; K1 = T10+/T10-; K2 = P10+/P10-

Es konnte ein RT-PCR-System für die Detektion von rekombinanten PPV-NAT/TVMV-Sequenzen entwickelt werden, mit dem die Elternviren in Einzel- und Mischinfektionen identifiziert werden können. Zudem konnte das System soweit verbessert werden, dass das Auftreten von Artefakten unterdrückt wurde.

3.1.5 Detektionsgrenze des Nachweisverfahrens

Da unbekannt ist, in welcher Quantität rekombinante Viren in Mischinfektionen auftreten, sollte ermittelt werden, wie sensitiv das in Kapitel 3.1.4 entwickelte RT-PCR-Verfahren ist. Für diesen Zweck wurde ein Plasmid mit rekombinanter PPV-NAT/TVMV-Sequenz hergestellt, um mit einer heterologen Primerkombination die Detektionsgrenze zu ermitteln, mit der diese Sequenz in RNA aus einer Mischinfektion nachzuweisen ist.

3.1.5.1 Klonierung eines Plasmids mit chimärer PPV-NAT/TVMV-Sequenz

Für die Überprüfung des Detektionslimits der entwickelten RT-PCR wurde eine künstliche chimäre Sequenz aus PPV-NAT und TVMV hergestellt, die mit dem heterologen Primerpaar T10+/P10- zu detektieren ist.

Im Folgenden ist die Klonierung von pTBrec10TP beschrieben, einem Plasmid mit einer chimären PPV-NAT/TVMV-Sequenz unter Kontrolle eines T7-Promoters bestehend aus einer TVMV-Sequenz (N1b) am 5'-Ende und PPV-NAT-Fragment (CP, 3'-NTR) am 3'-Ende.

1. Klonierung eines TVMV-Fragments in pTrueBlue

Ein Fragment aus dem TVMV-"full-length"-Klon pXBS7 wurde nach einem Restriktionsverdau mit *EcoRI/BamHI* in den ebenfalls mit *EcoRI/BamHI* verdauten Klonierungsvektor pTrueBlue eingefügt. Das entstandene Plasmid erhielt den Namen pTBrec10T (Abbildung 3-10, A).

2. Klonierung eines Plasmids mit einer PPV-NAT/TVMV-Sequenz (pTBrec10TP)

Nach einem Restriktionsverdau mit *EcoRI/SacI* wurde das entsprechende *EcoRI/SacI*-Fragment aus pNEB193PPVBamHI/NotI3' in pTBrec10T kloniert (pTBrec10TP; Abbildung 3-10, B).

3.1.5.2 Bestimmung der Nachweisgrenze von pTBrec10TP-Transkripten

Für die Evaluierung der Nachweisgrenze wurde das unter 3.1.5.1 beschriebene Plasmid pTBrec10TP verwendet. Das 753 bp große Fragment der chimären Sequenz konnte von dem heterologen Primerpaar T10+/P10- in einer Standard-PCR nachgewiesen werden. Daraufhin wurde die Nachweisgrenze in der optimierten RT-PCR (Tabelle 3-5) ermittelt. Hierfür wurde pTBrec10TP durch einen Restriktionsverdau mit *PvuII* linearisiert und für die Herstellung von RNA-Transkripten unter der Verwendung einer T7-Polymerase verwendet. Nach der Bestimmung des RNA-Gehalts wurde diese in *A. bidest.* verdünnt und in einer RT-PCR mit dem Invitrogen Kit (Tabelle 3-5) und den Primern T10+/P10- eingesetzt.

In der Verdünnungsreihe mit *A. bidest.* (Abbildung 3-11) war zu erkennen, dass im Bereich 100 ng bis 100 pg deutlich das erwartete 753 bp große Fragment der chimären PPV-NAT/TVMV-Sequenz amplifiziert wurde. Dieses Fragment konnte auch noch in der Verdünnungsstufe 10 pg und weniger deutlich bei 1 pg amplifiziert werden. Ein Fragment in der Verdünnungsstufe bei 100 fg war nicht immer reproduzierbar.

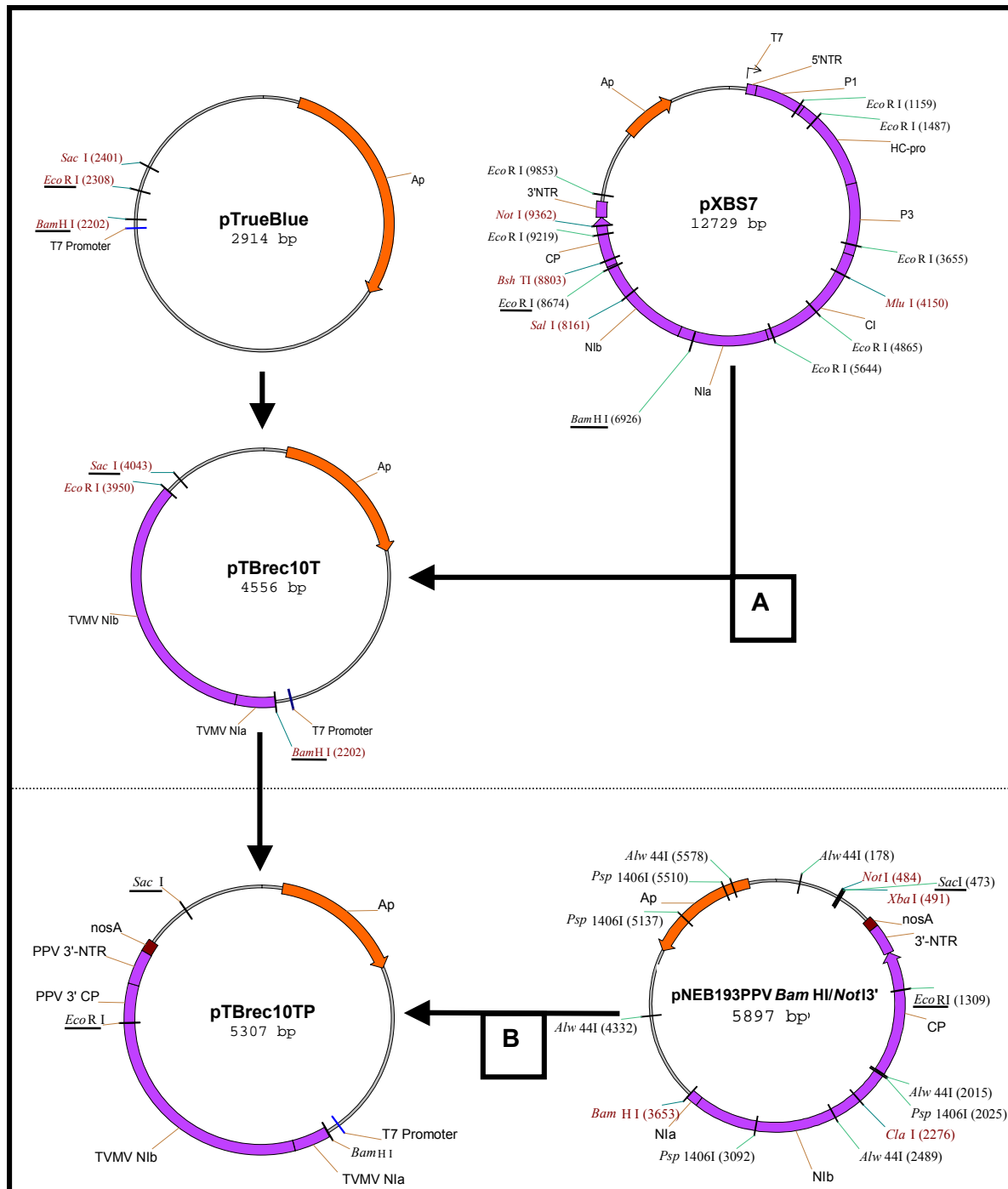


Abbildung 3-10 Klonierung des Kontrollplasmids pTBrec10TP

Offene Leseraster sind als Pfeil dargestellt; Ap = Ampicillinresistenz; T7 = T7-Promoter; P1 und P3 = Protein 1 bzw. 3; HC-Pro = Helferkomponente-Protease; CI = zylindrischer Einschlusskörper; NI_a, NI_b = Kerneinschlusskörper a bzw. b; VPg = virales, genomgebundenes Protein; CP = Hüllprotein; weitere Erläuterungen siehe Text Schritte 1 und 2 in 3.1.5.1

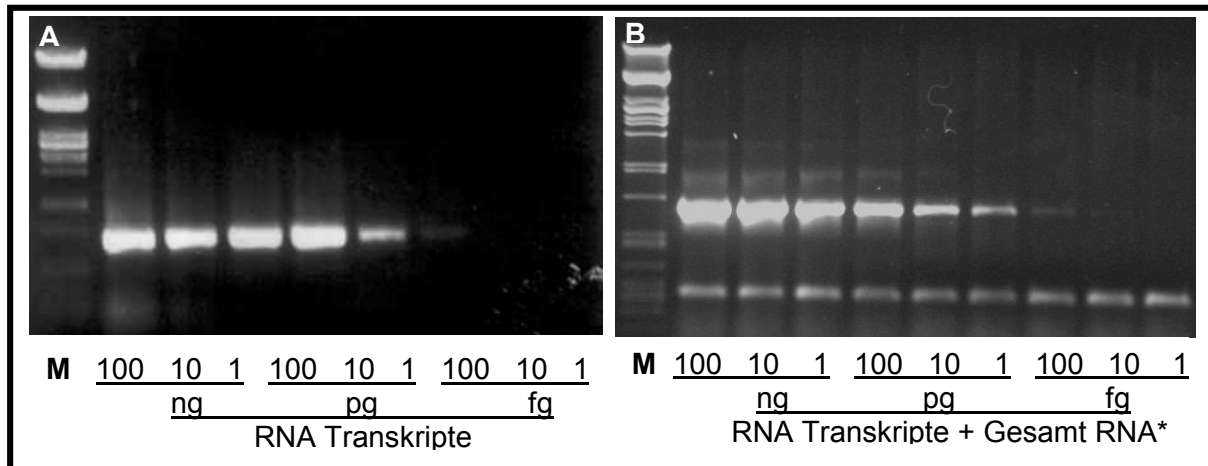


Abbildung 3-11 Detektionsgrenze von pTBrec10TP-Transkripten in *A. bidest.* (A) bzw. in Gegenwart von Gesamt-RNA aus mischinfizierten Pflanzen (B) in einer RT-PCR mit den Primern T10+/P10-

*RNA stammt aus PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten *N. benthamiana* Pflanzen, pro Ansatz ca. 2 µg Gesamt-RNA; der Anteil von Virus-RNA an der Gesamt-RNA beträgt nicht mehr als etwa 10% (ca. 0,2 µg); M = λ DNA, PstI verdaut

Eine weitere Verdünnungsreihe von pTBrec10TP-Transkripten wurde vorgenommen und in Kombination mit RNA aus PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten *N. benthamiana* Pflanzen für den RT-PCR-Nachweis (Invitrogen Kit) verwendet (Abbildung 3-11). Das erwartete Fragment wurde in den Verdünnungsstufen 100 bis 1 pg deutlich, bei 100 bis 10 fg schwächer, amplifiziert. Bei 1 fg war dieses Fragment auf dem Agarosegel nicht mehr zu erkennen. Es zeigte sich in diesem Versuch, dass aber nicht nur das chimäre PPV-NAT/TVMV-Fragment, sondern auch ein weiteres Fragment in allen Verdünnungsstufen gleichstark amplifiziert wurde. Da es sich hierbei mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um das bereits in Abschnitt 3.1.4 identifizierte, ca. 230 bp großes Fragment handelte, wurde von einer weiteren Bestimmung der Nukleotidsequenz abgesehen.

Legt man bei der Gesamt RNA-Extraktion einen Anteil der parentalen PPV-NAT- bzw. TVMV-RNA (Genomgröße vereinfacht 10 kb) von 10% zugrunde, so ergibt sich für die hier beschriebene Nachweisgrenze von 100 fg die Möglichkeit zur Detektion von einer rekombinanten Sequenz unter 1×10^6 parentalen Molekülen.

3.1.6 Untersuchung von PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten nicht-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen

Für die Inokulation von nicht-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen wurden aus TVMV- bzw. PPV-NAT-einzelinfizierten Pflanzen Presssäfte hergestellt, in gleichen Mengenverhältnissen

gemischt und wie in Kapitel 2.2.21 beschrieben mechanisch auf gesunde *N. benthamiana* Pflanzen aufgerieben. Es wurden 100 *N. benthamiana* Pflanzen mischinfiziert. Nach dem Auftreten von systemischen Symptomen wurde Gesamt-RNA nach der in 2.2.3.2 beschriebenen Methode isoliert. Für den RT-PCR-Nachweis wurden zur Reduzierung des Probenumfangs die Proben von jeweils fünf Pflanzen zu einer Probe zusammengefasst. Beim Auftreten von einer rekombinanten Sequenz hätten dann die entsprechenden dazugehörigen Pflanzen gesondert untersucht und auf die betreffende Pflanze zurückgeschlossen werden können. Die Proben wurden entsprechend der Angaben in 3.1.4 mit den in Tabelle 3-6 aufgeführten Primerkombinationen untersucht. Die Primerauswahl, die in Tabelle 3-6 getroffen wurde, beinhaltet die Primerkombinationen, welche die konservierten Regionen CR1 und CR2 bzw. die Übergangsregion von Nlb und Hüllprotein flankieren. Auf die Kombinationen P8+/T10- und T8+/P10- wurde aufgrund der Länge der zu amplifizierenden Fragmente (ca. 2500 bp bzw. ca. 3000 bp) verzichtet. Bei den Primerkombinationen, bei welchen das zu erwartende Fragment größer als 1200 bp war, wurde die Elongationszeit entsprechend auf 2 Minuten heraufgesetzt.

Tabelle 3-6 Primerkombinationen zur Detektion rekombinanter PPV-NAT/TVMV-Sequenzen in nicht-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen

"sense" Primer	"antisense" Primer			geschätzte Größe rekombinanter Fragmente [bp]		
P8+	T8-	T9-	–	1000	1700	–
P9+	–	T9-	T10-	–	800	1800
P10+	–	–	T10-	–	–	900
T8+	P8-	P9-	–	1000	1900	–
T9+	–	P9-	P10-	–	1200	1900
T10+	–	P9-	P10-	–	500	1200

Wie in Abbildung 3-12 anhand der Probenauswahl 1 bis 16 mit den Primerkombinationen T9+/P9- und T10+/P9- demonstriert wird, konnten keine rekombinanten Sequenzen gefunden werden. Dies traf auch auf die verbleibenden vier Proben zu, die separat kontrolliert wurden, bzw. die Wiederholung des Versuchs. Die Verwendung der Primerkombinationen T8+/T8- und P8+/P8- als Positivkontrolle zeigte, dass die Reaktionsbedingungen zur Amplifikation einwandfrei waren und PPV-NAT- sowie TVMV-RNA amplifiziert werden konnte. Als Kontroll-RNA wurde eine der 20 Proben zufällig ausgewählt. Auch mit Hilfe der verbleibenden Primerkombinationen aus Tabelle 3-6 konnten keine rekombinanten Fragmente amplifiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass keine PPV-

NAT/TVMV-Rekombinanten auftraten oder dass evtl. aufgetretene Rekombinante nicht detektiert wurden.

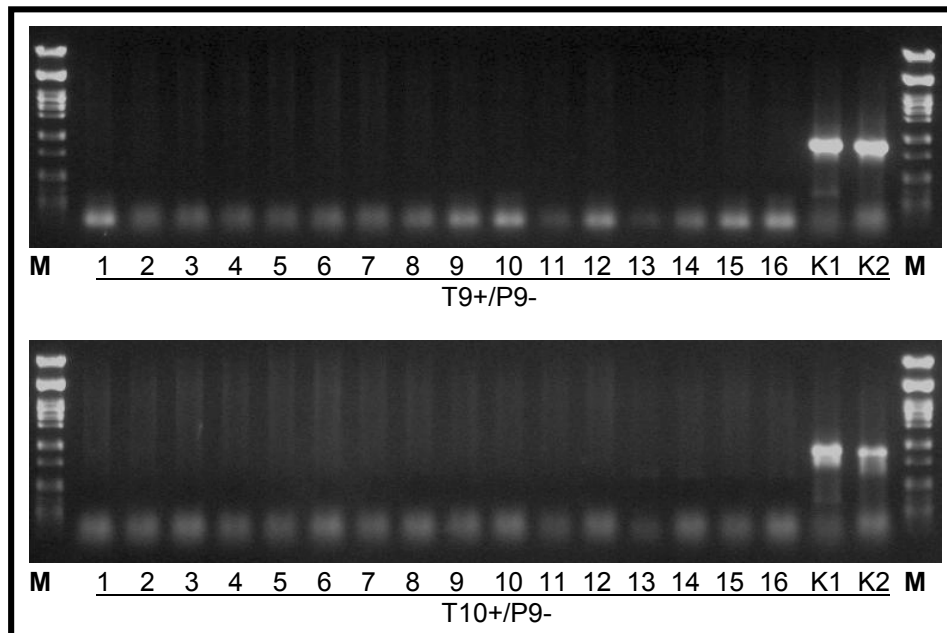


Abbildung 3-12 Versuch der Detektion rekombinanter PPV-NAT/TVMV-Sequenzen in PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten, nicht-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen

Dargestellt ist die Untersuchung von je 16 RNA-Proben aus PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten *N. benthamiana* mit den Primerpaaren T9+/P9- bzw. T10+/P9- (erwartete Banden: ca. 1200 bp bzw. 500 bp). M = λ DNA, *Pst*I verdaut; K1 = T8+/T8-; K2 = P8+/P8-

3.1.7 Untersuchung von TVMV-infizierten PPV-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen

Es wurden je 64 PPV-transgene *N. benthamiana* Pflanzen der Linien 17.27.4 und 4.30.45 mit TVMV inokuliert. Nach dem Sichtbarwerden systemischer Infektionen wurde RNA wie in 2.2.3.2 beschrieben isoliert, wobei zur Reduktion des Probenumfangs je 2 Proben zu einer Probe zusammengefasst wurden. Die Proben wurden mit den in Tabelle 3-7 aufgeführten Primerkombinationen untersucht. Die Auswahl der Kombinationen beinhaltete Primer, die den Übergang zwischen Hüllprotein und NIb flankieren bzw. auf dem Transgen lokalisiert sind. D.h. P10- konnte nur bei *N. benthamiana* 4.30.45 eingesetzt werden, weil die entsprechende Region nicht bei *N. benthamiana* 17.27.4 vorhanden war. Analog konnte auch P10+ nur bei 17.27.4 verwendet werden. Die Primer P8+, P8- und P9+ konnten ebenfalls nicht eingesetzt werden, da die entsprechenden komplementären Sequenzen nicht im Transgen vorhanden waren. T9- wurde ebenfalls nicht verwendet, da dieser Primer im

Nlb lokalisiert ist und daher mit keinem der PPV-NAT "sense"-Primer ein Fragment hätte amplifiziert werden können. Als Positivkontrolle für die Anwesenheit von TVMV-RNA wurde T8+/T8-, bzw. für die Anwesenheit des jeweiligen Transgens die PPV-Detektionsprimer PPVdet1/PPVdet2 verwendet. Es wurden die unter 3.1.4 beschriebenen RT-PCR-Bedingungen gewählt und bei erwarteten Fragmenten von mehr als 1200 bp eine längere Elongationszeit (2 Minuten) gewählt.

Tabelle 3-7 Primerkombinationen zur Detektion rekombinanter PPV-NAT/TVMV-Sequenzen in PPV-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen

"sense" Primer	"antisense" Primer	Pflanzenlinie	geschätzte Größe rekombinanter Fragmente [bp]
T9+	P9-	<i>N. benthamiana</i> 17.27.4	1150
P10+	T10-	<i>N. benthamiana</i> 17.27.4	750
T9+	P9-	<i>N. benthamiana</i> 4.30.45	1150
T9+	P10-	<i>N. benthamiana</i> 4.30.45	1900
T10+	P10-	<i>N. benthamiana</i> 4.30.45	1500

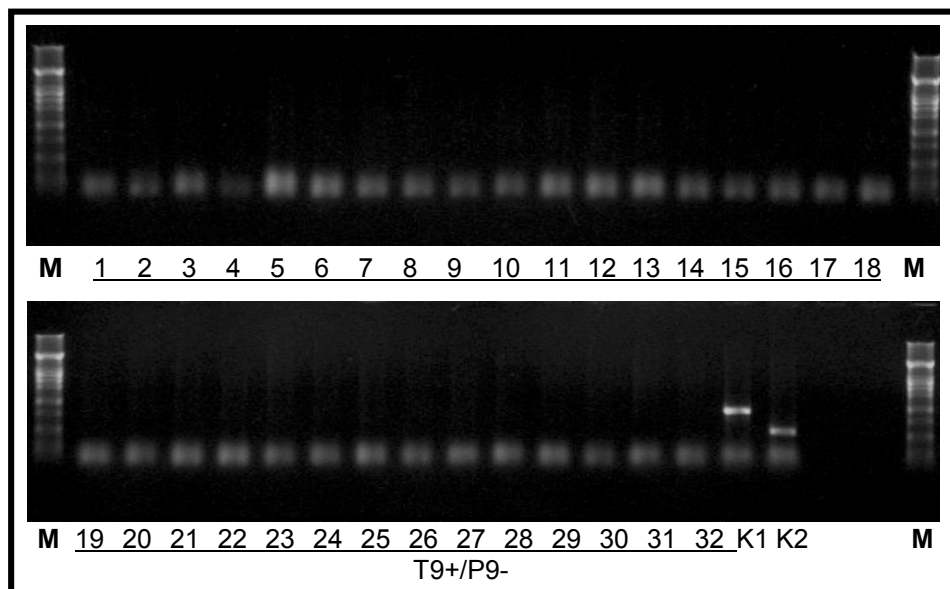


Abbildung 3-13 Versuch der Detektion von rekombinanten PPV-NAT/TVMV-Sequenzen in TVMV-infizierten PPV-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen (4.30.45)

RT-PCR mit dem Primerpaar T9+/P9-; RNA Proben 32 TVMV-infizierter *N. benthamiana* Pflanzen der Linie 4.30.45 (erwartete Bande: ca. 1150 bp). M = λ DNA, *Pst*I verdaut; K1 = T8+/P8-; K2 = PPVdet1/PPVdet2

Wie in Abbildung 3-13 erkennbar, konnte in der RT-PCR mit der heterologen Primerkombination T9+/P9- in TVMV-infizierten PPV-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen der Linie 4.30.45 kein rekombinantes Fragment amplifiziert werden. In den beiden Positivkontrollen konnte die Möglichkeit zur Amplifikation des entsprechenden TVMV-Fragments (K1), bzw. des Transgens oder seiner mRNA (K2), bestätigt werden. Auch mit allen weiteren in Tabelle 3-7 aufgeführten Primerkombinationen konnten bei den PPV-transgenen *N. benthamiana* Linien 17.27.4 und 4.30.45 keine rekombinanten PPV/TVMV-Sequenzen gefunden werden. Wie in Kapitel 3.1.6 deutet dies darauf hin, dass keine PPV-NAT/TVMV-Rekombinanten auftraten oder dass evtl. aufgetretene Rekombinante nicht detektiert wurden.

3.2 Untersuchungen *in vitro*-hergestellter rekombinanter PPV-NAT-"full-length"-Klone

Ziel dieser Untersuchungen war, rekombinante Potyviren auf Unterschiede in ihren biologischen Eigenschaften gegenüber den Elternviren zu überprüfen. Da bei einem Detektionslimit von $1:10^6$ keine *in vivo*-Rekombinanten in VRTP oder Mischinfektionen gefunden werden konnten, wurden artifizielle Rekombinanten durch konventionelle Klonierungstechniken hergestellt. Zwar gibt es Hinweise, dass *in vitro*-Rekombinante aus verschiedenen Viren lebensfähig sind (PPV/ZYMV, Tobias et al., 2001), jedoch zeigte Varrelmann (1999), dass eine Chimäre aus der in dieser Arbeit verwendeten Viren PPV-NAT und TVMV nicht infektiös war. Es wurde daher entschieden, zwei künstliche Rekombinante zu verwenden, deren Elternviren verschiedene PPV-Stämme sind.

Wirtspflanzenspektrum von PPV-NAT/SoC und PPV-NAT/AT

p35PPV-NAT/SoC ist ein auf p35PPV-NAT basierender "full-length"-Klon, bei dem das NAT-Hüllprotein-Cistron und Teile der 3'-NTR gegen die entsprechende Region des PPV-Isolates PPV-SoC ausgetauscht wurde (Al Abdallah, 2003). p35PPV-NAT/AT ist ebenfalls ein auf p35PPV-NAT basierender "full-length"-Klon, bei dem die Kernregion des Hüllprotein-Cistrons durch die entsprechende Region aus PPV-AT ("aphid-transmissible") ausgetauscht wurde. Bei PPV-NAT/SoC wurde auf ein im Vergleich zu PPV-NAT eventuell verändertes Wirtspflanzenspektrum hin geprüft. Neben *N. benthamiana* (Positivkontrolle) wurden folgende

Pflanzen mechanisch mit diesem Virus inokuliert: *N. occidentalis*, *N. debneyi*, *N. tabacum* 'Samsun nn' und 'Xanthi-nc.', *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* sowie *N. physalodes*, *C. foetidum* und *C. quinoa* (2.1.1).

Systemische Infektionen konnten nach sechs dpi auf *N. benthamiana*, *N. occidentalis* und *N. clevelandii* sowohl bei PPV-NAT als auch bei PPV-NAT/SoC bonitiert werden. Erst nach 14 dpi konnten bei PPV-NAT/SoC deutliche Lokalläsionen auf *C. quinoa* festgestellt werden. Bei PPV-NAT dagegen konnte diese Symptomausprägung nicht nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde PPV-NAT/AT in die Untersuchungen miteinbezogen. Es wurden, um Unterschiede in der Ausprägung von Lokalläsionen zu reproduzieren, bei vier *C. quinoa* Pflanzen jeweils sechs Blätter inokuliert. Für die Inokulationen wurden neben PPV-NAT/SoC und PPV-NAT/AT auch die Elternviren PPV-NAT und PPV-SoC verwendet. Nach 16 dpi konnten bei PPV-NAT/SoC und PPV-NAT/AT deutliche Lokalläsionen nachgewiesen werden, bei PPV-NAT und PPV-SoC jedoch nicht (Abbildung 3-14).

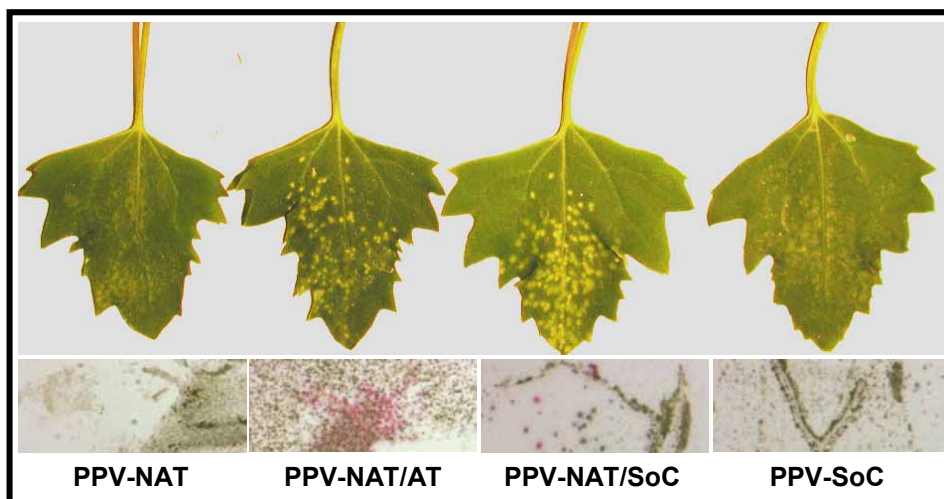


Abbildung 3-14 Lokalläsionen auf *C. quinoa* verursacht durch PPV-NAT/SoC und PPV-NAT/AT

PPV-NAT-, PPV-NAT/AT-, PPV-NAT/SoC- und PPV-SoC- inokulierte *C. quinoa* Blätter mit Lokalläsionen und einem zum jeweiligen Virus gehörenden TPIA (Vergrößerung: 10x); rot eingefärbte Bereiche weisen PPV im Gewebe nach.

Bei PPV-NAT und PPV-SoC konnten lediglich kleinere Läsionen beobachtet werden, die Schäden ähneln, welche durch mechanische Inokulation hervorgerufen werden können. Diese Symptomausprägungen konnten in vier Versuchswiederholungen bestätigt werden.

Um festzustellen, ob es sich bei den mutmaßlichen Inokulationsschäden eventuell um durch das Virus hervorgerufene sehr kleine Läsionen handelte, wurde ein TPIA (2.2.4) durchgeführt (Abbildung 3-14). Wie in Abbildung 3-14 zu erkennen ist, konnten nur in den

Gewebe von *C. quinoa*, die mit PPV-NAT/SoC bzw. PPV-NAT/AT infiziert wurden, mit spezifischen Antikörpern PPV nachgewiesen werden.

Neben der Überprüfung von Wirtspflanzenspektrum bzw. Symptomausprägung wurde p35PPV-NAT/SoC mit einem Reporter gen markiert, um die Lokalisation der Rekombinante in Mischinfektionen mit anderen Viren zu untersuchen. Die Markierung und die Ergebnisse zur Untersuchungen der Mischinfektionen werden im nächsten Kapitel beschrieben.

3.3 Mischinfektionen von fluoreszenzmarkierten Viren

In diesen Versuchen sollten verschiedene Viren, insbesondere die in Kapitel 3.1 verwendeten Potyviren PPV-NAT und TMVMV mit den Reporter genen smRS-GFP bzw. DsRed (siehe 1.4) markiert werden, um Rückschlüsse auf die Verteilung dieser Viren im Pflanzengewebe zu erhalten. Die unmittelbare Verbindung zu den in 3.1 durchgeführten Untersuchungen besteht in der Tatsache, dass für ein Rekombinationsereignis zweier Viren beide Rekombinationspartner in einer Zelle vorliegen müssen. Es galt daher zu klären, ob und in welchem Maße diese Voraussetzungen in mischinfizierten Pflanzen gegeben sind.

3.3.1 Konventionelle Fluoreszenz- und konfokale Laser Scan Mikroskopie

Es wurden mit dem Axiophot (2.1.9.2) und dem CLSM (2.1.9.3) zwei verschiedene Fluoreszenzmikroskope für die Darstellung der Fluoreszenz von smRS-GFP und DsRed verwendet. Das Axiophot wurde für den schnellen Nachweis der Markerfluoreszenz in Blattproben verwendet, wogegen das CLSM bei weiterführenden Studien zur Lokalisation der Viren eingesetzt wurde. Zur Ermittlung der Darstellungsmöglichkeiten der Markerfluoreszenz mit beiden Mikroskopen wurden zunächst *N. benthamiana* Blätter mit den Expressionsvektoren CD3-328smRS-GFP bzw. pe35AscloptRed bombardiert (2.2.20).

Da bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie (Axiophot) die starke Autofluoreszenz von Pflanzengewebe die Darstellung von GFP- und DsRed-Fluoreszenz stört, wurden hierfür neu entwickelte Fluoreszenzfiltersätze (Tabelle 2-17) erprobt. Die Darstellung transient exprimierender *N. benthamiana* Zellen (smRS-GFP bzw. DsRed) wurde mit den Filtersätzen AHF_{EGFP} (Abbildung 3-15, Reihe 1) und AHF_{DsRed} (Abbildung 3-15, Reihe 2) im Vergleich mit einem konventionellen Rhodamin-Filter (Abbildung 3-15, Reihe 3) und einem herkömmlichen UV-Filter (Abbildung 3-15, Reihe 4) durchgeführt. Mit dem Rhodamin-Filter wurde die Fluoreszenz von DsRed, und mit dem UV-Filter die smRS-GFP-Fluoreszenz, nachgewiesen

(Abbildung 3-15, A3, B4, C3, C4). In den Aufnahmen mit den konventionellen Filtersätzen war darüber hinaus auch die starke Autofluoreszenz des Pflanzengewebes zu erkennen. Die Verwendung der Filtersätze AHF_{DsRed} und AHF_{EGFP} ermöglichten die Detektion der Markerfluoreszenz der jeweiligen Markerproteine, wobei die Gewebeautofluoreszenz nur geringfügig oder gar nicht abgebildet wurde (Abbildung 3-15, A1, A2, B1, B2, C1, C2). Des Weiteren war mit AHF_{DsRed} nur die Fluoreszenz des Markers DsRed, bzw. mit AHF_{EGFP} nur die smRS-GFP-Fluoreszenz zu detektieren (Abbildung 3-15, A2, B1). Die Co-Expression beider Markergene in einer Epidermiszelle zeigte ebenfalls, dass mit den AHF-Filtern die Markerfluoreszenz eindeutig und fast ohne Gewebeautofluoreszenz darzustellen war. Die Markerfluoreszenz war auch mit dem Rhodamin- bzw. UV-Filter nachweisbar, jedoch wurde auch die Gewebeautofluoreszenz detektiert.

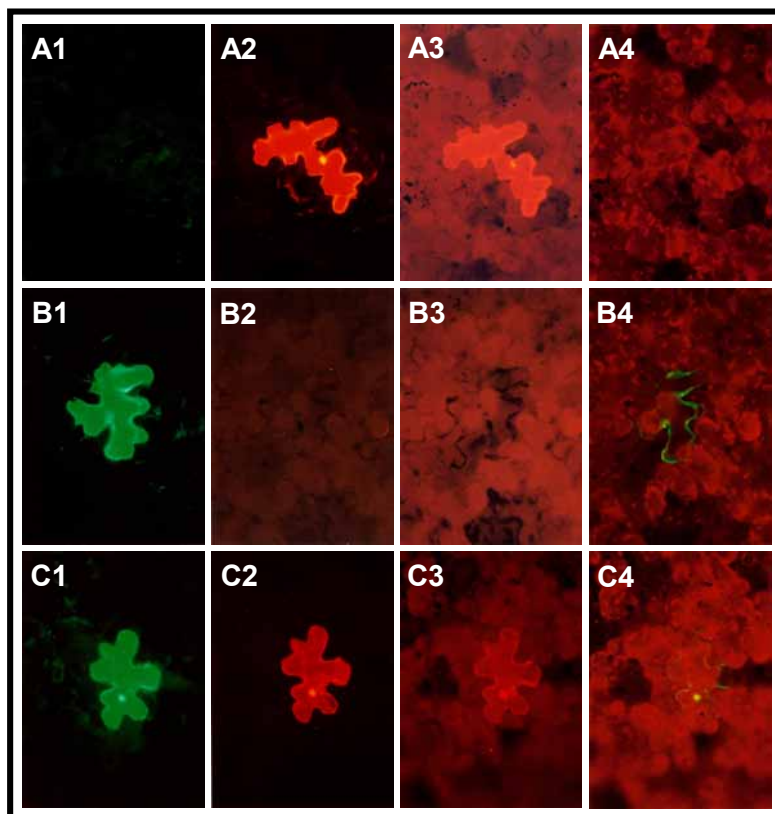


Abbildung 3-15 Verschiedene Filtersätze zur Detektion von smRS-GFP- bzw. DsRed-Fluoreszenz in transient exprimierenden Epidermiszellen von *N. benthamiana* im Epifluoreszenzmikroskop

A = DsRed; B = smRS-GFP; C = DsRed + smRS-GFP; 1 = AHF_{EGFP}; 2 = AHF_{DsRed}; 3 = Rhodamin-Filter; 4 = UV-Filter

Allen Tafeln in Abbildung 3-15 ist gemein, dass diffuses Fluoreszenzlicht die einzelnen Bilder unscharf erscheinen lässt. Die Aufnahmen mit dem integrierten Fotoapparat mussten in vollständiger Dunkelheit erfolgen, wobei die Belichtungszeiten zwischen 15' und 50' betragen.

Mit Hilfe smRS-GFP bzw. DsRed transient exprimierender Epidermiszellen wurden die wesentlichen Einstellungen des CLSM für die weiteren Arbeiten mit diesen Reporterproteinen erprobt. Aufgrund von Literaturdaten und der optischen Eigenschaften von AHF_{DsRed} und AHF_{EGFP} wurden die Laserlinien mit den dazugehörigen Farbteilern gewählt und die Detektionskanäle entsprechend eingestellt (Tabelle 3-8).

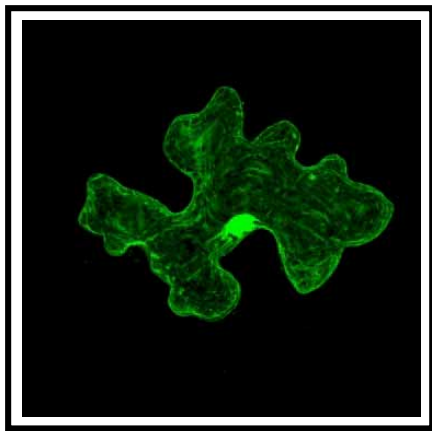


Abbildung 3-16 Darstellung von smRS-GFP-Fluoreszenz in einer transient exprimierenden *N. benthamiana* Epidermiszelle mit dem CLSM

Wie Abbildung 3-16 zeigt, kann mit den oben genannten Einstellungen die Fluoreszenz von smRS-GFP deutlich detektiert werden. Dies war auch bei der transienten Expression von DsRed der Fall. Eine Autofluoreszenz des umliegenden Gewebes war in beiden Fällen nicht zu erkennen. Die Abbildung der Markerfluoreszenz ist zudem frei von diffusem Fluoreszenzlicht, so dass auch Strukturen in der Zelle zu erkennen waren. Die hier beschriebenen Einstellungen wurden auch bei der Darstellung von Pflanzengewebe benutzt, in welchen die jeweiligen Reporterproteine durch virale Vektoren exprimiert wurden.

Tabelle 3-8 CLSM-Einstellungen für die Darstellung von smRS-GFP- bzw. DsRed-Fluoreszenz in *N. benthamiana* Gewebe

Marker	Laser (Linie)	Laserleistung [%]*	Farbteiler	Detektion [nm]
smRS-GFP	Argon Laser (488 nm)	15	488/543	510-515
DsRed	HeNe Laser (543 nm)	100	488/543	600-610

*Grundeinstellung, je nach Präparat variierbar

Die generelle Durchführung von Bildaufnahme und -weiterverarbeitung wurde bereits in 2.2.23.2 behandelt. Ein Arbeiten in einem vollständig abgedunkelten Raum war bei der Bildaufnahme nicht notwendig. Diese Vorgehensweise und die hier vorgestellten Parameter zur Bildaufnahme mussten für jedes Bild individuell angepasst werden.

3.3.2 Markierung von p35PPV-NAT mit smRS-GFP bzw. DsRed

Es sollte der von Maiss et al. (1992) publizierte PPV-NAT "full-length"-Klon p35PPV-NAT mit den Reportergenen smRS-GFP bzw. DsRed markiert werden, um die Virusverteilung im Pflanzengewebe zerstörungsfrei nachweisen zu können. Als Insertionsort für die Marker wurde die Grenze zwischen Nlb- und Hüllprotein-Cistron gewählt. Für die Markierung von p35PPV-NAT mit den Reportergenen smRS-GFP und DsRed wurde wie im Folgenden beschrieben vorgegangen.

In zwei vorbereitenden Klonierungen wurden zuerst zwei Subklone, die jeweils Teile des 3'-Endes von PPV-NAT enthielten, hergestellt.

1. Herstellung des PPV-NAT Subklons pNEBPPV*Bam*HI/*Not*I3'

In den Vektor pNEB193.3 wurde nach einem Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Not*I der 3'-terminale Teil der p35PPV-NAT cDNA eingefügt. Der PPV-NAT-Subklon erhielt die Bezeichnung pNEBPPV*Bam*HI/*Not*I3' (Abbildung 3-17, A).

2. Herstellung des Vektors pREP-4 Δ A/*w*44I

In dem "low copy"-Plasmid pREP-4 wurde die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *A*/*w*44I nach einem Restriktionsverdau mit *M**lu*I/*P**sp*1406I und der Auffüllung der überstehenden Enden mittels Klenow-Reaktion (2.2.14) entfernt. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pREP-4 Δ A/*w*44I (Abbildung 3-17, B).

3. Herstellung des PPV-NAT Subklons pREP-4 Δ A/*w*44I_PPV*C*laI/*X*baI3'

Mit dem Restriktionsverdau *C*laI/*X*baI wurde ein Fragment aus pNEB193PPV*Bam*HI/*Not*I3', welches das 3'-terminale Ende (3'-Teil des Nlb, CP, 3'-NTR und pA) enthält (siehe 1. Schritt), in pREP-4 Δ A/*w*44I kloniert. Es entstand pREP-4 Δ A/*w*44I_PPV*C*laI/*X*baI3' (Abbildung 3-17, C).

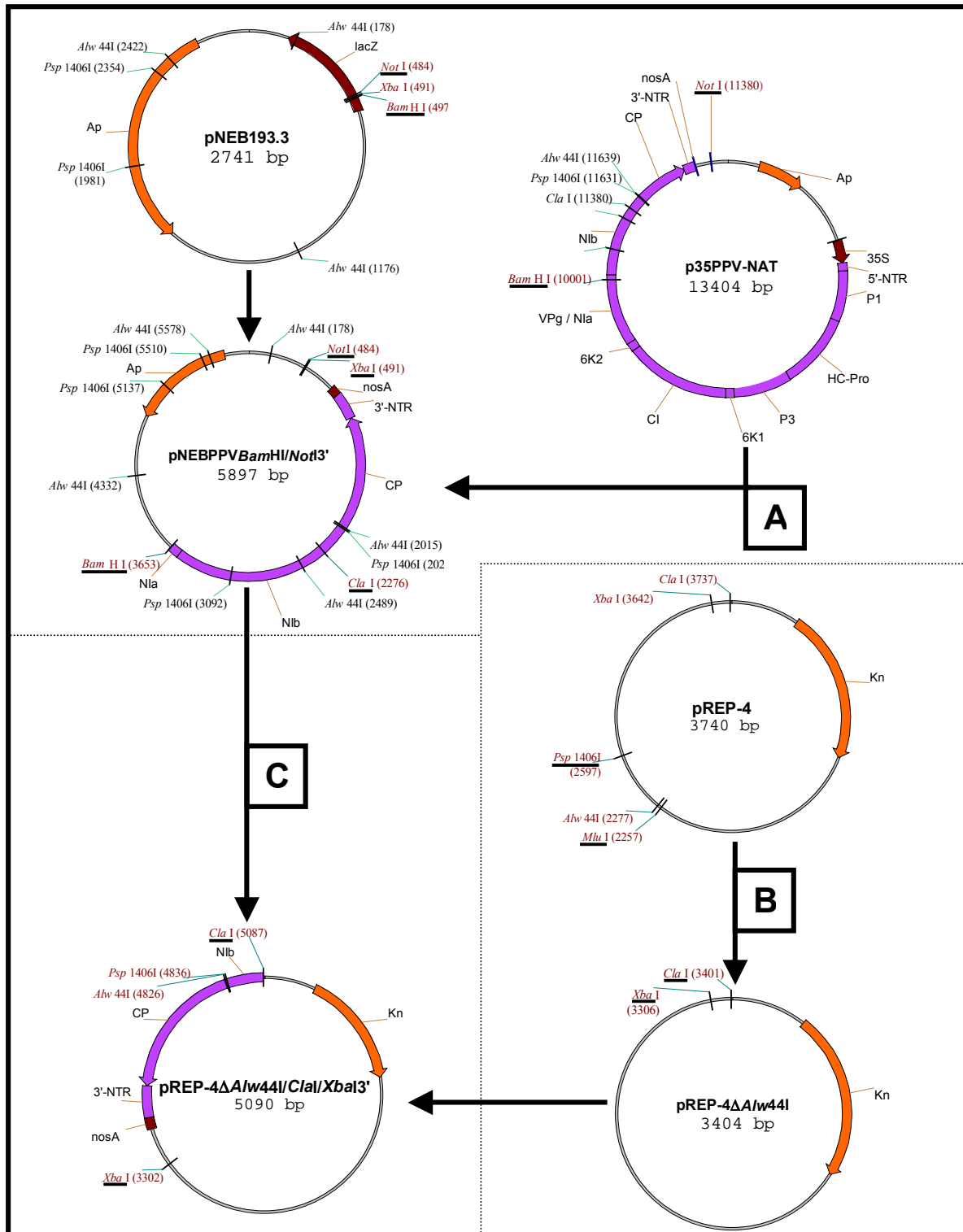


Abbildung 3-17 Herstellung von Subklonen mit 3'-terminalen Sequenzen des PPV-NAT

Dargestellt sind Plasmide mit Erkennungssequenzen von ausgewählten Restriktionsenzymen. Ap = Ampicillinresistenz; Kn = Kanamycinresistenz; 35S = 35S Promoter aus CaMV; P1 und P3 = Protein 1 bzw. 3; HC-Pro = Helferkomponente-Protease; CI = zylindrischer Einschlusskörper; NI_a, NI_b = Kerneinschlusskörper a bzw. b; VPg = virales, genomgebundenes Protein; CP = Hüllprotein; 6K₁ und 6K₂ = kleinere 6 kDa große Proteine; weitere Erläuterungen siehe Text Schritte 1 bis 3 in 3.3.2

Das Reporter-gen DsRed wurde mit den Primern PPV-proRed1/PPV-proRed2as (Tabelle 2-5) amplifiziert, damit es zwischen N1b- und Hüllprotein-Cistron von p35PPV-NAT kloniert werden konnte. Analog zur Klonierung von DsRed wurde smRS-GFP mit den Primern PPVAgfpSup/PPVAgfpSlow (Tabelle 2-5) amplifiziert und zur Markierung von p35PPV-NAT verwendet. Auf die Beschreibung der weiteren Klonierungsschritte zur Konstruktion des smRS-GFP-markierten p35PPV-NAT-*AgfpS* wird verzichtet, da diese exakt nach der für p35PPV-NAT-*red* dargestellten Klonierungsstrategie erfolgte (s.u.). Durch das Design der Primer zur Amplifizierung der Marker und deren späteren Klonierung in p35PPV-NAT-*AgfpS* bzw. p35PPV-NAT-*red* wurden smRS-GFP und DsRed mit den Erkennungsmotiven der Restriktionsendonukleasen *A1w44I* und *Psp1406I* flankiert (Abbildung 3-19).

Im Folgenden wird die weitere Klonierungsstrategie für die Konstruktion von p35PPV-NAT-*red* verdeutlicht.

4. Klonierung des Markergens DsRed in pREP-4Δ*A1w44I/C1aI/XbaI*3'

Das DsRed Gen wurde als *A1w44I/Psp1406I*-Fragment in den ebenfalls *A1w44I/Psp1406I*-verdauten Vektor pREP-4Δ*A1w44I/C1aI/XbaI*3' zwischen N1b- und Hüllprotein-Cistron der PPV-NAT-Sequenz kloniert (pREP-4Δ*A1w44I/C1aI/XbaI*3'-*red*, Abbildung 3-18, A)

5. Klonierung des DsRed-markierten 3'-terminalen Endes von PPV-NAT in pNEBPPVBamHI/NotI3'

Das 3'-terminale Ende der viralen cDNA mit eingefügtem Reporter-gen in pREP-4Δ*A1w44I/C1aI/XbaI*3'-*red* wurde nach einem Restriktionsverdau als *C1aI/XbaI*-Fragment in pNEBPPVBamHI/NotI3' kloniert (pNEBPPVBamHI/NotI3'-*red*, Abbildung 3-18, B).

6. Klonierung der DsRed markierten PPV-NAT 3'-Hälfte in p35PPV-NAT

Der 3'-Terminus von p35PPV-NAT wurde im letzten Klonierungsschritt (*BamHI/NotI*) durch das entsprechende Fragment aus pNEBPPVBamHI/NotI3'-*red* ersetzt. Es entstand der DsRed-markierte "full-length"-Klon p35PPV-NAT-*red* (Abbildung 3-18, C).

Die Klonierung von p35PPV-NAT-*red* musste vollständig wiederholt werden, da sich der zuerst konstruierte "full-length"-Klon als nicht infektiös erwiesen hatte. Ursächlich war hierfür ein Nukleotidaustausch A/C in der einzufügenden *A1w44I*-Erkennungssequenz im "antisense"-Primer PPV-proRed2as. Das Markergen DsRed wurde mit einem neuen "antisense"-Primer amplifiziert. Die weitere Klonierung erfolgte wie sie oben beschrieben wurde.

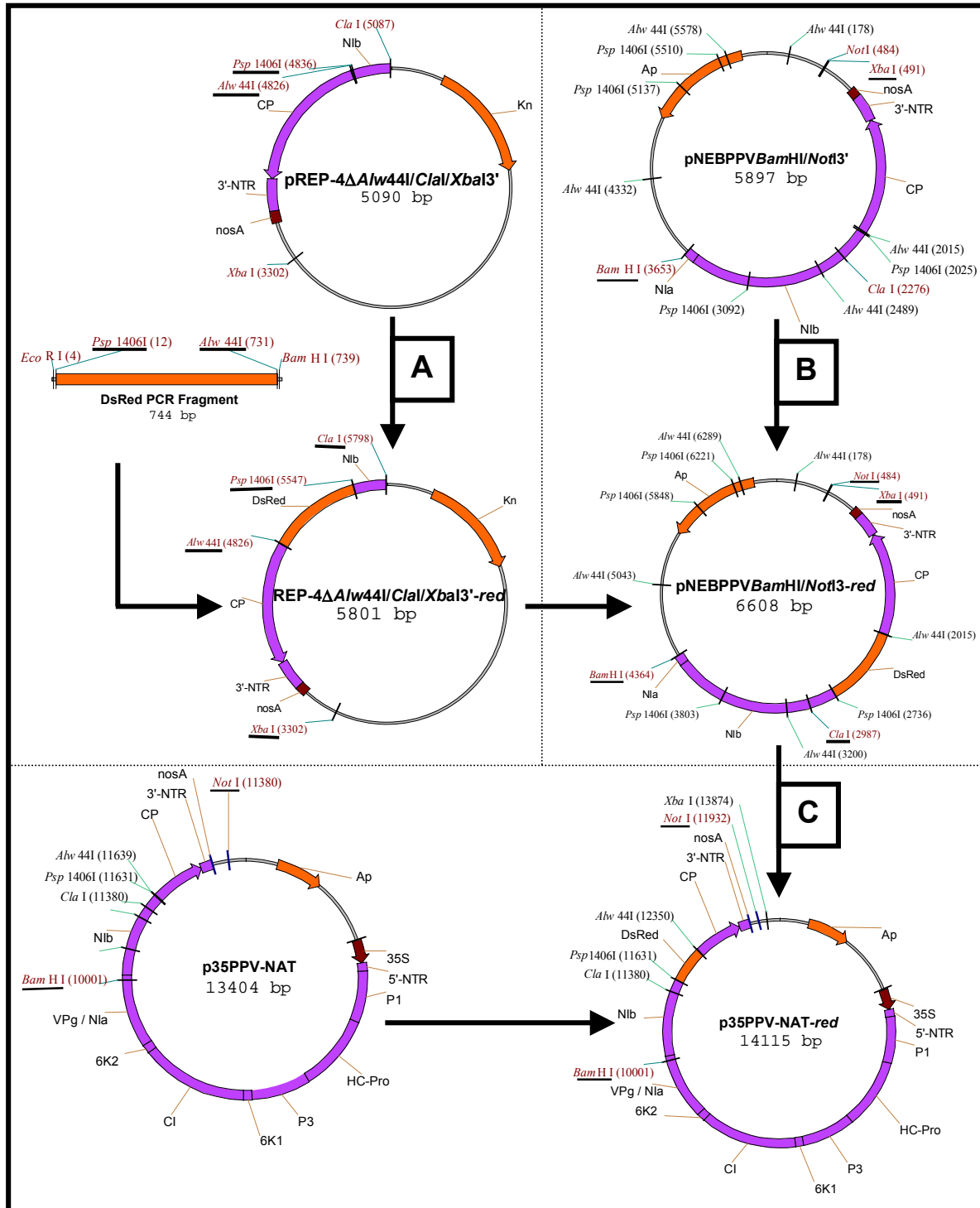


Abbildung 3-18 Klonierung des Markergens DsRed in p35PPV-NAT

Dargestellt sind Plasmide mit Erkennungssequenzen von ausgewählten Restriktionsenzymen. Ap = Ampicillinresistenz; Kn = Kanamycinresistenz; 35S = 35S Promoter aus CaMV; P1 und P3 = Protein 1 bzw. 3; HC-Pro = Helferkomponente-Protease; CI = zylindrischer Einschlusskörper; NI_a, NI_b = Kerneinschlusskörper b bzw. b; VPg = virales, genomgebundenes Protein; CP = Hüllprotein; 6K₁ und 6K₂ = kleinere 6 kDa große Proteine; weitere Erläuterungen siehe Text Schritte 4 bis 6 in 3.3.2

mit einer entsprechenden Wahl der Nukleotide im jeweiligen Primer die "codon usage" für die einzelnen Aminosäuren dahingehend modifiziert, dass homologe Bereiche auf Nukleotidebene an den Enden der Marker vermieden wurden, ohne die Aminosäuresequenz zu verändern.

3.3.3 Markierung von p35PPV-NAT/SoC mit DsRed

Der von Al-Abdallah (2003) hergestellte chimäre PPV-"full-length"-Klon p35PPV-NAT/SoC (3.2) wurde mit dem Reportergen DsRed markiert (p35PPV-NAT/SoC-*red*). Für die Klonierung von p35PPV-NAT/SoC-*red* (Abbildung 3-20) wurden PPV-NAT-Subklone verwendet, deren Herstellung in Kapitel 3.3.2 näher beschrieben ist. Die Klonierungsstrategie wurde der nachfolgenden Vorgehensweise entsprechend durchgeführt.

1. Herstellung von pREP4 Δ A/w44INATSoC-*red*

Die Hüllprotein kodierende Region in dem PPV-NAT-Subklon pREP4 Δ A/w44IPPV *Clal/XbaI*3' (Abbildung 3-17), der das 3'-terminale Ende der viralen PPV-NAT cDNA mit eingefügtem DsRed enthält, wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *NdeI/A/w44I* gegen das SoC-Hüllprotein aus dem Vektor pBSPPVSoCcp ausgetauscht. Der entstandene, DsRed-markierte PPV-NAT-Subklon mit SoC-Hüllprotein erhielt die Bezeichnung pREP4 Δ A/w44INATSoC-*red* (Abbildung 3-20, A).

2. Klonierung der DsRed markierten NAT/SoC-Sequenz in pNEBPPVBamHI/NotI3'

In den Vektor pNEBPPVBamHI/NotI3' (Abbildung 3-17, B) mit der 3'-terminalen Hälfte der viralen PPV-NAT cDNA wurde nach einem Verdau mit den Restriktionsenzymen *Clal* und *XbaI* das DsRed-markierte SoC-Hüllprotein aus pREP4 Δ A/w44IPPVNAT SoC3'-*red* eingefügt. Der entstandene DsRed-markierte PPV-NAT-Subklon mit dem SoC-Hüllprotein erhielt die Bezeichnung pNEBPPVSoC3'-*red* (Abbildung 3-20, B).

3. Klonierung der DsRed markierten NAT/SoC-Sequenz in p35PPV-NAT

Der 3'-terminale Teil von p35PPV-NAT wurde im letzten Klonierungsschritt durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *BamHI* und *NotI* durch das entsprechende Fragment aus pNEBPPVSoC3'-*red* ersetzt. Es entstand der DsRed-markierte "full-length"-Klon p35PPV-NAT/SoC-*red* (Abbildung 3-20, C).

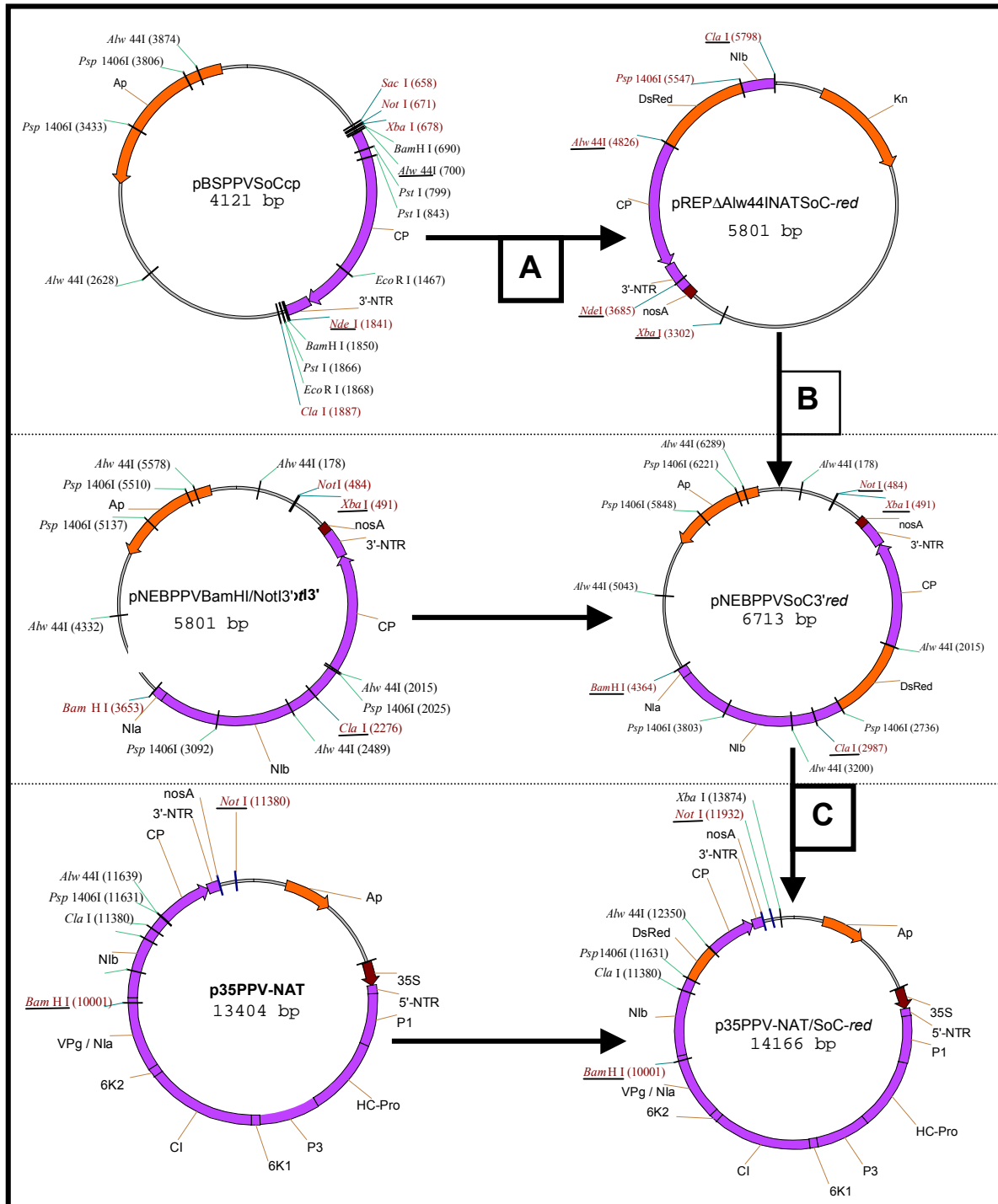


Abbildung 3-20 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p35PPV-NAT/SoC-red

Dargestellt sind Plasmide mit Erkennungssequenzen von ausgewählten Restriktionsenzymen. Ap = Ampicillinresistenz; Kn = Kanamycinresistenz; 35S = 35S Promoter aus CaMV; P1 und P3 = Protein 1 bzw. 3; HC-Pro = Helferkomponente-Protease; CI = zylindrischer Einschlusskörper; Nla, Nib = Kerneinschlusskörper a bzw. b; VPg = virales, genomgebundenes Protein; CP = Hüllprotein; 6K₁ und 6K₂ = kleinere 6 kDa große Proteine; weitere Erläuterungen siehe Text Schritte 1 bis 3 in 3.3.3

Bis auf den ausgetauschten Hüllproteinbereich entspricht der hier beschriebene DsRed-markierte "full-length"-Klon dem in Abbildung 3-19 erläuterten Konstrukt. Das Markergen

wurde als unabhängiges Cistron zwischen Nlb und Hüllprotein eingefügt, so dass es als freies Protein durch die Nla-Protease aus dem Polyprotein prozessiert werden kann. Untersuchungen zur Infektiösität und Stabilität von p35PPV-NAT/SoC-*red* werden in 3.3.4 vorgestellt.

3.3.4 Markierung von p35TVMV mit smRS-GFP bzw. DsRed

Der von Domier et al. (1986) beschriebene TVMV-"full-length"-Klon unter Kontrolle eines T7-Promoters pXBS7 sollte ebenfalls mit den Reportergenen smRS-GFP bzw. DsRed markiert werden. Um bei der Infektion von Pflanzen den "full-length"-Klon besser handhaben zu können, wurde dieser unter Kontrolle eines verdoppelten 35S-Promoters gebracht (durchgeführt von Prof. Dr. E. Maiß). Als Insertionsort für die Marker wurde wieder die Grenze zwischen Nlb- und Hüllprotein-Cistron gewählt.

Die PCR-Amplifikation des Markergens smRS-GFP zur Klonierung von *pe35TVMV-gfp* wurde mit den Primern TVMV-gfpup/TVMV-gfplow (Tabelle 5-2) unter den Bedingungen einer Standard-PCR (2.2.5) durchgeführt. Analog hierzu wurde DsRed mit TVMV-redup/TVMV-redlow amplifiziert. Durch die Primer waren die Markersequenzen mit einer *Xba*I-Erkennungssequenz am 5'-Ende und einer *Bam*HI-Erkennungssequenz am 3'-Ende versehen. Innerhalb des *Xba*I/*Bam*HI-Fragments waren beide Marker zusätzlich mit *Eco*RI-

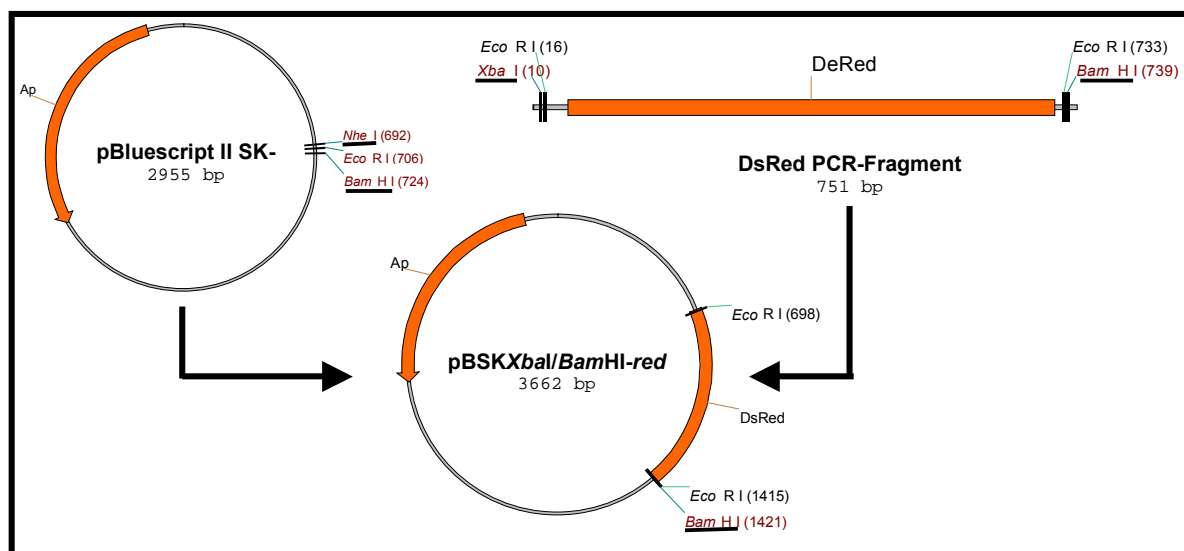


Abbildung 3-21 Zwischenklonierung des DsRed-PCR-Produkts nach Amplifikation mit den Primern TVMV-redup/TVMV-redlow zur späteren Klonierung von *pe35TVMV-red*

pBluescript II SK (-) und pBSK*Xba*I/*Bam*HI-*red* mit Erkennungssequenzen von ausgewählten Restriktionsenzymen. Ap = Ampicillinresistenz; weitere Erläuterungen siehe Text

Erkennungssequenzen versehen, wie es in Abbildung 3-21 am Beispiel von DsRed dargestellt ist. Mit Hilfe des Restriktionsverdau *XbaI/BamHI* wurde jedes Markergen gerichtet in den *NheI/BamHI*-verdauten Vektor pBluescript II SK- kloniert (pBSK*XbaI/BamHI-red*) und sequenziert. Die Sequenzierungen der amplifizierten Markergene zeigten keine Änderungen gegenüber der Ausgangssequenz.

Die Klonierung von *pe35TVMV-red* und *pe35TVMV-gfp* wurde von Prof. Dr. E. Maiß durchgeführt. Hierfür wurde zunächst ein TVMV-Subklon hergestellt, der einen Großteil des NI_b und das 5'-terminale Ende des Hüllproteins als *SalI/BshTI*-Fragment enthielt. Dieses Fragment wurde nach einem Restriktionsverdau (*SalI/BshTI*) aus dem TVMV-"full-length"-Klon pXBS7 (Domier et al., 1986) gewonnen und in den Vektor pSPORT1 eingefügt. Es entstand der TVMV-Subklon pSport*BshTI/SalI* (Abbildung 3-22).

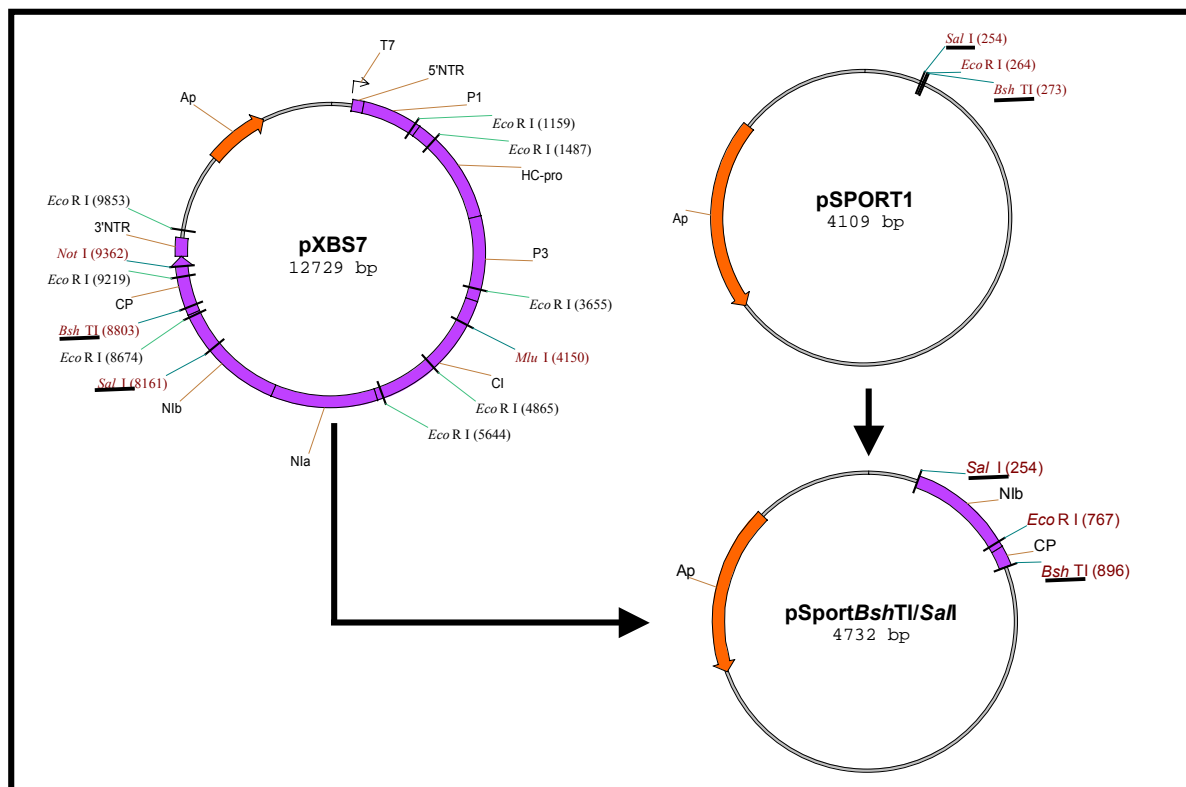


Abbildung 3-22 Herstellung des TVMV-Subklons pSport*BshTI/SalI*

Dargestellt sind Plasmide mit Erkennungssequenzen von ausgewählten Restriktionsenzymen und deren Position. T7 = T7 Promoter; Ap = Ampicillinresistenz; P1 und P3 = Protein 1 bzw. 3; HC-Pro = Helferkomponente-Protease; Cl = zylindrischer Einschlusskörper; NI_a; NI_b = Kerneinschlusskörper a bzw. b; VPg = virales, genomgebundenes Protein; CP = Hüllprotein; weitere Erläuterungen siehe Text

Im Weiteren wird die Klonierung der markierten TVMV-"full-length"-Klone am Beispiel der Vorgehensweise zur Herstellung von *pe35TVMV-red* erklärt (Abbildung 3-23). Die Klonierung von TVMV-*gfp* erfolgte analog zur TVMV-*red* -Strategie.

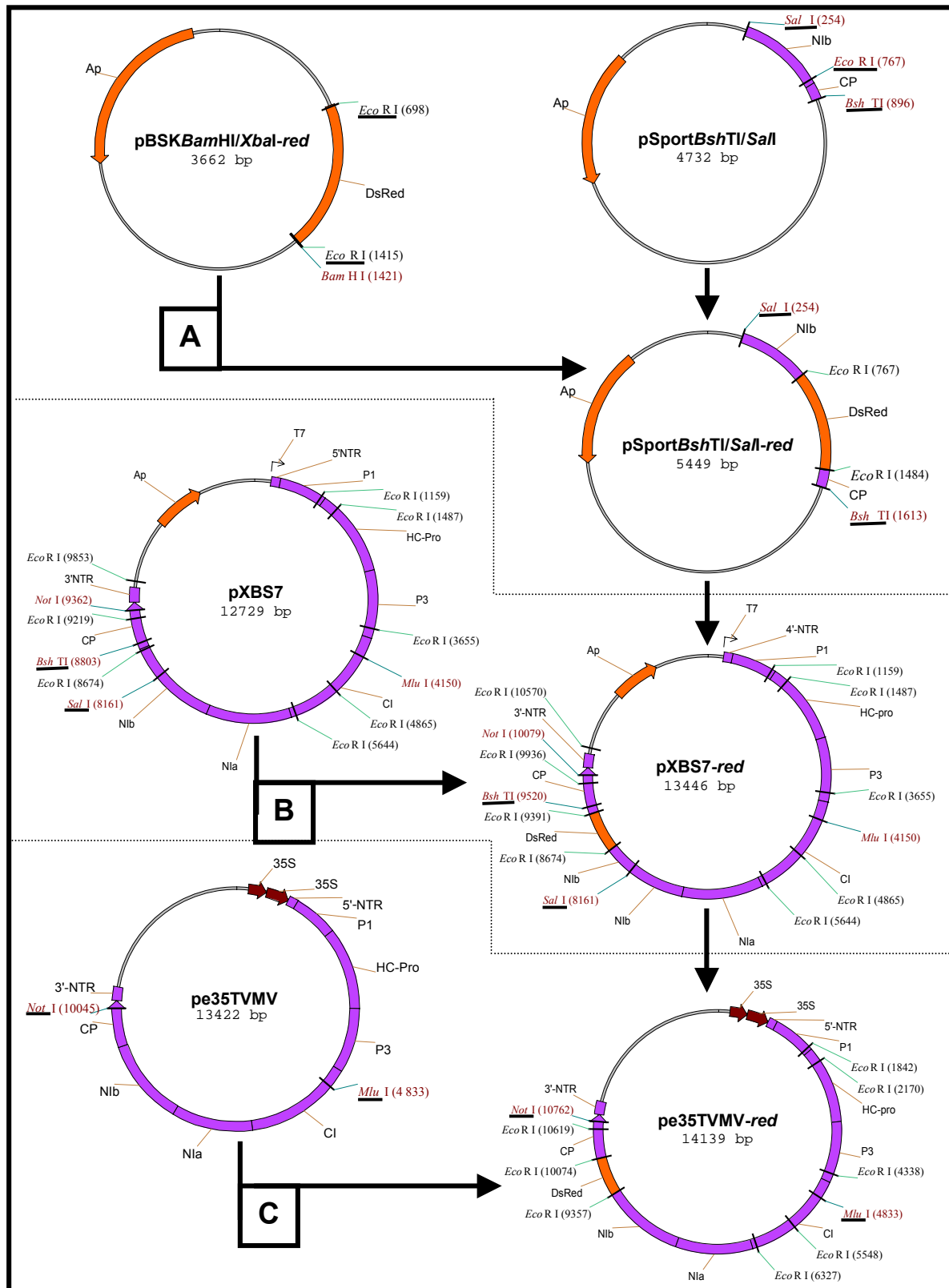


Abbildung 3-23 Strategie zur Klonierung des DsRed-markierten TVMV-'full-length'-Klons pe35TVMV-red

Dargestellt sind Plasmide mit Erkennungssequenzen von ausgewählten Restriktionsenzymen. Ap = Ampicillinresistenz; T7 = T7 Promoter; 35S = 35S Promoter aus CaMV; P1 und P3 = Protein 1 bzw. 3; HC-Pro = Helferkomponente-Protease; CI = zylindrischer Einschlusskörper; NI_a, NI_b = Kerneinschlusskörper a bzw. b; VPg = virales, genomgebundenes Protein; CP = Hüllprotein; weitere Erläuterungen siehe Text Schritte 1-3 in 3.3.4

1. Klonierung von DsRed in den TVMV-Subklon pSportBshTI/SalI

Aus pBSKXbaI/BamHI-red (Abbildung 3-21) wurde DsRed als *EcoRI*-Fragment in den ebenfalls *EcoRI*-verdauten TVMV-Subklon pSportBshTI/SalI kloniert. Es entstand der mit DsRed markierte TVMV-Subklon pSportBshTI/SalI-red (Abbildung 3-23, A).

2. Klonierung der DsRed-markierten TVMV-NIb/CP-Region in pXBS7

Aus dem markierten TVMV-Subklon pSportBshTI/SalI-red wurde das subklonierte TVMV-Fragment zusammen mit der Markersequenz in den unter Kontrolle eines T7-Promoters stehenden TVMV-"full-length"-Klon pXBS7 (Domier et al., 1986) eingefügt. Dies erfolgte mit Hilfe des Restriktionsverdau *BshTI/SalI*. Der entstandene, markierte TVMV-"full-length"-Klon erhielt den Namen pXBS7-red (Abbildung 3-23, B).

3. Klonierung der DsRed-markierten 3'-terminalen Hälfte aus pXBS7 in pe35TVMV

Die DsRed-markierte 3'-terminale Hälfte des TVMV-"full-length"-Klons pXBS7-red wurde nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen *MluI/NotI* in den unter Kontrolle eines verdoppelten 35S-Promoters stehenden TVMV-"full-length"-Klons pe35TVMV kloniert. Es entstand pe35TVMV-red (Abbildung 3-23, C).

Analog zur Klonierung von p35PPV-NAT-*AgfpS* und p35PPV-NAT-red wurde auch bei der Strategie zur Klonierung von pe35TVMV-*gfp* bzw. pe35TVMV-red durch die Wahl der Primer zur Amplifizierung der Reportergene smRS-GFP und DsRed deren Flankierung mit dem Erkennungsmotiv eines Restriktionsenzym (*EcoRI*) erreicht (Abbildung 3-23). Grundsätzlich war die Nukleotidsequenz so gewählt, dass die Insertion der Reportergene das offene Leseraster auf dem Virusgenom nicht zerstört. Des Weiteren wurde jeweils durch den "sense"-Primer die codierende Sequenz für das Erkennungsmotiv für die TVMV-Protease (Nla) am 5'-Ende des Markers generiert. Am 5'-Ende des Hüllproteins blieb die natürlicherweise vorhandene Nla-Proteaseerkennungsequenz bestehen. Damit war das eingefügte Markergen mit den codierenden Sequenzen für die Nla-Proteaseerkennungsequenz flankiert. Die mit Hilfe der "sense"-Primer angefügten Nukleotidsequenzen, die entsprechend dem Übergangsbereich von NIb- und Hüllprotein-Cistron konstruiert wurden, enthielten gegenüber der ursprünglichen Virussequenz eine modifizierte "codon usage".

beobachtet werden. Die systemisch infizierten Bereiche der inokulierten Pflanzen wurden wie in 2.2.23 beschrieben fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Untersuchung zeigte, dass im Falle von PPV-NAT-*AgfpS*, TVMV-*gfp* und CIYVV-GFP in Epidermis- und Mesophyllgewebe deutliche GFP-Fluoreszenz zu erkennen war. Im Falle von PPV-NAT-*red*, PPV-NAT/SoC-*red* und TVMV-*red* konnte ebenfalls in allen infizierten Gewebeschichten die charakteristische DsRed-Fluoreszenz beobachtet werden. Es ist zu bemerken, dass das zeitliche Auftreten von systemischen Infektionen aller Potyviren nach einer mechanischen Inokulation i.d.R. bei acht bis 12 dpi lag. Nach einer mechanischen Inokulation konnte bereits nach wenigen Tagen (drei bis fünf dpi) in den inokulierten Blättern die charakteristische Markerfluoreszenz der Reporterproteine nachgewiesen werden. Die Beobachtungen zur Ausprägung der Fluoreszenz in systemisch infizierten Blättern nach einer mechanischen Inokulation unterschieden sich nicht von den Beobachtungen nach einem Partikelbombardement.

Auf eine Untersuchung der Stabilität von CIYVV-GFP wurde verzichtet, da hierzu Untersuchungen in der Literatur bereits existieren (Masuta et al., 2000). Die Viren PPV-NAT-*AgfpS*, TVMV-*gfp*, PPV-NAT-*red* und TVMV-*red* wurden auf die Stabilität der Markerinsertion hin überprüft. Für diesen Zweck wurden von den mittels Partikelbombardement inokulierten *N. benthamiana* Pflanzen Blattproben von infizierten Bereichen genommen. Nach der Kontrolle der Expression des Markergens mit dem Fluoreszenzmikroskop wurde aus dem infizierten Pflanzenmaterial ein Presssaft hergestellt, der für die mechanische Inokulation von je zwei weiteren *N. benthamiana* Pflanzen verwendet wurde. Diese Passage und die anschließende Kontrolle der Expression des Markergens wurden für jedes Konstrukt insgesamt fünfmal durchgeführt. Zusätzlich wurde vier Wochen nach der Inokulation der ersten Pflanze mittels Partikelbombardement mit einem Presssaft von dieser Pflanze eine mechanische Übertragung auf neue, nicht-infizierte *N. benthamiana* Pflanzen vorgenommen. Bei jeder der Passagen konnte sowohl die Infektiosität, als auch die Expression des Markergens bestätigt werden. Auf weitere Passagen wurde verzichtet, da die Stabilität der Markerinsertion für die Untersuchung der Viruslokalisation in Mischinfektionen als ausreichend erachtet wurde.

3.3.5 Mischinfektionen von PVX und verschiedenen Potyviren

In diesen Untersuchungen wurden nicht-transgene *N. benthamiana* Pflanzen mit taxonomisch nicht verwandten, fluoreszenzmarkierten Viren doppelt infiziert. Die Kombinationen beinhalteten immer ein Potexvirus (PVX) und ein Potyvirus (s.u.). Um die Viruspopulationen in einer Mischinfektion unterscheiden zu können, wurde immer ein GFP-

markiertes Virus mit einem DsRed-markierten Virus inokuliert. Die daraus sich ergebenden Viruskombinationen sind in Tabelle 3-9 aufgeführt.

Tabelle 3-9 Mischinfektionen mit PVX/Potyviruskombinationen

Doppelinfektion mit		Verteilung	Synergismus
PVX201- <i>gfp</i>	+ TVMV- <i>red</i>	◄►	+
PVX201- <i>gfp</i>	+ PPV-NAT- <i>red</i>	◄►	+
PVX201- <i>gfp</i>	+ PPV-NAT/SoC- <i>red</i>	◄►	+
PVX201- <i>optRed</i>	+ TVMV- <i>gfp</i>	◄►	+
PVX201- <i>optRed</i>	+ PPV-NAT- <i>AgfpS</i>	◄►	+
PVX201- <i>optRed</i>	+ CIYVV-GFP	◄►	+

◄► beschreibt die Möglichkeit zur gemeinsamen Verteilung

Für die Durchführung von Mischinfektionen wurden nicht-transgene *N. benthamiana* Pflanzen mit den entsprechenden "full-length"-Klonen p35PVX201-*optRed*, p35PVX201-*gfp*, p35PPV-NAT-*AgfpS*, p35PPV-NAT-*red*, p35PPV-NAT/SoC-*red*, pe35TVMV-*gfp*, pe35TVMV-*red* und p35CIYVV-GFP mittels Partikelbombardement inokuliert. Nach dem Auftreten systemischer Infektionen (vergl. 3.3.4) wurden infizierte Blattbereiche auf die Expression der Markergene hin fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Des Weiteren wurde infektiöses Pflanzenmaterial gemäß 2.2.22 für spätere Inokulationsversuche getrocknet. Mit dem infektiösen Blattmaterial (frisch oder getrocknet) wurde ein Presssaft hergestellt, entsprechend der jeweiligen Viruskombination in gleichen Teilen gemischt und für die mechanische Inokulation nicht-transgener *N. benthamiana* Pflanzen verwendet. Bei den in diesem Abschnitt beschriebenen Mischinfektionen wurden die jeweiligen Viren aufgrund der Verwendung eines Presssaftgemisches grundsätzlich zeitgleich inokuliert.

Bereits nach drei bis vier dpi konnten in den primär infizierten Blättern deutliche Fluoreszenzsignale der betreffenden Reporterproteine unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Die Beobachtungen lassen sich für die in Tabelle 3-9 genannten Kombinationen zusammengefasst darstellen. Es konnten einzelne fluoreszierende Höfe detektiert werden, welche die Fluoreszenz des jeweiligen Markerproteins zeigten. Allerdings war die von CIYVV-GFP-bedingte Fluoreszenz weniger oft zu finden. Neben einzelnen fluoreszierenden Höfen konnten auch Bereiche identifiziert werden, in welchen die Fluoreszenz beider Reporterproteine zu erkennen war. Nach dem Auftreten systemischer Infektionen (3.3.4) wurden die neugebildeten, infizierten Blattgewebe ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wie für die Primärinfektion berichtet, konnten auch in den systemisch infizierten

Gewebe die Fluoreszenz sowohl eines, als auch beider Reporterproteine in Epidermiszellen nachgewiesen werden.

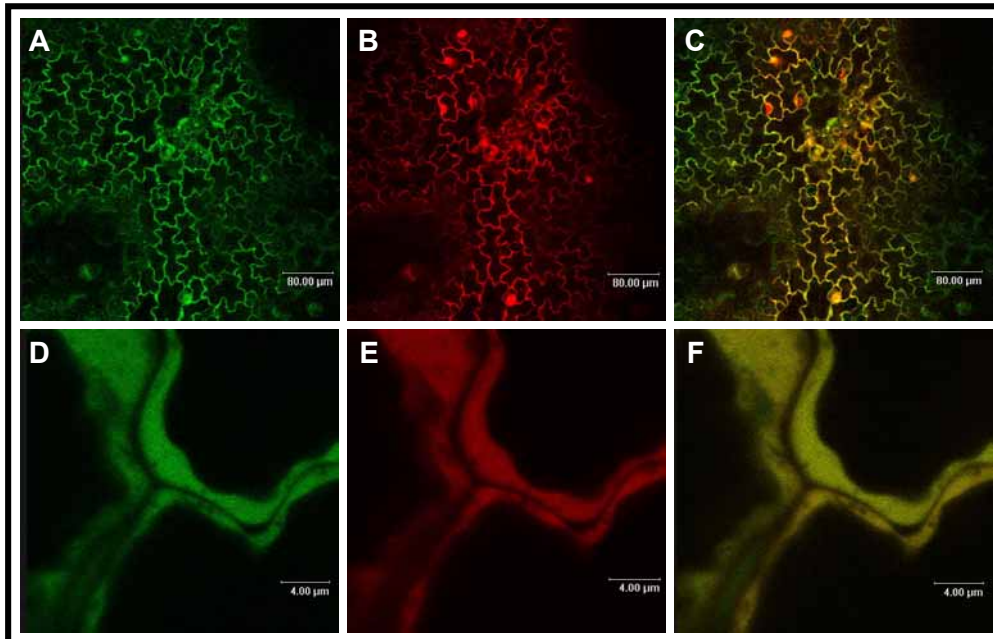


Abbildung 3-25 Gemeinsame Verteilung von PVX201-*optRed* und PPV-NAT-*AgfpS* in Epidermiszellen von *N. benthamiana*

(A) und (D) zeigen die GFP-Expression durch PPV-NAT-*AgfpS*; (B) und (E) zeigen die Expression von DsRed durch PVX201-*optRed*; (C) bzw. (F) sind die simultanen Projektionen von (A) und (B) bzw. (D) und (E).

Die Beobachtungen der Expression der Reportergene durch virale Vektoren in primär und systemisch infizierten Epidermisgeweben zeigten für die PVX/Potyviruskombinationen, dass die unterschiedlichen Viruspopulationen im Gewebe sowohl einzeln, als auch gemeinsam verteilt vorkommen. Die gemeinsame Expression der Markergene konnte sich hierbei auf größere Zellbereiche der Epidermisschicht erstrecken, wie die Untersuchungen mit dem CLSM zeigten (Abbildung 3-25, A-C). Die stärkere Vergrößerung dreier aneinander grenzender, PVX201-*optRed*- und PPV-NAT-*AgfpS*-infizierter, Zellen mit Hilfe des CLSM zeigte eine annähernd gleiche Verteilung der DsRed- und smRS-GFP-Fluoreszenz (Abbildung 3-25, D-F). Eine weitergehende Untersuchung zeigte, dass auch im tiefer gelegenen Mesophyll größere Bereiche des Pflanzengewebes von den PVX- und Potyviruspopulationen doppelt infiziert waren (Abbildung 3-26)

Neben den festgestellten möglichen Verteilungsformen von PVX- und Potyviruspopulationen konnten bei den doppelt infizierten Pflanzen zudem auch Unterschiede in der Symptomatologie im Vergleich zu einfach infizierten Pflanzen festgestellt werden. Bei diesen

Pflanzen war eine verstärkte Symptomausprägung zu beobachten, die sich in stark nekrotisierten Blättern und gedrungenem Wuchs äußerte.

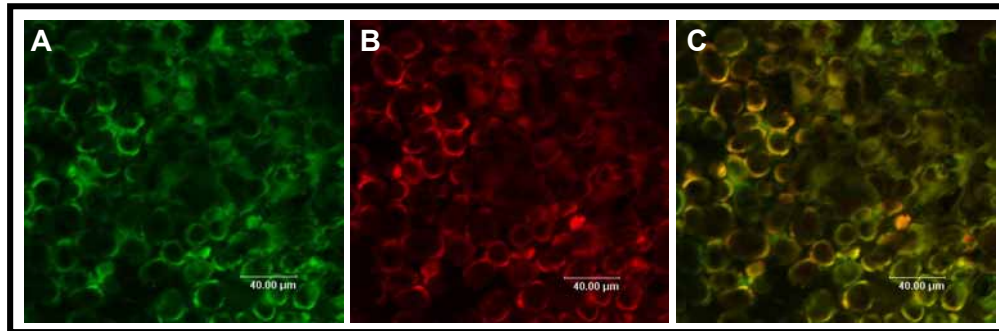


Abbildung 3-26 Gemeinsame Verteilung von PVX201-*optRed* und PPV-NAT-*AgfpS* im Mesophyllgewebe von *N. benthamiana*

(A) zeigt die GFP-Expression durch PPV-NAT-*AgfpS*; (B) zeigt die Expression von DsRed durch PVX201-*optRed*; (C) ist die simultane Projektion von (A) und (B).

3.3.6 Mischinfektionen unterschiedlich markierter Viren gleichen Ursprungs

Analog zu den in 3.3.5 beschriebenen Versuchen wurden Mischinfektionen mit unterschiedlich markierten Viren gleichen Ursprungs durchgeführt. Es wurden die in Tabelle 3-10 dargestellten Viruskombinationen untersucht.

Tabelle 3-10 Mischinfektionen mit unterschiedlich markierten Viren gleichen Ursprungs

Doppelinfektion von Viren mit			
GFP Markierung		DsRed Markierung	Verteilung
PVX201- <i>gfp</i>	+	PVX201- <i>optRed</i>	◀▶
TVMV- <i>gfp</i>	+	TVMV- <i>red</i>	◀▶
PPV-NAT- <i>AgfpS</i>	+	PPV-NAT- <i>red</i>	◀▶

◀▶ beschreibt die getrennte Verteilung

Wie im vorhergehenden Kapitel können die Ergebnisse der drei Kombinationen (Tabelle 3-10) gemeinsam dargestellt werden. Die Untersuchung primär infizierter Blätter drei bis fünf dpi nach mechanischer Inokulation unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte, dass die Markergene in einzelnen Höfen der Epidermis- und der darunter liegenden Mesophyllschicht exprimiert wurden. Ein gemischtes Signal beider Reporterproteine in einem Zellverband

wurde nicht beobachtet. Auffallend war, dass beim Aneinandergrenzen zweier unterschiedlich fluoreszierender Höfe diese nicht ineinander übergingen, d.h., dass eine Art Trennung der aufeinander treffenden, unterschiedlich markierten Populationen zu erkennen war. In systemisch infizierten Blättern wurde die Existenz von unabhängig lokalisierten, unterschiedlich fluoreszierenden Bereichen bestätigt, wobei solche in unmittelbarer Nachbarschaft den gleichen Trennungseffekt aufwiesen, der in primär infizierten Blättern beobachtet wurde (Abbildung 3-27, A-C).

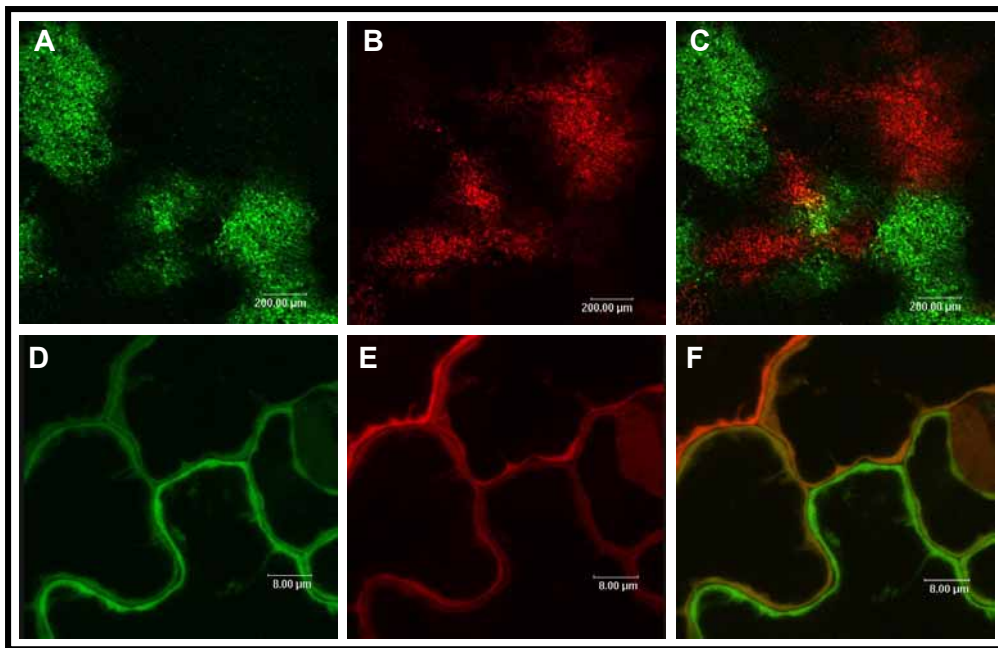


Abbildung 3-27 Getrennte Verteilung von unterschiedlich markierten Populationen des PPV-NAT in systemisch infizierten *N. benthamiana* Blättern

(A) und (D) zeigen die GFP-Expression durch PPV-NAT-*AgfpS*; (B) und (E) zeigen die Expression von DsRed durch PPV-NAT-*red* in Epidermiszellen; (C) und (F) sind die simultanen Projektionen von (A) und (B) bzw. (D) und (E).

Ein vergrößerter Ausschnitt aus dem Bereich zweier aneinandergrenzender unterschiedlich markierter PPV-NAT-Populationen zeigte, dass es keine klare Trennung beider Populationen gab (Abbildung 3-27, D-F). Vielmehr zeigt Abbildung 3-27 (F), dass es eine Zellschicht gibt, in welcher die Fluoreszenz beider Reporterproteine etwa gleich stark erscheint, was durch die gelbliche Farbe als Mischung aus roter und grüner Fluoreszenz (Abbildung 3-27, D-F) angezeigt wird. Dagegen ist in Abbildung 3-27 (F) deutlich zu erkennen, dass die angrenzenden Bereiche neben der gelblichen Zelle jeweils die Fluoreszenz eines der Markerproteine dominiert. Allerdings zeigen die Tafeln (D) und (E) in Abbildung 3-27, dass in

den Zellen, in welchen die Fluoreszenz eines Markerproteins dominiert, auch die jeweils andere Fluoreszenz zu erkennen ist.

Die Fortsetzung des beobachteten Trennungseffekts in tieferen Blattschichten konnte mit dem CLSM auch im Mesophyllgewebe nachgewiesen werden (Abbildung 3-28). Die beobachtete Verteilungsform lag auch vor, wenn die unterschiedlichen "full-length"-Klone als cDNA mittels Partikelbombardement inokuliert wurden.

Im Vergleich zu den in 3.3.5 gemachten Beobachtungen zur Symptomausprägung der doppelt infizierten Pflanzen konnten keine verstärkten Symptome festgestellt werden.

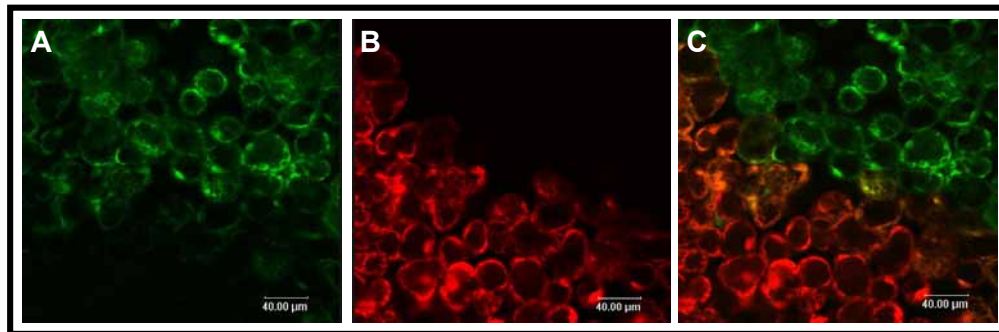


Abbildung 3-28 Getrennte Verteilung von unterschiedlich markierten Populationen des PPV-NAT im Mesophyllgewebe systemisch infizierter *N. benthamiana* Blätter

(A) zeigt die GFP-Expression durch PPV-NAT-*AgfpS*; (B) zeigt die Expression von DsRed durch PPV-NAT-*red*; (C) ist die simultane Projektion von (A) und (B).

3.3.7 Mischinfektionen verschiedener, unterschiedlich markierter Potyviren

Die in Tabelle 3-11 aufgelisteten Kombinationen unterschiedlich markierter Potyviren wurden in Doppelinfektionen von *N. benthamiana* Pflanzen untersucht. Zusätzlich zu den bisher verwendeten "full-length"-Klonen konnte hier freundlicherweise auch der von Dr. R. Götz hergestellte "full-length"-Klon p35PVY-*gfp* in zwei Kombinationen verwendet werden. Nach der Inokulation konnte in den primär und in den systemisch infizierten Blättern eine diskrete Verteilung der unterschiedlich markierten Viruspopulationen mit dem CLSM nachgewiesen werden (Tabelle 3-11). Dies ist in Abbildung 3-29 anhand des Beispiels PPV-NAT-*red*/TVMV-*gfp* dargestellt.

Die Kombination PPV-NAT-*AgfpS*/TVMV-*red* wurde auch als Mischung der entsprechenden "full-length"-Klone mittels Partikelbombardement inokuliert. Da das Bombardement in den Vegetationskegel erfolgte, konnten keine primär infizierten Blätter ausgewertet werden. In systemisch infizierten Pflanzenteilen wurde der gleiche Separierungseffekt beobachtet, der

bereits oben beschrieben wurde. Die Verteilungsform des rekombinanten PPV-NAT/SoC-*red* unterschied sich nicht von der bei den Elternviren beobachteten Verteilung.

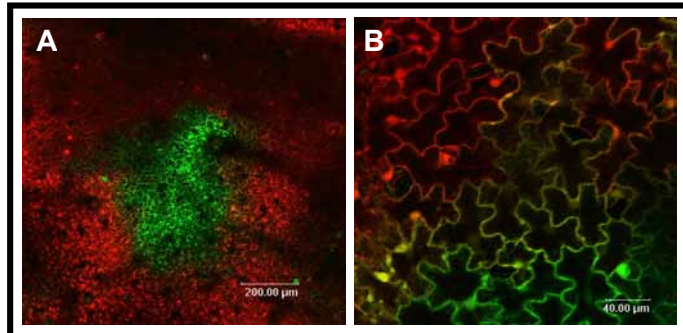


Abbildung 3-29 Getrennte Verteilung der Populationen von PPV-NAT-*red* (rot) und TVMV-*gfp* (grün)

Wie in Abbildung 3-30 (A) zu erkennen ist, war PPV-NAT/SoC-*red* von TVMV-*gfp* "eingeschlossen". Dieser Effekt konnte bei PPV-NAT/SoC-*red* häufiger beobachtet werden. Die Kombinationen mit Beteiligung von CIYVV-GFP waren schwierig auszuwerten, da GFP-Fluoreszenz nur selten in den infizierten Geweben zu identifizieren war. Ein Beispiel für die CIYVV-GFP-Lokalisierung zeigt Abbildung 3-30 (B). Verglichen mit den PPV-NAT/SoC-*red*-Kombinationen war CIYVV-GFP wesentlich häufiger von PPV-NAT-*red* bzw. TVMV-*red* "eingeschlossen".

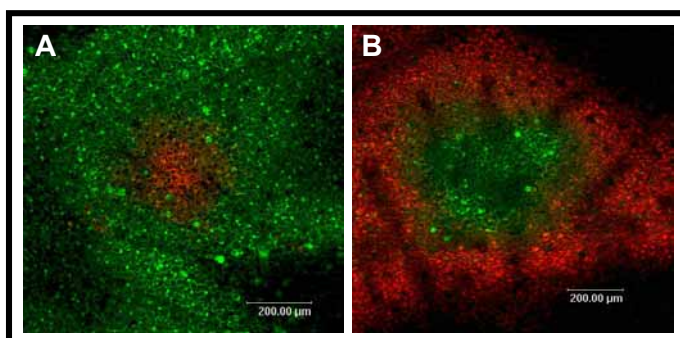


Abbildung 3-30 Getrennte Verteilung der Populationen von TVMV-*gfp*/PPV-NAT/SoC-*red* (A) bzw. TVMV-*red* und CIYVV-GFP (B)

Tabelle 3-11 Mischinfektionen mit unterschiedlich markierten Potyiren

Doppelinfection von Viren mit			
GFP Markierung		DsRed Markierung	Verteilung
PPV-NAT- <i>AgfpS</i>	+	TVMV- <i>red</i>	◀▷
PPV-NAT- <i>AgfpS</i>	+	PPV-NAT/ <i>SoC-red</i>	◀▷
TVMV- <i>gfp</i>	+	PPV-NAT- <i>red</i>	◀▷
TVMV- <i>gfp</i>	+	PPV-NAT/ <i>SoC-red</i>	◀▷
CIYVV-GFP	+	PPV-NAT- <i>red</i>	◀▷
CIYVV-GFP	+	TVMV- <i>red</i>	◀▷
PVY- <i>gfp</i>	+	PPV-NAT- <i>red</i>	◀▷
PVY- <i>gfp</i>	+	TVMV- <i>red</i>	◀▷

◀▷ beschreibt die getrennte Verteilung

3.3.8 Längerfristige Beobachtung der getrennten Verteilung

Mit den Viruskombinationen PPV-NAT-*red*/TVMV-*gfp* und PPV-NAT-*AgfpS*/PPV-NAT-*red* wurde die getrennte Ausbreitung über einen Zeitraum von 28 Tagen beobachtet. Es wurden 10 nicht-transgene *N. benthamiana* Pflanzen mit diesen Kombinationen mechanisch inokuliert. Nach dem Auftreten systemischer Infektionen wurde über 10 Tage hinweg täglich eine Blattprobe einer Pflanze auf eine diskrete Verteilung hin untersucht. Es wurde immer ein Blatt der gleichen Entwicklungsstufe als Probe verwendet, um über die Zeit gesehen einen Eindruck davon zu gewinnen, ob die Verteilungsform in einem Blattstadium beständig war. In den untersuchten Blättern konnte stets die getrennte Verteilung nachgewiesen werden. Nach jeweils 14, 21 und 28 dpi wurden aus den Pflanzen Proben neugebildeter, systemisch infizierter Blätter genommen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In diesen Proben konnte der Separierungseffekt auch bestätigt werden. Auch in Pflanzen, die mit Presssaft aus doppelinfizierten, 28 dpi alten *N. benthamiana* Pflanzen inokuliert worden waren, konnte in systemisch infizierten Blättern die getrennte Verteilungsform nachgewiesen werden.

3.3.9 Zeitlich verzögerte Inokulationen zweier unterschiedlich markierter PVX-Populationen

Bei allen in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Doppelinfektionen wurden die Viren simultan inokuliert. In diesem Versuch sollte geklärt werden, ob in einer Virus-

kombination, in welcher eine Trennung der Populationen herrscht, die Viren auch einzeln in zeitlich verzögertem Abstand inokuliert werden können und ob beide Populationen dann in der Lage sind sich zu etablieren. Die Vorgehensweise ähnelt im Ansatz einem "cross protection"-Versuch. Es wurden hierfür die PVX-"full-length"-Klone PVX201-*gfp* und PVX-0014-*red* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Maiß) verwendet. PVX-0014-*red* ist die markierte Variante von PVX0014, die im Vergleich zu PVX201 häufig mildere Symptome auf *N. benthamiana* verursachte. Da diese Beobachtung nicht immer reproduzierbar war, konnte ein "cross protection"-Versuch im eigentlichen Sinne nicht durchgeführt werden. Die erste Inokulation erfolgte mit PVX0014-*red* auf *N. benthamiana* Pflanzen. Nach dem Sichtbarwerden von systemischen Symptomen (ca. acht dpi) konnte die Fluoreszenz des Markergens unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Nach 12 dpi war in allen untersuchten mikroskopischen Präparaten immer ein Gewebeanteil vorhanden, der noch keine Fluoreszenz zeigte. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Inokulation mit PVX201-*gfp*. Es wurden Blätter für die mechanische Übertragung verwendet, die Symptome der PVX0014-*red*-Infektion aufwiesen. Die Abschlussbonitur nach 24 dpi unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte, dass fast ausschließlich die rote Fluoreszenz des erstinokulierten PVX0014-*red* zu erkennen war. An wenigen Stellen konnte aber auch die GFP-Fluoreszenz von PVX201-*gfp* detektiert werden (Abbildung 3-31, A). Diese war wie in den anderen Viruskombinationen mit getrennter Verteilung gegenüber der roten Fluoreszenz getrennt.

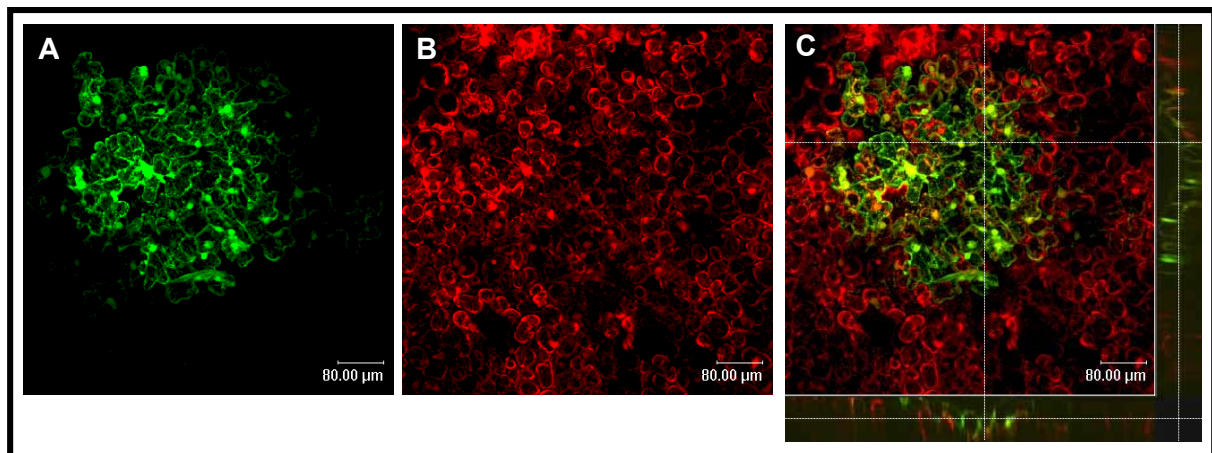


Abbildung 3-31 Doppelinfection von PVX0014-*red* und PVX201-*gfp* in *N. benthamiana*

PVX0014-*red* (rot, B) infiziert das Mesophyll und teilweise Epidermiszellen und PVX201-*gfp* (grün) infiziert Teile der darüber liegenden Epidermis (A). Die unten und rechts am Rand von (C) eingefügten Bilderweiterungen repräsentieren Querschnitte ("Z-sections") entlang dem Kreuz aus gestrichelten Linien in (C) und verdeutlichen die Trennung von roter und grüner Fluoreszenz in den jeweiligen Zellschichten.

Allerdings konnte auch ein gemischtes Signal unter epifluoreszenzmikroskopischen Bedingungen detektiert werden. Eine weitergehende Analyse am CLSM jedoch zeigte, dass

eine getrennte Verteilung der Viruspopulationen vorlag. Diese Trennung erfolgte jedoch nicht wie sonst gezeigt zwischen Zellen einer Zellschicht bzw. eines Zelltyps (z.B. Epidermiszellen), sondern zwischen Epidermiszellen und dem darunter liegenden Mesophyll. Hierbei war das erstinokulierte Virus (PVX0014-*red*) im Mesophyll vertreten, während das nachfolgend inokulierte Virus (PVX201-*gfp*) Teile der darüber liegenden Epidermis infizierte (Abbildung 3-31, C).

In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, in einer Viruskombination mit getrennter Verteilung beide Viren in zeitlich verzögertem Abstand zu inokulieren und dass das am zweiten Zeitpunkt inokulierte Virus in der Lage ist, sich trotz des Trennungseffektes lokal zu etablieren.

3.3.10 Mischinfektion PPV-transgener *N. benthamiana* Pflanzen mit unterschiedlich markierten Viren

Es wurde eine Mischinfektion der Kombinationen und TVMV-*red*/TVMV-*gfp* auf den PPV-transgenen *N. benthamiana* Linien 17.27.4 und 4.30.45 untersucht. Die Pflanzen wurden mit gemischten Presssäften mechanisch inokuliert, die aus einzeln infizierten Pflanzen hergestellt worden waren. Die Ergebnisse aus der Untersuchung primär und systemisch infizierter Bereiche unterschieden sich nicht von den bereits in den Kapiteln 3.3.6 und 3.3.7 ausführlich beschriebenen Ergebnissen. Auch in den PPV-Hüllprotein-transgenen *N. benthamiana* Linien trat eine getrennte Virusverteilung auf.

3.3.11 Mischinfektionen unterschiedlich markierter Viren in verschiedenen Tabakarten

Die Tabakarten *N. occidentalis*, *N. clevelandii* und *N. rustica* wurden mit gemischten Presssäften der Viruskombinationen TVMV-*gfp*/TVMV-*red*, PPV-NAT-*AgfpS*/TVMV-*red*, PPV-NAT-*AgfpS*/PPV-NAT-*red* und TVMV-*gfp*/PVX201-*optRed* inokuliert. Fast alle Pflanzen zeigten nach ca. acht Tagen deutliche Adernaufhellungen. Lediglich TVMV-*gfp*/TVMV-*red*-inokulierte *N. glutinosa* waren symptomlos. Allgemein war trotz der teilweise sehr deutlichen Virussymptome auf den Blättern die Fluoreszenz der infizierenden Viren nicht sehr ausgebreitet, wie es bei diesen Kombinationen in *N. benthamiana* der Fall war. Die Fluoreszenz der TVMV-Varianten auf *N. glutinosa* war nicht zu detektieren. Die Auswertung der Verteilung der Viruspopulationen ergab, dass PVX201-*optRed* und TVMV-*gfp* größere

Bereiche von *N. occidentalis* und *N. clevelandii* (Abbildung 3-32) gemeinsam infizieren konnten. Bei der Kombination TVMV-*gfp*/TVMV-*red* in *N. clevelandii* dagegen konnte die bereits in 3.3.6 und 3.3.7 beschriebene getrennte Verteilungsform nachgewiesen werden. In allen weiteren Kombinationen konnten aufgrund der schwach ausgeprägten Fluoreszenz keine unmittelbar aneinandergrenzenden, mit unterschiedlichen Viren infizierte Gewebebereiche, gefunden werden.

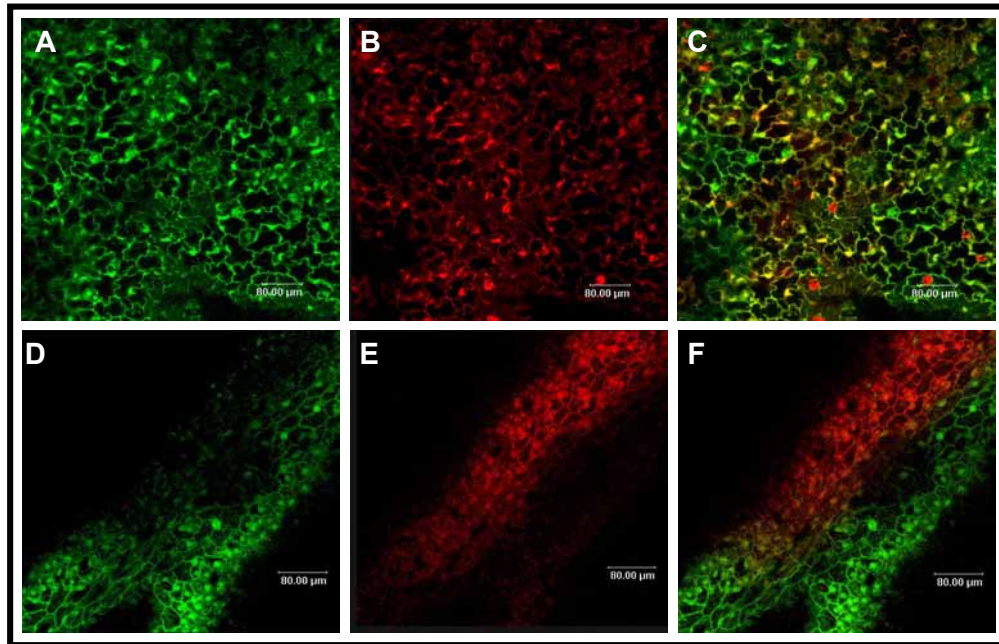


Abbildung 3-32 Verteilung von Viruspopulationen in *N. clevelandii*

Dargestellt ist die Verteilung von TVMV-*gfp* (A) und PVX201-*optRed* (B) bzw. TVMV-*gfp* (D) und TVMV-*red* (E); (C) und (F) sind die simultanen Projektionen von (A) und (B) bzw. (D) und (E).

3.3.12 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Verteilung von Viruspopulationen in Mischinfektionen

In den Untersuchungen, die in 3.3.5 bis 3.3.11 beschrieben wurden, traten zwei unterscheidbare Arten der Verteilung von Viruspopulationen auf. Es wurde einerseits die Möglichkeit der großflächigen Doppelinfection von Geweben taxonomisch nicht-verwandter Viren (PVX/Potyvirus-Kombinationen) festgestellt. Andererseits war die getrennte Verteilung von Viruspopulationen gleichen Ursprungs oder von nahe verwandten Potyviruspopulationen zu beobachten. Wie anhand ausgewählter Viruskombinationen in 3.3.10 und 3.3.11 gezeigt wurde, hatte auch die Verwendung PPV-Hüllprotein-transgener *N. benthamiana* Pflanzen

bzw. die Verwendung alternativer Wirtspflanzen keinen Einfluss auf die zuvor beobachtete Verteilungsform. Tabelle 3-12 fasst diese Ergebnisse noch einmal zusammen.

Tabelle 3-12 Zusammenfassende Darstellung von getrennter und gemeinsamer Verteilung verschiedener, unterschiedlich markierter Viruspopulationen

	<i>PVX201-gfp</i>	<i>PPV-NAT-AgfpS</i>	<i>TVMV-gfp</i>	<i>CIYVV-GFP</i>	<i>PVY-gfp</i>
<i>PVX201-optRed</i>	◄►	◄►	◄►	◄►	n.u.
<i>PVX0014-red</i>	◄►	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
<i>PPV-NAT-red</i>	◄►	◄►	◄►	◄►	◄►
<i>TVMV-red</i>	◄►	◄►	◄►	◄►	◄►
<i>PPV-NAT/SoC-red</i>	◄►	◄►	◄►	n.u.	n.u.

◄► beschreibt die Möglichkeit zur gemeinsamen Verteilung; ◄► beschreibt die getrennte Verteilung; n.u. = nicht untersucht

4 Diskussion

4.1 Entwicklung eines RT-PCR-Systems zum Nachweis rekombinanter PPV-NAT/TVMV-Sequenzen

Das Ziel der Untersuchungen war die Entwicklung eines RT-PCR-gestützten Nachweisverfahrens für die Identifizierung von rekombinanten PPV-NAT/TVMV-Sequenzen. Mit diesem System sollten mischinfizierte nicht-transgene *N. benthamiana* Pflanzen und TVMV-infizierte PPV-transgene *N. benthamiana* Pflanzen hinsichtlich des Auftretens rekombinanter Viren untersucht werden.

Eine Voraussetzung für ein homologes RNA-Rekombinationsereignis ist das Vorliegen sehr ähnlicher bzw. identischer Sequenzmotive auf Nukleotidebene, die einen Matrizenwechsel ("template switch") der viralen Replikase ermöglichen können (Bujarski & Nagy, 1996). Es können verschiedene Arten der Rekombination unterschieden werden, die im Wesentlichen vom Verwandtschaftsgrad der involvierten Nukleinsäuren, sowie von der Beschaffenheit der "crossover"-Region abhängen (siehe Kapitel 1.1.2). Neben der Sequenzhomologie werden weitere Sequenzmotive, die RNA-Rekombination begünstigen, wie z.B. Schleifenstrukturen oder AU- bzw. GC-reiche Sequenzen, postuliert (White & Morris, 1995; Nagy & Bujarski, 1995; Shapka & Nagy, 2004). Da es bei Potyviren kaum Hinweise auf derartige Rekombinations-"hot spots" gibt, wurde vor der Suche nach PPV-NAT/TVMV-Rekombinanten überprüft, ob konservierte Regionen zwischen beiden Viren existieren und wie groß diese sind. Sequenzvergleiche ergaben Homologien zwischen den Genomen von 56% bzw. zwischen den einzelnen Cistrons von 48% bis 62% (3.1.1). Diese Werte decken sich mit den Angaben von Shukla & Ward (1988). Die höchste Homologie konnte für das N1b abgeleitet werden (62%), in dem auch eine 16 Nukleotiden lange, perfekt konservierte Region (CR1) identifiziert werden konnte. Die zweite perfekt konservierte Region (18 nt; CR2) wurde im Hüllprotein lokalisiert. Damit waren zwei konservierte Regionen am 3'-Ende der Virusgenome identifiziert worden (Abbildung 2-1).

Für die 3'-Termini der BMV-RNAs 2 und 3 konnten Bujarski & Nagy (1996) zeigen, dass die Länge von 15 identischen Nukleotiden ausreichend war, rekombinante RNAs mit einer Effektivität von 50% nachzuweisen, wogegen bei einer Länge von neun Nukleotiden die Effektivität nur noch bei 4% lag. Bei natürlich vorkommenden Rekombinanten des PPV konnten die "crossover"-Ereignisse jeweils am 3'-terminalen Ende des N1b lokalisiert werden (Cervera et al., 1993; Glasa, 2002). Auch für das *Yam mild mosaic virus* (YMMV) wurden am

3'-Ende des Genoms das Vorkommen ein bis mehrerer Rekombinationsereignisse gezeigt (Bousalem et al., 2000). Dieser Bereich befindet sich ca. 840 Nukleotide stromabwärts von CR1 bzw. ca. 690 Nukleotide stromabwärts von CR2 (vergleiche 6.2 und 6.3 im Anhang). Ein Rekombinationsereignis bei CR1 oder CR2 bzw. im dazwischen liegenden Bereich schien aufgrund der Sequenzhomologien durchaus möglich. Es wurde daher für das weitere Vorgehen entschieden, den 3'-terminalen Bereich der Virusgenome bezüglich des Auftretens rekombinanter Viren in Mischinfektionen zu untersuchen. Dieser Bereich war zudem günstig, da die Daten bezüglich Rekombination mit Ergebnissen verglichen werden sollten, die aus transgenen Pflanzen gewonnen werden sollten, welche das PPV-Hüllprotein und die 3'-NTR bzw. Teile der 3'-NTR exprimierten.

Es wurden für PPV-NAT und TVMV jeweils drei Primerpaare entwickelt, deren Amplifikate drei kb des 3'-terminalen Genoms abdeckten. Der Test der homologen Primerpaare ergab, dass diese in einer Standard-RT-PCR zuverlässig die RNA von PPV-NAT bzw. TVMV spezifisch nachweisen konnten (Abbildung 3-4). Wurden dagegen die heterologen Primerkombinationen unter Standardbedingungen mit RNA aus Mischinfektionen verwendet, so traten zum Teil unspezifische Amplifikate auf (Abbildung 3-5). Zudem konnten auch in Mischungen von RNAs aus einzeln infizierten Pflanzen mit einigen heterologen Primerkombinationen nicht erwartete Fragmente amplifiziert werden (Abbildung 3-6). Als Ursache hierfür kam die unspezifische Bindung eines bzw. beider Primer an die jeweilige nicht-parentale RNA oder aber eine artifizielle (*in vitro*) Rekombination während der RT-PCR in Frage. Im Falle des Primers P10- wurde tatsächlich eine unspezifische Bindung an die TVMV-RNA nachgewiesen. Da beide Fälle im Weiteren zu falsch positiven Ergebnissen geführt hätten, musste die Standard-RT-PCR optimiert werden (3.1.4). Bis zu diesem Zeitpunkt wurde eine AMV-Reverse Transkriptase mit RNase H-Aktivität (RNase H⁺) verwendet. Für retrovirale RNase H⁺-Reverse Transkriptasen ist bekannt, dass diese durch den Wechsel der Matrize künstlich rekombinante Sequenzen erzeugen können (Ben-Artzi et al., 1992). Verantwortlich für diesen Wechsel ist vermutlich die RNase H-Aktivität des Enzyms. Hierbei wird während der reversen Transkription die RNA des DNA/RNA-Hybridmoleküls degradiert, wodurch eine neue Nukleinsäure an den freiwerdenden DNA-Strang angelagert werden kann. Unter bestimmten Umständen kann dann der Matrizenwechsel erfolgen (Svarovskaia et al., 2000). Die Fähigkeit zum Matrizenwechsel ist teilweise derart ausgeprägt, dass RNase H⁺-Reverse Transkriptasen gezielt für die Herstellung von chimären Sequenzen eingesetzt werden können (Zhu et al., 2001). Zudem besteht beim Vorliegen von Matrizen mit homologen Sequenzen die Möglichkeit, dass unvollständig prozessierte Transkripte als Primer fungieren und es auf diese Weise zu *in vitro*-Rekombinanten kommen kann (Shuldiner et al., 1989; Brakenhoff et al., 1991; Meyerhans et al., 1990). Um der Möglichkeit einer *in vitro*-Rekombination durch die AMV-RT vorzubeugen, wurde auf eine

RNase H⁻-Reverse Transkriptase (Invitrogen Kit) zurückgegriffen (3.1.4). Bei dieser Reversen Transkriptase handelte es sich um eine MMLV-Polymerase, die durch Einfügen einer Mutation keine RNase-Aktivität mehr aufwies. Bei dem Einsatz dieser Reversen Transkriptase kam es bei der Verwendung von heterologen Primerkombinationen zu Beginn ebenfalls zu falsch positiven Ergebnissen, insbesondere mit dem Primer P10- (3.1.4). Wie bereits angeführt, war dies auf suboptimale Primerspezifität zurückzuführen. Der Ersatz des P10- Primers wurde aber nicht in Erwägung gezogen, da eine erneute Suche in der 3'-NTR keinen adäquaten Primer hervorbrachte und zudem ein kalkulierbares falsch positives Ergebnis vorlag. Durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen – im Wesentlichen die Erhöhung der Hybridisierungstemperatur und eine Reduktion der Zykluszahl – konnte die Amplifikation unspezifischer Produkte fast vollständig unterdrückt werden (Abbildung 3-9).

Um die Sensitivität zu überprüfen, mit der mittels RT-PCR rekombinante PPV-NAT/TVMV-Sequenzen detektiert werden können, wurde eine chimäre Sequenz hergestellt (3.1.5.1) und ihre Detektion in einer Verdünnungsreihe durchgeführt (3.1.5.2). Die Überprüfung wurde beispielhaft mit der Primerkombination T10+/P10- vorgenommen. Die erreichte Detektionsgrenze von 100 fg bis 10 fg (Abbildung 3-11) liegt im Rahmen der Herstellerangaben zur Sensitivität der Kombination SuperScript™ RT/Platinum® Taq und konnte auch einer anderen Arbeitsgruppe zur Detektion von CMV/TAV-Rekombinanten erreicht werden (Dr. M. Tepfer, pers. Mitteilung). In der Literatur findet sich bei Koenig & Buettnner (2004) in einem vergleichbaren Versuchsansatz eine Detektionsgrenze von einem rekombinanten Molekül in 10⁶ Molekülen.

Es wurde ein RT-PCR-Verfahren entwickelt, mit dem bei einem Detektionslimit von 1:10⁶ die technische Nachweisgrenze erreicht wurde und daher ein sensitiver Nachweis von Rekombinanten aus Mischinfektionen möglich ist.

4.1.1 Untersuchungen von PPV-NAT/TVMV-Mischinfektionen nicht-transgener Pflanzen hinsichtlich des Auftretens rekombinanter Viren

Bei der Untersuchung von 100 PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten, nicht-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen mit elf heterologen Primerkombinationen konnten keine Hinweise auf das Auftreten von rekombinanten Viren gefunden werden (3.1.6). Da die RNA-Proben zu je fünf Proben zusammengefasst wurden, entspricht dies ohne Versuchswiederholungen 220 Einzelnachweisen. Einen vergleichbaren Ansatz gibt es in der Literatur nur bei Aaziz & Tepfer (1999b), die bereits in drei von 82 CMV/TAV-doppelinfizierten Pflanzen rekombinante Viren nachweisen konnten. Versuche mit rekombinanten Viren wurden in der Vergangenheit in der Regel mit künstlich hergestellten Rekombinanten durchgeführt (Greene & Allison,

1994; Varrelmann et al., 2000; Paalme, 2004), wobei diese entweder *in vitro* hergestellt oder *in vivo* mit sehr hohem Selektionsdruck erzeugt wurden. Im vorliegenden System bestand jedoch kein Selektionsdruck, der die Entstehung oder Durchsetzung eines rekombinanten Virus begünstigt hätte. Allerdings ist, wie bereits angeführt, für PPV das Vorkommen von natürlichen Rekombinanten belegt (Cervera et al., 1993; Glasa, 2002). Über die Rolle eines Selektionsdruckes bei der Durchsetzung dieser Rekombinanten, bzw. über die Verhältnisse von natürlichen Mischinfektionen mit unterschiedlichen PPV-Isolaten gibt es keine Angaben, da diese Viren aus natürlichen Wirten stammten und eine natürliche Selektion bereits stattgefunden hatte. Hierbei ist die Ausprägung Fitness der Viren bzw. Rekombinanten von Bedeutung (Tepfer, 2000). Dies ist eine inhärente Eigenschaft aller Viren, und nur eine vergleichbare oder erhöhte Fitness kann die erfolgreiche Konkurrenz mit den Elternviren ermöglichen. Der Selektionsdruck und damit auch die Fitness scheinen in Mischinfektionen eine wichtige Rolle zu spielen. Fernández-Cuartero et al. (1994) konnten in ihrer Studie für eine CMV/TAV-Rekombinante kompetitive Eigenschaften und eine erhöhte Fitness belegen. Diese Eigenschaften wurden von Aaziz & Tepfer (1999b) bei den identifizierten Rekombinanten nicht untersucht. Sie könnte aber ein Beitrag dazu sein, dass die CMV/TAV-Rekombinanten trotz des geringen Selektionsdruckes in einer CMV/TAV-Mischinfektion überhaupt ein quantitativ nachweisbares Niveau erreichten.

Die Literaturdaten zeigen also, dass in einer Mischinfektion zweier verschiedener Viren eine kompetitive Rekombinante entstehen kann und lassen indirekt den Schluss zu, dass möglicherweise ein Nachweis stark von der Durchsetzungsfähigkeit der rekombinanten Nachkommenschaft abhängen kann. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund der in 3.1.1 aufgezeigten Sequenzhomologien PPV-NAT/TVMV-Rekombinante auftreten können, diese aber aufgrund der Nachweisgrenze nicht detektiert werden können. Es ist also fraglich, ob das alleinige Vorliegen von Sequenzhomologie ausreichend ist, ein messbares Auftreten rekombinanter Nachkommen zu ermöglichen, bzw. dass eine rekombinante Nachkommenschaft in der PPV-NAT/TVMV-Mischinfektion u.U. nicht kompetitiv ist und daher nicht bis zu einer nachweisbaren Menge repliziert wird.

Darüber hinaus ist es auch vorstellbar, dass PPV-NAT und TVMV für Rekombinationsereignisse *per se* nicht kompatibel sind, da z.B., wie im Allgemeinen bei Viren angenommen, die 3'-NTR nur von der jeweiligen dazugehörigen RdRp akzeptiert werden (Dreher, 1999). Diese Voraussetzung ist bei dem "Modell"-Virus zur RNA-Rekombination BMV gegeben, da es sich wie auch bei CMV oder TAV um ein multipartites Virus handelt, das auf RNA-Ebene über sehr ähnliche 3'-Enden verfügt. Die RNAs 3 der Cucumoviren weisen Übereinstimmungen von ca. 63% auf (Carrère et al., 1999), wobei aber weitere 20 bis 30 Nukleotide große Abschnitte mit Übereinstimmungen zwischen 90 und 100% bestehen (Carrère et al., 1999; Aaziz & Tepfer, 1999b). Die von Aaziz & Tepfer (1999b) berichteten Rekombinations-

ereignisse zwischen den RNAs 3 von CMV und TAV fanden in längeren Bereichen (54 Nukleotide) sehr hoher Sequenzidentität (über 90%) im MP-Cistron statt. Neben der Sequenzidentität scheinen auch weitere sekundäre Strukturen und interne Promoter-ähnliche Motive bei CMV/TAV eine wichtige Rolle zu spielen (Suzuki et al., 2003). Ähnliche Strukturen sind für Potyviren nicht beschrieben. Die Sequenzidentitäten bei den hier verwendeten Potyviren sind im Vergleich zum CMV/TAV-Beispiel wesentlich weniger umfangreich, da nur einige Cistrons höhere Ähnlichkeiten zwischen 56% bzw. 62% aufweisen und innerhalb dieser Regionen die Ausdehnung identischer Bereiche mit nicht mehr als 18 Nukleotiden geringer ist (Tabelle 3-1).

Des Weiteren könnte die Tatsache, dass CMV und TAV auch über einen gemeinsamen natürlichen Wirt verfügen dazu beitragen, dass die Ergebnisse einer CMV/TAV-Rekombination zu lebens- und durchsetzungsfähigen Nachkommen führt. Allerdings sind auch CMV/TAV-Rekombinante nicht grundsätzlich lebensfähig. Salánki et al. (2004) zeigten für diese Viruskombination, dass artifizielle Austausch von MP und Hüllprotein auch zu nicht-ausbreitungsfähigen Rekombinanten führen können. Die Autoren führen dies darauf zurück, dass aufgrund der Rekombination das elektrostatische Potential der Hüllprotein-Oberfläche derart verändert war, dass es zum Verlust der Ausbreitungsfunktion kam.

Dies könnten Gründe dafür sein, dass Rekombinationen zwischen Potyviren wahrscheinlich selten sind. Innerhalb einer Population wird jedoch der Faktor Rekombination bei einigen Potyviren, wie z.B. dem YMMV (Bousalem et al., 2000; 2003), eine wichtige Rolle bei der Wirtsadaptation zugewiesen. Revers et al. (1996) zeigten anhand statistischer Sequenzvergleiche, dass in 18 von 109 Potyvirusisolaten Rekombination nachweisbar bzw. anzunehmen ist. Dieser Nachweis war bei vier von acht Spezies möglich und kam bei PVY und BCMV am stärksten zum Tragen. Die PVY-Stämme PVY^{N:O}, PVY^N-Wilga und der europäische PVY^{NTN} wurden ebenfalls als rekombinant identifiziert (Nie & Singh, 2002a; b; Boonham et al., 2002).

Bei grundlegenden Studien hinsichtlich der RNA-Rekombination bei Pflanzenviren (Bujarski & Nagy, 1996; Nagy & Bujarski, 1995; Nagy & Simon, 1997; 1998a; 1998b) handelte es sich um Rekombinationen innerhalb der RNAs multipartiter Viren, die über ausgedehnte homologe Bereiche verfügen. Es ist daher davon auszugehen, dass bei diesen multipartiten ein hohes Maß an Kompatibilität vorliegt. Bei lebensfähigen *in vivo*-erzeugten Rekombinanten multipartiter Viren liegen die "crossover"-Orte in Bereichen hoher Sequenzidentität, oder es handelt sich um Austausch ganzer kodierender Einheiten ("reassortment") (Masuta et al., 1998; Salánki et al., 2004). Bei den in dieser Studie verwendeten Potyviren dagegen liegt mit der Polyproteinprozessierung (Abbildung 1-1) eine von den Cucumoviren (CMV, TAV) grundlegend verschiedene Genomexpression vor. Hier können nur exakte Austausche, die nicht das offene Leseraster zerstören, zu zumindest theoretisch lebensfähigen

Rekombinanten führen. Dies wird auch von Moreno et al. (2004) unterstützt, die zeigen konnten, dass bei dem Potyvirus WMV zwar Rekombinante innerhalb einer WMV-Population auftreten, jedoch im Zuge der Evolution der Population unter natürlichen Bedingungen gegen chimäre Proteine selektiert wird. Allerdings konnten Varrelmann et al. (2000) nachweisen, dass artifizielle PPV-Mutanten, die über chimäre Hüllproteine mit einem Austausch der Kernregion gegen die korrespondierende Region eines anderen Potyvirus verfügen, in der Lage waren, *N. benthamiana* Pflanzen systemisch zu infizieren. Silbernagel et al. (2001) konnten zeigen, dass BCMV und BCMNV über drei Jahre hinweg in einer Mischinfektion stabil waren und keine rekombinanten Viren nachgewiesen werden konnten. Solche traten erst unter Selektionsdruck auf, wenn die Mischinfektion in Pflanzen durchgeführt wurde, die gegen eines der Viren resistent sind. Künstlich hergestellte Potyviren mit rekombinanten Proteinen (Hüllprotein) können aber auch zu infektiösen Viren führen (Gal-On et al., 1998; Varrelmann et al., 2000), wobei eine längerfristige Beobachtung dieser Viren unter kompetitiven Bedingungen nicht stattfand. Allerdings fanden Moreno et al. (2004) einen Anteil von rekombinanten WMV von etwa 7% in der Gesamtpopulation. Das heißt, dass innerhalb einer WMV-Wildpopulation theoretisch in jeder vierzehnten untersuchten Probe ein rekombinantes Virus nachweisbar sein müsste. Allerdings basieren diese Angaben auf einem statistischen Ansatz, wobei keine rekombinanten Sequenzen an sich nachgewiesen wurden, sondern aus der verwandtschaftlichen Distanz einzelner Cistrons indirekt auf rekombinante Genome geschlossen wurde. Auch in der Studie von Tomimura et al. (2003) wurde berichtet, dass von 38 isolierten und phylogenetisch untersuchten Sequenzen des *Turnip mosaic virus* (TuMV) ein fünftel rekombinant waren. Da es sich bei PPV-NAT und TVMV jedoch um verschiedene Potyviren handelt, kann davon ausgegangen werden, dass der Anteil rekombinanter Viren entsprechend kleiner sein muss. Aufgrund der hohen Rate von 7% bei WMV erscheint es dann aber dennoch als unverständlich, dass bei PPV-NAT/TVMV keine Rekombinanten gefunden wurden. Bereits bei einer theoretischen Rekombinationsrate von 0,5% hätte in 220 Proben wenigstens eine Rekombinante gefunden werden müssen. Da jedoch keine rekombinanten PPV-NAT/TVMV-Sequenzen gefunden wurden, ist es am wahrscheinlichsten, dass Rekombination im 3'-terminalen Bereich dieser Viren nicht im detektierbaren Maß stattgefunden hat. Es gibt zwar keine dem PPV-NAT/TVMV-Ansatz vergleichbare veröffentlichte Untersuchungen, jedoch konnten auch andere Arbeitsgruppen in Mischinfektionen von unterschiedlichen Potyviren (PPV/PVY bzw. PVA/PVY) keine Rekombinanten nachweisen (Dr. E. Balázs & Dr. P. Palukaitis pers. Mitteilung).

Eine weitere Möglichkeit warum keine rekombinanten Sequenzen nachgewiesen wurden, ist die Tatsache, dass ein doppeltes Rekombinationsereignis innerhalb der mit heterologen Primerpaaren amplifizierten Fragmente stattgefunden haben könnte. Eine solche

Doppelrekombination wäre mit den angesprochenen Primerkombinationen nicht detektiert worden. Es kann zwar angenommen werden, dass derartige Ereignisse sehr selten sind (Varrelmann et al., 2000), ganz ausgeschlossen werden können sie allerdings nicht. Darüber, ob dies in den vorliegenden Untersuchungen eine Rolle gespielt haben könnte, kann nur spekuliert werden, da es weitergehende Hinweise aus der Literatur hierzu nicht gibt. Da durch die Primerkombinationen die im 3'-terminalen Bereich des Genoms wahrscheinlichsten Orte für Rekombinationsereignisse – die homologen Bereiche CR1 und CR2, sowie das 3'-Ende des N1b – flankiert wurden, kann zumindest geschlussfolgert werden, dass diese Regionen als bevorzugte Sequenzmotive für eine RNA-Rekombination zwischen PPV-NAT und TVMV keine Rolle zu spielen scheinen.

Sowohl die Kernbereiche, als auch der 5'-Terminus der untersuchten Potyviren wurden nicht hinsichtlich Rekombinationsereignissen untersucht. Damit sind etwa zwei Drittel beider Genome bei der Suche nach Rekombinationsereignissen nicht berücksichtigt worden. Rekombination kann auch im 5'-terminalen Bereich von Potyviren stattfinden (Tomimura et al., 2003; Nie & Singh, 2003b). Jedoch gibt es zurzeit keinen Hinweis in der Literatur, dass in einem experimentellen System ohne Selektionsdruck in einer Mischinfektion zweier verschiedener Potyviren Rekombinante gefunden wurden. Um jedoch Anhaltspunkte über Rekombinationsraten und bevorzugte bzw. involvierte Sequenzen, die das Auftreten von RNA-Rekombination begünstigen zu erlangen, sind weitere Studien von Mischinfektionen wichtig. Allerdings muss darüber nachgedacht werden, ob für die Risikobewertung von VRTP eventuell der Versuchsansatz hinsichtlich Selektionsdruck und der verwendeten Viruskombinationen modifiziert werden muss. Mögliche alternative Vorgehensweisen werden in 4.5 diskutiert.

4.1.2 Untersuchungen von TVMV-infizierten PPV-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen hinsichtlich des Auftretens rekombinanter Viren

In TVMV-infizierten, PPV-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen der Linien 4.30.45 und 17.27.4 (2.1.1) sollte untersucht werden, ob und wie häufig rekombinante PPV-NAT/TVMV-Sequenzen auftreten. In allen untersuchten transgenen Pflanzen konnten, wie bei den unter 4.1.1 erläuterten Ergebnissen, keine Hinweise auf Rekombinationsereignisse zwischen TVMV- und PPV-NAT-Sequenzen gefunden werden (Abbildung 3-14).

Analog zu den im vorangegangenen Kapitel bereits diskutierten Ergebnissen für die Verhältnisse in PPV-NAT/TVMV-mischinfizierten *N. benthamiana* Pflanzen kann der nicht erbrachte Nachweis von PPV-NAT/TVMV-Rekombinanten in PPV-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen mehrere Gründe haben. Zum einen ist es auch hier möglich, dass Rekombination

in den PPV-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen stattfand, aber unterhalb des Detektionslimits der RT-PCR lag. Jedoch gilt möglicherweise auch bei diesen Versuchen, dass das alleinige Vorkommen eines Rekombinationsereignisses wahrscheinlich nicht ausreichend ist, um Rekombinante quantitativ nachweisen zu können, sondern kompetitive Nachkommen bis zu einem nachweisbaren Niveau repliziert werden müssen. Allerdings sind die Bedingungen für ein Durchsetzen eines rekombinanten Virus in TVMV-infizierten PPV-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen von den Bedingungen in mischinfizierten, nicht-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen verschieden. Ein in den PPV-VRTP auftretendes, rekombinantes Virus würde das bzw. einen Teil des PPV-Hüllproteins in sein Genom inkorporiert haben. Da es sich bei den verwendeten *N. benthamiana* Linien um Pflanzen mit einer RNA-vermittelten Resistenz gegenüber PPV handelt (Varrelmann, 1999), wäre es theoretisch möglich, dass sich diese Resistenz dann auch gegen die homologen PPV-Sequenzen der PPV/TVMV-Chimäre richten würde. Dies könnte dazu führen, dass sich in Folge einer sequenzspezifischen Degradation der Resistenzmechanismus gegen die Rekombinante richtet. Allerdings stammen die in der Literatur veröffentlichten Rekombinanten aus VRTP, die – soweit berichtet – keine ausgeprägte Resistenz gegenüber den Elternviren der Rekombinante aufwiesen. Greene & Allison (1996) berichteten über Rekombinationsereignisse von Hüllprotein-defekten CCMV in CCMV-transgenen Pflanzen. Diese Pflanzen waren zwar transgen, konnten jedoch von CCMV bzw. von den in diesen Pflanzen generierten Rekombinanten, infiziert werden. Bei letzteren kam es zu systemischen Infektionen in dem untersuchten Zeitraum von zwei bis fünf Wochen nach der Inokulation. Auch die Ergebnisse von Schoelz & Wintermantel (1993) hinsichtlich der Rekombination von CaMV in CaMV-transgenen Pflanzen stammten aus Pflanzen, die von Stämmen bzw. Mutanten des CaMV über einen beobachteten Zeitraum über 40 Tagen systemisch infiziert werden konnten. Für diese Ansätze mit CCMV bzw. CaMV ist also durchaus vorstellbar, dass ein PTGS-Mechanismus in den transgenen Pflanzen nicht oder sehr spät greift und es daher rekombinanten Viren ermöglicht wird, sich in der Pflanze zu etablieren. Aber auch bei einer vorerst herabgesetzten bzw. verzögerten Resistenzreaktion der in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen, bedingt durch die "recovery"-Resistenz, wäre nicht nur Komplementation (Varrelmann & Maiss, 2000), sondern auch Rekombination in der Linie 4.30.45 möglich (Varrelmann et al., 2000). Dennoch stünde eine Rekombinante zusätzlich unter dem starken kompetitiven Einfluss des TVMV-Elternteils, der sich in diesen Pflanzen problemlos vermehren kann. Diese beiden Faktoren können dazu beitragen, dass eine eventuell entstandene PPV-NAT/TVMV-Rekombinante in den PPV-transgenen *N. benthamiana* Pflanzen keine Möglichkeit hatte sich durchzusetzen und in diesen Pflanzen kein positiver Selektionsdruck für chimäre Viren bestand. Auch Koenig & Büttner (2004) argumentieren,

dass mit steigender Resistenz von VRTP bzw. mit der Anwesenheit von gut adaptierten Elternviren, das Entstehen von rekombinanten Nachkommen nicht zu erwarten ist.

In den o.g. Arbeiten, in welchen Rekombinante aus VRTP isoliert wurden, leitete sich die Herkunft des Transgens von dem infizierenden Virus, bzw. von nahe verwandten Stämmen ab. Die für eine RNA-Rekombination wichtige Sequenzhomologie (Bujarski & Nagy, 1996) lag in diesen VRTP/Viruskombinationen offensichtlich vor, so dass rekombinante Viren isoliert werden konnten. Dies scheint bei PPV-NAT und TVMV nicht der Fall zu sein, da, wie oben bereits angedeutet, die größte Sequenzhomologie in einigen Bereichen des Genoms 62% nicht überschreiten. Allerdings muss fehlende Homologie zwischen Virus und Transgen nicht zwangsläufig der Grund für das Ausbleiben von Rekombinanten sein. So fanden Koenig & Büttner (2004) in einem System mit sehr eng verwandten BNYVV-Sequenzen (A- und B-Typ) ebenfalls keine Rekombinanten in VRTP, die das BNYVV-Hüllprotein des A-Typs exprimierten und mit BNYVV-B infiziert worden waren (s.o.).

Es bleibt daher auch die Frage, inwieweit die Sequenzhomologie zwischen Virus und Transgen zum Entstehen von Rekombinanten beiträgt. Wie oben diskutiert, scheint der Selektionsdruck in diesen Systemen eine entscheidende Rolle zu spielen. Hinzu kommt, dass eventuell die Anwesenheit von gut adaptierten Elternviren die Durchsetzung von Rekombinanten beeinträchtigt. Sollen diese Faktoren im Experiment beeinflusst werden, so müssen möglichst sequenzverwandte Rekombinationspartner verwendet werden, bei welchen bekannt ist, dass ein entsprechendes Rekombinationsereignis zu kompetitiven Nachkommen führt. Ein entsprechender Ansatz wird in 4.5 diskutiert.

4.2 Versuche mit *in vitro*-hergestellten PPV-Rekombinanten

Die Untersuchung von Auswirkungen eines Rekombinationsereignisses in einem viralen Genom kann anhand von künstlich hergestellten Rekombinanten untersucht werden (3.2). Es wurde im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ein rekombinanter "full-length"-Klon, basierend auf p35PPV-NAT (Maiss et al., 1992), hergestellt, bei dem die Hüllprotein-kodierende Sequenz durch die korrespondierende Region aus dem PPV-Isolat PPV-SoC ersetzt wurde (Al Abdallah, 2002).

Zu Vergleichszwecken wurde ein ähnliches Virus auf der Basis von PPV-NAT verwendet, bei dem die ausgetauschte Hüllproteinsequenz aus dem PPV-Isolat PPV-AT stammte (Prof. Dr. E. Maiß, pers. Mitteilung). Die beiden hier verwendeten Rekombinanten unterscheiden sich grundsätzlich von *in vivo*-erzeugten Rekombinanten, da die Sequenzaustausche ent-

sprechend der Klonierungsstrategie gewählt wurden und nicht bekannt ist, ob ähnliche Rekombinante auch unter natürlichen Bedingungen entstehen können. Die Ergebnisse können daher nur bedingt auf *in vivo*-Rekombinante übertragen werden.

Symptomausprägung bei PPV-NAT/SoC und PPV-NAT/AT

Die Symptomausprägung von PPV-NAT/SoC in systemisch infizierten *N. benthamiana* Pflanzen war gegenüber den Elternviren uneinheitlich (Al Abdallah, 2002; Ziebell, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass in Wintermonaten mit entsprechend niedrigen Temperaturen und geringerer Sonneneinstrahlung im Gewächshaus kaum Symptomunterschiede zu erkennen waren. Dagegen rief PPV-NAT/SoC im Sommer deutlich stärker Symptome als die Elternviren hervor. Zwar war unter Gewächshausbedingungen (2.2.1) dieser Effekt in zwei aufeinander folgenden Jahren reproduzierbar. Jedoch wurden die Beobachtungen zur Auswirkung der Temperatur auf die Symptomausprägung nicht unter definierten Bedingungen (z.B. Klimakammern) verifiziert. Für verlässliche Schlussfolgerungen hinsichtlich der Auswirkungen des Hüllproteinaustausches auf den Symptomverlauf unter variierten Temperaturbedingungen kann allerdings auf Daten aus Versuchen mit definierten Bedingungen nicht verzichtet werden. Der hier beschriebene Temperatureffekt kann daher nur unter Vorbehalt betrachtet, bzw. als Tendenz gewertet werden.

Die Replikationsrate, bzw. die durch ELISA bestimmte Hüllproteinmenge in PPV-NAT bzw. PPV-NAT/SoC-infizierten Pflanzen, konnte nicht mit der Symptomausprägung korreliert werden, da PPV-NAT-Proben grundsätzlich höhere Hüllprotein-Gehalte aufwiesen, als die von PPV-NAT/SoC (Al Abdallah, 2002; Ziebell, 2003). Es ist bekannt, dass verschiedene PPV-Isolate im Infektionsverlauf durchaus unterschiedlich auf veränderte Temperaturen der Umgebung reagieren (Glasa et al., 2003). Erstaunlich dagegen war die Tatsache, dass PPV-NAT/SoC bei höheren Temperaturen stärkere Symptome verursachte als PPV-NAT, da der Virustiter mit steigender Temperatur und damit auch die Symptomausprägung bei PPV abnehmen (Manganaris et al., 2003). Diese Tatsache erklären Szyttia et al. (2003) damit, dass im Abwehrsystem der Pflanzen die Bildung von siRNAs bei kühleren Temperaturen herabgesetzt ist, bei höheren Temperaturen jedoch nicht. Dies würde bedeuten, dass PPV-NAT/SoC, welches sich bei moderaten Temperaturen wie die Elternviren verhält, bei höheren Temperaturen ein besseres Vermögen besitzt, das Pflanzenabwehrsystem zu überwinden. Da die Viren sich jedoch nur im Hüllprotein voneinander unterscheiden und der genetische Hintergrund bzw. das restliche Genom identisch ist, muss dieser Abschnitt an der Symptomausprägung beteiligt sein. Dies war ebenfalls nicht zu erwarten, da z.B. der Austausch von über 80% der PPV-Hüllproteins gegen die entsprechende Region des ZYMV

nicht zu Änderungen in der Symptomausprägung führten (Tobias et al., 2001). Wenn sich dieser Effekt unter definierten Bedingungen z.B. in einer Klimakammer bestätigen ließe, wäre dies der erste Anhaltspunkt für den Einfluss eines potyviralen Hüllproteins auf die Symptomausprägung in systemisch infizierten Pflanzen. Aus den o.g. Gründen wäre diese Schlussfolgerung zum jetzigen Zeitpunkt aber verfrüht.

Die Symptomausprägung auf dem Lokalläsionenwirt *C. quinoa* der Rekombinanten PPV-NAT/SoC bzw. PPV-NAT/AT wurde ebenfalls untersucht (3.2). Hier konnte in mehreren Versuchsdurchläufen wiederholt gezeigt werden, dass der Hüllproteinaustausch einen Effekt auf die Symptomausprägung hatte, da die artifiziellen Rekombinanten sehr ausgeprägte Lokalläsionen erzeugten, die Elternviren dagegen nicht. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich zumindest im Fall von PPV-NAT eventuell um sehr kleine Läsionen handelte (Maiss et al., 1992), auch wenn hierzu keine Anhaltspunkte im TPIA gefunden wurden (Abbildung 3-14). Unabhängig davon waren die Unterschiede der Lokalläsionen zwischen den Elternviren und beiden Rekombinanten deutlich. Bislang galten bei den Potyviren besonders die HC-Pro und angrenzende Bereiche im P1 bzw. P3/6K1 als Determinanten für die Symptomausprägung (Vance et al., 1995; Sáenz et al., 2000; Yang & Ravelonandro, 2002). Allerdings scheint bei den Potyviren auch eine Interaktion zwischen der HC-Pro und dem freien Hüllprotein, also nicht dem Virion, vorzuliegen (Roudet-Tavert et al., 2002), so dass eventuell ein indirekter Einfluss des Hüllproteins auf die Symptomausprägung über eine Interaktion mit der HC-Pro theoretisch möglich wäre. Für verschiedene Isolate des Potyvirus BCMV zeigten Zheng et al. (2002), dass eine unterschiedliche Symptomausprägung mit Variationen im 5'-terminalen Bereich korreliert werden kann. Eine Rolle des Hüllproteins in Verbindung mit dem Ausbreitungsprotein bei der Symptomausprägung wurde für das CMV von Suzuki et al. (1995) bzw. Takeshita et al. (2001) gezeigt. Auch für andere Pflanzenviren werden nicht-Strukturproteine mit den auftretenden Symptomen in Verbindung gebracht (Unselde et al., 2000). Bei Paalme et al. (2004) wurden zwischen zwei PVA-Isolaten mehrere Genomabschnitte ausgetauscht. Zwar fand ein ausschließlicher Austausch der Hüllprotein-kodierenden Region nicht statt, jedoch zeigten Rekombinante mit Austausch des 3'-terminalen Endes (Hüllprotein mit Teilen aus NIa und NIb) ebenfalls von den Elternviren abweichende Symptome. Einen Einfluss des Hüllproteins auf die Symptomausprägung kann aus den Ergebnissen von Paalme et al. (2004) aber nicht abgeleitet werden.

Eine Änderung im Wirtspflanzenspektrum von PPV-Rekombinanten fand bei dem Vergleich von PPV-NAT/SoC bzw. PPV-NAT/AT mit PPV-NAT und PPV-SoC insofern statt, als dass die Rekombinanten im Gegensatz zu den Elternviren deutliche Lokalläsionen auf *C. quinoa* hervorrufen konnten. Zwar konnten Tobias et al. (2001) in der oben angesprochenen PPV/ZYMV-Chimären keine entsprechenden Unterschiede im Wirtspflanzenspektrum

nachweisen. Jedoch wurde für das Caulimovirus CaMV eingehend beschrieben, dass rekombinante Viren durchaus ein vom Elternvirus abweichendes Wirtspflanzenspektrum zeigen können (Allison et al., 1997). Auch bei RNA-Viren kann das Einbringen von einzelnen bzw. mehreren Mutationen in nicht-Strukturproteine, wie z.B. das Ausbreitungsprotein des TMV (Toth et al., 2002), die Wirtsspezifität des Virus ändern. Zudem legten Sáenz et al. (2002) nahe, dass beim PPV die HC-Pro einen wesentlichen Einfluss auf das Wirtspflanzenspektrum hat. Auch Hammond & Hammond (2003) konnten für verschiedene Isolate des *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) zeigen, dass verschiedene Regionen (5'-NTR, P1, NIa/VPg, HC-Pro, P3) Einfluss auf die Symptomausprägung und das Wirtspflanzenspektrum haben. Zwischen verschiedenen Hüllproteinsequenzen des BYMV fanden die Autoren zwar Unterschiede, konnten jedoch keinen Einfluss auf die Symptomausprägung bzw. auf das Wirtspflanzenspektrum ableiten. Jedoch zitieren Hammond & Hammond (2003) eine Arbeit von Sasaya et al. (1998), die das Wirtspflanzenspektrum von BYMV-Isolaten mit einem auf dem BYMV-Hüllprotein basierenden, phylogenetischen Stammbaum korrelieren konnten. Detaillierte, auf molekularbiologischen Methoden aufbauende Bereiche, die eine direkte Verbindung von Nukleinsäure- oder Aminosäureaustauschen und der Symptomausprägung oder des Wirtspflanzenspektrums bei Potyviren schlüssig nachweisen, gibt es nicht.

Auch wenn der Hüllproteinaustausch bei PPV-NAT/SoC und PPV-NAT/AT offensichtlich zu veränderten Symptomen und einem abweichenden Wirtspflanzenspektrum führte, so ist der Grund hierfür nicht bekannt. Dieser kann bereits in einem bzw. wenigen Aminosäuresubstitutionen begründet sein (Suzuki et al., 1995); zu beachten ist jedoch, dass bei den verwendeten PPV-Hüllproteinen das nicht-aphidenübertragbare NAT-Hüllprotein über eine Deletion von 15 Aminosäuren, die auch das für die Blattlausübertragung wichtige DAG-Motiv beinhaltet. Unter Vorbehalt kann argumentiert werden, dass infolge dieser Deletion eine gestörte oder keine HC-Pro/CP-Interaktion mehr vorliegt und so der mutmaßliche, indirekte Einfluss des Hüllproteins auf Symptomausprägung und Wirtsspektrum über die HC-Pro (s.o.) nicht stattfinden kann. Um den Einfluss des Hüllproteins auf die Bildung der Lokalläsionen auf *C. quinoa* Blättern genau zu charakterisieren, müsste untersucht werden, ob und welche Nukleotid- oder Aminosäureaustausche zwischen NAT und SoC bzw. NAT und AT eine Rolle spielen. Hierfür könnten als erster Ansatzpunkt für die Untersuchungen die in der Blattlausübertragung wichtigen Motive DAG im Hüllprotein und KITC in der HC-Pro bei den Rekombinanten durch Einfügen von Mutationen modifiziert und anschließend auf die Symptomausprägung bei *C. quinoa* untersucht werden. Eine genaue Charakterisierung dieses Sachverhalts ist wichtig, da ein Einfluss des viralen Hüllproteins auf die Symptomausprägung bzw. den Wirtspflanzenkreis möglicherweise die Nutzung von Hüllprotein-kodierenden, potyviralen Sequenzen bei der Herstellung von VRTP berücksichtigt werden muss. Einen solchen Schluss lassen die hier diskutierten Ergebnisse

jedoch nicht zu. Da die vorliegenden Ergebnisse keine getrennte Sicht auf Symptomausprägung und Wirtsspektrum zulassen, wäre es interessant, Anhaltspunkte darüber zu gewinnen, ob diese beiden Faktoren grundsätzlich miteinander verknüpft sind, oder ob diese auch unabhängig voneinander betrachtet werden können.

4.3 Verteilung fluoreszenzmarkierter Viren in Mischinfektionen

Da es wenig Anhaltspunkte über die Verteilung von Pflanzenviren in Mischinfektionen gibt (Aaziz & Tepfer, 1999a), sollten unterschiedlich markierte Viren hergestellt und in Doppelinfektionen auf ihre Verteilung hin untersucht werden (3.3). Vor dem Hintergrund der Suche nach PPV-NAT/TVMV-Rekombinanten sollten diese Untersuchungen Aufschluss darüber geben, ob und wie viele Zellen in Mischinfektionen doppelinfiziert werden, da das Vorliegen beider Viren die Voraussetzung für ein Rekombinationsereignis ist.

Der Nachweis der unterschiedlichen markierten Viren in Mischinfektionen wurde durch die Verwendung der Fluoreszenzmarker smRS-GFP und DsRed erreicht. Die Detektion der Fluoreszenz von smRS-GFP und DsRed erfolgte fluoreszenzmikroskopisch (3.3.1). Bei der einfachen und schnellen Überprüfung, ob die Markergene exprimiert werden, ist die Nutzung eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops (Axiophot) von Vorteil. Allerdings wird hierbei die Abbildung der Markerfluoreszenz z.T. erheblich von der roten Autofluoreszenz des Pflanzengewebes gestört. Ursächlich für die pflanzliche Autofluoreszenz ist besonders das Chlorophyll a, das im längerwelligen Rotbereich Licht emittiert (Strasser & Butler, 1977). Durch die Verwendung der AHF-Filter (vergl. 6.1 und 6.2) konnte der längerwellige Rotbereich erfolgreich von der Detektion ausgenommen werden, so dass eine einwandfreie Darstellung der Markerfluoreszenz möglich war (Abbildung 3-15). Für eingehende Untersuchungen mit hoher Auflösung wurde dagegen das CLSM eingesetzt. Durch diese Technik war es möglich, die Expression der Markerfluoreszenz störungsfrei bis auf Einzelzellniveau zu untersuchen (Abbildung 3-16) und Rückschlüsse auf die Virusverteilung zu ziehen.

4.3.1 Klonierung von Reportergenen in potyvirale "full-length"-Klone

Es wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit fünf potyvirale "full-length"-Klone mit den Reportergenen smRS-GFP bzw. DsRed markiert (PPV-NAT-*AgfpS*, PPV-NAT-*red*, PPV-NAT/SoC-*red*, TVMV-*gfp* und TVMV-*red*; siehe auch 3.3.2 bis 3.3.4) und für Untersuchungen von Mischinfektionen mit anderen markierten Viren verwendet (3.3.5 bis 3.3.11).

Potyviren wurden bislang nicht mit DsRed markiert. Als pflanzenvirale Expressionsvektoren von DsRed wurden allerdings Viren anderer Genera wie z.B. das TMV (Roberts et al., 2001) und das *Tobacco rattle virus* (TRV, Valentine et al., 2002) verwendet. Auch zur Visualisierung eines Fusionsproduktes aus dem *Poa semilatent virus* (PSLV, Zamyatnin et al., 2002) kam DsRed in Kombination mit GFP zum Einsatz. Fluoreszenzmarkierungen von Potyviren mit GFP wurden bislang bei CIYVV (Masuta et al., 2000), LMV (German-Retana et al., 2000) und PPV (López Moya et al., 2000) angewendet (Tabelle 1-3). In diesen Konstrukten wurden die Markerproteine teilweise als freies Protein oder als Fusionsprotein aus dem jeweiligen Polyprotein prozessiert. Als Insertionsorte für heterologe Proteine wurden bei Potyviren bislang die Übergänge P1/HC-Pro (Dolja et al., 1993; Guo et al., 1998; German-Retana et al., 2000; Arazi et al., 2001) und N1b/Hüllprotein (Masuta et al., 2000; López Moya et al., 2000; Fernández-Fernández et al., 2001) verwendet. Allerdings zeigten Dolja et al. (1993) und Guo et al. (1998), dass die Stabilität der Insertionen nicht auf Dauer war und heterologe Sequenzen infolge intramolekularer Rekombinationsereignisse wieder aus dem Genom eliminiert wurden. Die Autoren nutzten GUS als Marker und führten die Instabilität u.a. auf die Größe des Fremdgens (1,8 kb) zurück. Masuta et al. (2000) nutzten als Markerprotein das kleinere GFP (714 bp) und konnten bei dem auch in dieser Arbeit verwendeten CIYVV eine sehr hohe Stabilität nachweisen. Arazi et al. (2001) nutzten als Integrationsorte für ein heterologes Protein sowohl den Übergang P1/HC-Pro, als auch den Bereich N1b/Hüllprotein und konnten zeigen, dass letzterer für Insertionen geeigneter war.

In dieser Arbeit wurden mit smRS-GFP (s.o.) und DsRed (702 bp) ebenfalls kleine Markergene verwendet und als unabhängige Cistrons zwischen N1b/Hüllprotein eingefügt (3.3.2 bis 3.3.4). Analog zu den Angaben von Masuta et al. (2000) konnte die Stabilität der Markerinsertionen der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte ebenfalls über mehrere Passagen der Viren anhand der Markerfluoreszenz bestätigt werden (3.3.4).

Die Stabilität von Fremdgenen in einem potyviralen Konstrukt kann aber nicht nur von deren Größe, sondern auch von den flankierenden Sequenzen des Markergens abhängig sein (Fernández-Fernández et al. 2001). Da bei Potyviren das Genom als Polyprotein exprimiert wird, muss ein eingefügtes Fremdgen nicht nur "in frame", sondern auch mit viralen Proteaseerkennungssequenzen flankiert werden, wenn es nicht als Fusionsprotein exprimiert werden soll. Dies ist wichtig, damit das Markerprotein aus dem Polyprotein prozessiert werden kann. In den hergestellten, markierten "full-length"-Klonen von PPV-NAT und TVMV

sollten die Markergene als unabhängige Cistrons in das jeweilige Genom eingefügt werden. Da die Marker zwischen NIb und Hüllprotein eingefügt werden sollten, mussten sie mit Erkennungssequenzen für die NIa-Protease flankiert werden, welche auch die Verbindung NIb/Hüllprotein trennt. Dadurch entstehen im Markerprotein normalerweise an beiden Enden des Markers homologe Sequenzen. Ist dies auch auf Nukleotidebene der Fall, so kann es zwischen den verdoppelten Sequenzen zu den oben angesprochenen intramolekularen Rekombinationsereignissen kommen, wodurch die Markergene wieder entfernt werden können. Um dies zu verhindern wurde dem Ansatz von Fernández-Fernández et al. (2001) folgend in den flankierenden Sequenzen die "codon usage" modifiziert, so dass auf Nukleotidebene keine, bzw. nur geringfügige Verdopplungen entstanden, ohne die Aminosäuresequenz zu verändern und damit die Proteaseerkennungsmotive zu erhalten (Abbildungen 3-19 und 3-24).

Allerdings ist durchaus möglich, dass einzelne Rekombinante innerhalb der Viruspopulation auftreten, die das ganze oder Teile des Markergens verloren haben. Dies wird z.B. von Fernández-Fernández (2001) damit begründet, dass jedes Fremdgen für ein Genom eine "genetische Last" darstellt und infolgedessen auf Rekombinante ohne Insertion positiv selektiert wird. Für die Untersuchungen von Virusausbreitung bzw. -verteilung ist die erreichte Stabilität jedoch ausreichend.

Bei dem Konstrukt PPV-NAT-*AgfpS* wurden zusätzlich die Erkennungsmotive für die Restriktionsendonuklasen *Ascl* und *SdaI* am 5'- bzw. 3'-Ende der Marker generiert. Da diese beiden Motive nur einmal im "full-length"-Klon vorkommen, können sie genutzt werden, um ein beliebiges Fremdgen im Austausch gegen das GFP in das PPV-NAT-Genom einzufügen und zu exprimieren. Damit steht ein potyviralear Expressionvektor zur Verfügung, der für die Expression von heterologen Proteinen in Pflanzen genutzt werden kann. Die Nutzung von potyviralear Expressionsvektoren wurde bereits von López Moya et al. (2000) angedacht und von Fernández-Fernández et al. (2001), Masuta et al. (2000) experimentell umgesetzt. Diese Strategie scheint viel versprechend zu sein, da die Expression in Pflanzen ökonomisch günstig ist und bei Potyviren aufgrund der Polyproteinprozessierung äquimolare Mengen aller Proteine anfallen (López-Moya et al., 2000), also auch ein großer Anteil des heterologen Proteins. Zudem entfielen die zurzeit gesellschaftlich sehr kontrovers diskutierte Herstellung transgener Pflanzen. Ob jedoch Arbeiten mit "transgenen Viren" eine größere Akzeptanz finden, ist fraglich. Ein Nachteil dieser Strategie ist jedoch, dass die Fremdproteine aufgrund der eingefügten Proteaseerkennungsmotive immer N- und C-terminale Fusionen aufweisen. Somit ist diese Technik zwar für die Herstellung von Antigenen zur Immunisierung von Tieren geeignet, aber nicht für viele pharmazeutisch relevante Proteine (Fernández-Fernández et al., 2001). Hier gilt es in Zukunft Techniken zu entwickeln,

die bereits bei der Vektorkonstruktion oder im Zuge der Proteinaufreinigung diese Fusionen eliminieren können.

4.3.2 Unterschiedlich markierte PVX- und Potyviruspopulationen

Bei Doppelinfektionen mit unterschiedlich markierten PVX-Varianten und Potyviren konnten zwei Beobachtungen gemacht werden (3.3.5). Zum einen war bereits kurze Zeit nach dem Auftreten systemischer Infektionen Unterschiede in der Stärke der Symptomausprägung im Vergleich zu einzeln infizierten *N. benthamiana* Pflanzen erkennbar. Zum anderen konnten bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen immer wieder größere Gewebebereiche gefunden werden, welche die charakteristische Fluoreszenz beider Viren aufwiesen (Abbildung 3-25 und 3-26). Die Expression beider Reportergene in denselben Zellen lässt auf eine örtlich bzw. räumlich synchron ablaufende Replikation beider Viren schließen, woraus sich die Möglichkeit für eine gemeinsame Verteilung der Viruspopulationen über einen größeren Gewebebereich ableiten lässt.

Hinsichtlich der synergistischen Interaktionen zeigte sich, dass die Schwere der Symptome bei einigen Pflanzen bis zum Absterben führte. Ein derartiger Synergismus zwischen PVX und Potyviren ist in der Literatur seit langem bekannt und ist entsprechend häufig beschrieben worden (Rochow & Ross, 1955; Goodman & Ross 1974a; 1974b; Vance et al., 1995; Pruss et al., 1997, Yang & Ravelonandro, 2002). In der jüngeren Literatur wird als maßgebliche Region, die für das Zustandekommen der synergistischen Interaktion verantwortlich ist, die potyvirale HC-Pro genannt (Vance et al., 1995; Pruss et al., 1997; Sáenz et al., 2001; Yang & Ravelonandro, 2002). Der synergistische Effekt zwischen PVX und CIYVV wurde zwar so noch nicht beschrieben, jedoch war er aufgrund der o.g. Literaturdaten zu erwarten. Entsprechend der PVX/CIYVV-Kombination verhält es sich auch mit der Wechselwirkung zwischen der artifiziellen Rekombinanten PPV-NAT/SoC-*red* und PVX201-*gfp*, deren synergistischer Charakter nicht unerwartet war.

Die Co-Lokalisation unterschiedlicher Viren in einer synergistischen PVX/Potyviruskombination wurde von Goodman & Ross (1974a) anhand einer Doppelinfektion von PVX/PVY elektronenmikroskopisch untersucht. Die Autoren konnten anhand charakteristischer viraler Einschlüssen für einzelne Zellen zeigen, dass diese von beiden Viren infiziert worden waren. Außerdem wurde demonstriert, dass in einer Doppelinfektion von PVX/PVY bzw. PVX/TMV der Virustiter von PVX erhöht war, jedoch nicht mehr Zellen infiziert wurden. Es wurde daraus geschlossen, dass die Synthese pro doppelt infizierter Zelle erhöht war und so zum synergistischen Effekt beitrug.

Die in dieser Arbeit mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Viren gemachten Beobachtungen ließen die Beobachtung von PVX/Potyvirus-Doppelinfektionen über die gesamte Fläche einer Blattprobe (1 bis 2 cm²) zu, wobei pro Bild am CLSM ein intakter Zellverband von mindestens 300 bis 400 Epidermiszellen abgebildet werden konnte. Es konnte daher gezeigt werden, dass PVX zusammen mit einem der markierten Potyviren größere Gewebebereiche gemeinsam infizierte. Zusätzlich konnten auch Bereiche gefunden werden, in welchen nur eines der Viren aufgrund der charakteristischen Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Dies ist konsistent mit der Arbeit von Goodman & Ross (1974a), die in Protoplasten aus PVY/PVX doppelt infizierten Tabakpflanzen in 65 bis 93% von jeweils mindestens 400 untersuchten Protoplasten beide Viren nachweisen konnten. Die Tatsache, dass sich Viren unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft gemeinsam ausbreiten begründen Carrington et al. (1996) mit der Feststellung, dass die Ausbreitungsfunktionen dieser Viren häufig austauschbar sind bzw. die Möglichkeit zur Komplementation vorliegt und dass demnach sich heterologe Ausbreitungsfunktionen wahrscheinlich nicht gegenseitig stören. Dies wurde für verschiedene Viren bzw. Viruskombinationen in einer Reihe von Experimenten nachgewiesen (Atabekov & Taliansky, 1990; DeJong & Ahlquist, 1992; Giesman-Cookmeyer et al., 1995; Fedorkin et al., 2001; Tamai et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausbreitung selbst nicht untersucht, sondern nur die Virusverteilung. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass die Viren, die im Verlauf der Infektion einer Pflanze gemeinsam in den Zellen vorliegen, sich auch gemeinsam ausbreiten können bzw. sich bereits gemeinsam ausgebreitet haben.

Ob zwischen der gemeinsamen Virusverteilung und der synergistischen Symptomausprägung ein kausaler Zusammenhang besteht, ist nicht vollständig klar. Folgt man der Argumentation von Goodman & Ross (1974a), so bewirkt der erhöhte Virustiter in den doppeltinfizierten Zellen eine schnellere Schwächung der Pflanzen. Nach Pruss et al. (1997) erhöht die translatierte Form der HC-Pro als Transaktivierungsfaktor die Replikation des PVX. Demnach löst die HC-Pro eine verstärkte Replikation des PVX aus, was zum erhöhten Virustiter führt. Da hierbei in einer doppelt infizierten Zelle letztendlich ein Virus mit stark erhöhtem Titer vorliegt und zusätzlich die Replikation eines zweiten Virus erfolgt, führt dies zum Kollaps der Wirtszelle. Die relativ schnelle Nekrotisierung doppelt infizierter Zellbereiche trug auch dazu bei, dass die Abbildung der gemeinsamen Verteilung von PVX/Potyviruskombinationen mit dem CLSM aufgrund der starken Autofluoreszenz nekrotisierter Zellen oft mit Schwierigkeiten verbunden war. Für die HC-Pro ist auch eine Rolle in der Ausbreitung bekannt (Cronin et al., 1995; Kasschau et al., 1997), so dass dieses Protein als komplementärer Ausbreitungsfaktor sowohl die gemeinsame Ausbreitung ermöglichen, als auch den Synergismus hervorrufen kann. Nach Baulcombe (2002b) basiert der synergistische Effekt auf der Unterdrückung eines "gene silencing"-Signals. Inwieweit die Unterdrückung des

PTGS-Abwehrsystems der Pflanze durch den potyviralen PTGS-Suppressor HC-Pro die gemeinsame Verteilung ermöglicht bzw. beeinflusst ist unbekannt.

Jedoch ist interessant, dass die *in vitro*-Rekombinante PPV-NAT/SoC-*red*, die wesentlich weniger kompetitiv ist als PPV-NAT, in Verbindung mit PVX eine vergleichbare Symptomausprägung verursachte, als die markierten PPV-NAT/PVX-Kombinationen. Das bedeutet, dass die Replikationsrate der Potyviren an sich für den Synergismus mit PVX anscheinend von untergeordneter Bedeutung ist. Da nicht geklärt wurde, ob für die Verdrängung von PPV-NAT/SoC in einer Mischinfektion mit PPV-NAT eine schwächere Ausbreitung, eine weniger effektive Replikation oder eine Kombination aus beiden Faktoren verantwortlich war, stellt sich die Frage, ob bzw. welche der Faktoren eventuell einen Einfluss auf den synergistischen Effekt hatten.

4.3.3 Kombinationen unterschiedlich markierter Populationen eines Virus oder von Viren des gleichen Genus

In den hier diskutierten Versuchen wurden zwei unterschiedliche Arten von Virus-kombinationen auf ihre Verteilung in Mischinfektionen hin überprüft. Zum einen wurden zwei Viruspopulationen unterschiedlich markierter Potyviren, wie z.B. PPV-NAT-*AgfpS*/TVMV-*gfp*, untersucht (3.3.7). Die zweite Art von Kombinationen beinhaltete dagegen immer zwei identische Viruspopulationen, deren Viren sich nur in ihrem Reportergen unterschieden, wie z.B. PPV-NAT-*AgfpS*/PPV-NAT-*red* oder PVX201-*optRed*/PVX201-*gfp* (3.3.6). Darüber hinaus wurde in die Untersuchungen auch die DsRed-markierte, künstlich hergestellte Rekombinante PPV-NAT/SoC-*red* miteinbezogen (3.3.3). In den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen sowohl primär, als auch systemisch infizierter Gewebe konnten zunächst nur fluoreszierende Bereiche identifiziert werden, die lediglich eines der beiden möglichen Fluoreszenzsignale aufwiesen. Größere Bereiche mit Signalen beider Reporterproteine, wie es bei den in 4.3.2 beschriebenen PVX/Potyviruskombinationen der Fall war, konnten nicht gefunden werden (Abbildung 3-27 bis 3-29). Erst eine stärkere Vergrößerung konnte zeigen, dass an der Grenze entlang zweier aufeinander treffender, unterschiedlich fluoreszierender Bereiche einige Zellen die charakteristische Fluoreszenz beider Markerproteine zu erkennen war (Abbildung 3-27). Eine weitergehende Mischung der Fluoreszenzsignale über einen Grenzbereich hinaus konnte auch nach längerfristiger Untersuchung über 28 Tage nicht beobachtet werden (3.3.8). Da aus der Expression der Markergene auf die Verteilung der Viruspopulation geschlossen werden kann, herrscht bei nahe verwandten und unterschiedlich markierten, identischen Viruspopulationen eine Trennung der Populationen in primär und systemisch infizierten Blättern.

Eine in einem vergleichbaren System mit fluoreszenzmarkierten Viren, jedoch nicht auf zellulärer Ebene, durchgeführte Beobachtung wurde von Divéki et al. (2002) veröffentlicht. Die Autoren konnten für zwei verschieden markierte PVX-Populationen zeigen, dass diese auf doppelt infizierten Blättern von *N. clevelandii* ein Muster aus diskret verteilten, unterschiedlich fluoreszierenden Bereichen hervorriefen. Auch sehr frühe Beobachtungen von McKinney (1929) lassen Parallelen zu den hier vorgestellten Ergebnissen erkennen. McKinney nutzte für seine Untersuchungen zwei TMV-Stämme, die ein unterschiedlich farbiges Mosaik (gelb bzw. dunkelgrün) auf Tabak verursachten. Dabei zeigte sich, dass beide Stämme in einer Mischinfektion ein Mosaik, bestehend aus abgegrenzten, gelben und dunkelgrünen Flächen verursachten. Ebenfalls eine Art Trennungseffekt konnten Hull & Plaskitt (1970) bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit zwei unterschiedlichen Stämmen des AMV nachweisen, wenn diese simultan oder in kurz aufeinander folgenden Abständen inokuliert wurden.

Dass prinzipiell auch eine großflächige Doppelinfektion von zwei Viren in einer Mischinfektion möglich ist, haben die in 4.3.2 beschriebenen Untersuchungen von Potyvirus/PVX-Kombinationen gezeigt. Der Vergleich der Viruskombinationen mit gemeinsamer bzw. getrennter Verteilung lässt den Schluss zu, dass es zu einer Trennung der Viruspopulationen kommt, wenn unterschiedliche Viren eines Genus oder identische, aber unterschiedlich markierte Viren in einer Doppelinfektion vorliegen. Auch in den von McKinney (1929), Hull & Plaskitt (1970) und Divéki et al. (2002) beschriebenen Fällen kam es bei identischen, unterschiedlich markierten Viren oder Stämmen eines Virus zu einem vergleichbaren Phänomen. Zusammengefasst mit den Beobachtungen aus der Literatur wird ein Trennungseffekt nun für Vertreter von vier Virusgenera aus mindestens zwei Familien beschrieben: vier Potyviren (*Potyviridae*), TMV (Genus Tobamoviren), PVX (Genus Potexviren) und das Alfamovirus AMV (*Bromoviridae*). Bei diesen Vertretern handelt es sich generell um Viren mit einem einzelsträngigen, sinnpositiven RNA-Genom. Allerdings verfügen sie nicht nur über unterschiedliche Genomexpressionsstrategien, sondern kommen auch in sehr unterschiedlichen Wirtspflanzen, wie *Prunus*-Arten (PPV) oder krautigen Pflanzen (z.B. TVMV, PVX), vor. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden Wirtspflanzen verwendet, in welchen sich zwei Viren in einer Mischinfektion etablieren konnten. Da aber die verwendeten *Nicotiana*-Arten keine natürlichen Wirte für PPV-NAT sind, muss hinterfragt werden, ob der Trennungseffekt auch in den natürlichen Wirten auftritt. Allerdings konnten sowohl getrennte Verteilung für TVMV-*red*/TVMV-*gfp*, als auch gemeinsame Verteilung für PVX201-*optRed*/TVMV-*gfp*-Populationen in *N. clevelandii* bzw. *N. occidentalis* (3.3.11, Abbildung 3-32) nachgewiesen werden. Diese Pflanzen zählen zwar nur bedingt zu den natürlichen Wirtspflanzen von TVMV und PVX, jedoch stammen sie für PVX aus der gleichen Familie (*Solanaceae*) und für TVMV sogar aus der gleichen Gattung (*Nicotiana*) wie die natürlichen

Wirte (*S. tuberosum* bzw. *N. tabacum*). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass zumindest für TVMV und PVX diese Verteilungsmuster auch in Mischinfektionen natürlicher Wirte anzutreffen sind. Dass die getrennte Verteilung von unterschiedlich markierten PPV auch in dem natürlichen Wirt *P. domestica* vorliegt, kann hier nur vermutet werden. Die Untersuchung der Verteilungsform von PPV in seinem natürlichen Wirt *P. domestica* wäre sehr interessant und würde weitere Anhaltspunkte darüber liefern, inwiefern eine Allgemeingültigkeit für die beobachteten Verteilungen vorliegt. Diese Untersuchungen könnten mit den in dieser Arbeit verwendeten Viren PPV-NAT-*AgfpS* und PPV-NAT-*red* durchgeführt werden, vorausgesetzt, die Reporterproteine sind in *Prunus*-Arten funktionsfähig. Die eingeschränkte Funktionsfähigkeit für eine GFP-Variante (BFP) in verschiedenen Tabakarten wurde von Divéki et al. (2002) auf die pH-Sensitivität des Reporters zurückgeführt. Dies kann auch ein Grund für die teilweise sehr schwache Fluoreszenz der Reporterproteine in *N. clevelandii*, *N. occidentalis* und *N. glutinosa* (3.3.11) gewesen sein.

Da die o.g. Untersuchungen zeitlich sehr weit auseinander lagen und mit dementsprechend unterschiedlichen Methoden untersucht wurden, wäre eine Verallgemeinerung der Ergebnisse verfrüht. Jedoch lassen diese Daten den begründeten Verdacht zu, dass es, zumindest bei RNA-Viren mit sinnpositiven Genom, in Mischinfektionen mit Vertretern aus dem jeweiligen gleichen Genus oder bei Stämmen eines Virus, zu einer getrennten Verteilung kommt.

4.3.4 Mögliche Ursachen und Konsequenzen für die getrennte Verteilung von Viruspopulationen

Virusreplikation und Virusausbreitung

Es konnte gezeigt werden, dass die Trennung nicht vollständig war, sondern dass es durchaus doppelt infizierte Zellen gab. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Trennungseffekt auf einem der in der älteren Literatur genannten "cross protection"-Faktoren (Fulton, 1986), wie z.B. der Konkurrenz um die Orte der Replikation (s.o.), beruht. Das 6K2-Protein gilt als Membrananker für den Replikationskomplex (Restrepo-Hartwig & Carrington, 1994; Schaad et al., 1997a). Es kann daher angenommen werden, dass die Zahl der Orte für die Virusreplikation begrenzt ist, da die Zahl der 6K2-Bindungsstellen nur die Bindung einer eingeschränkten Anzahl von Replikationskomplexen zulässt. Im Falle der getrennten Ausbreitung könnte sich an der Grenze zweier aufeinander treffender Viruspopulationen folgendes abspielen: Die Zellen entlang der Grenze werden von zwei Viruspopulationen

gleichzeitig oder in kurz aufeinander folgenden Abständen infiziert. Da zu Beginn der Infektion in der Zelle noch nicht alle 6K2-Bindungsstellen abgesättigt sind, können die Viren beider Populationen repliziert werden. Je nach Geschwindigkeit der Ausbreitung von Zelle zu Zelle kann es auch möglich sein, dass die benachbarten Zellen auch noch zu einem gewissen Grad doppelt infiziert werden. Das würde bedeuten, dass an der Grenze zweier aufeinander treffender Viruspopulationen jede der Populationen über die Grenze hinaus mit abnehmendem Virustiter zu finden wäre. Streng genommen würde das darüber hinaus heißen, dass die Ausbreitung von Zelle zu Zelle unidirektional wäre, da Zellen nicht wiederholt infiziert werden können.

Neben der potenziellen Rolle des 6K2 können aber auch weitere virale Proteine in die Trennung von Viruspopulationen involviert sein (s.u.). Zudem wäre die hypothetische 6K2-Theorie auf Potyviren beschränkt. Da in dieser Arbeit der Trennungseffekt auch für ein Potexvirus gezeigt werden konnte (3.3.6 und 3.3.9) und darüber hinaus ähnliche Effekte für weitere Viren beschrieben wurden, erscheint es möglich, dass hier ein grundlegender Mechanismus eine Rolle spielt. Bei PVX wurde berichtet, dass sowohl das 3'-, als auch das 5'-Ende des Genoms mit Wirtsproteinen interagieren kann und dass diese Möglichkeiten zur Bindung für eine intakte Replikation wichtig sind (Sriskanda et al., 1996; Kim et al., 2002). Demnach könnte auch beim PVX eine Konkurrenz um Bindungsstellen für die jeweiligen Replikationskomplexe ein möglicher Grund für die getrennte Verteilung von Viruspopulationen sein. Dies würde bedeuten, dass unterschiedliche Mechanismen einen gleichen Effekt (getrennte Verteilung) herbeiführen. Da davon ausgegangen werden kann, dass Potex- und Potyviren mit unterschiedlichen Wirtsproteinen interagieren, erscheint es auch nachvollziehbar, dass PVX zusammen mit Potyviren größere Gewebebereiche infizieren kann (4.3.2). Bei diesen Viren besteht demnach keine Konkurrenz um Membran- oder Proteinbindungsstellen. Ähnliche Schlussfolgerungen sind auch für ausbreitungsassoziierte Proteine denkbar. Da die Versuche zum Vorkommen der getrennten bzw. gemeinsamen Verteilung auch zeigen konnten, dass diese Verteilungsformen auch in anderen Wirtspflanzen vorliegen, ist ein allgemeiner Mechanismus umso wahrscheinlicher. Im Umkehrschluss des Gedankens von Carrington et al. (1996), in welchem die Autoren für die gemeinsame Ausbreitung nicht verwandter Viren postulieren (s.o.), dass sich heterologe Ausbreitungsfaktoren ergänzen bzw. komplementieren können, kann theoretisch abgeleitet werden, dass sich ähnliche bzw. homologe oder verwandte Ausbreitungsfaktoren behindern. Es ist z.B. bekannt, dass in Mischinfektionen von Potyviren die jeweiligen CI-Einschlusskörper an beiden Seiten der Plasmodemesmata vorliegen (Langenberg, 1986; Lesemann, 1988). Da das CI-Protein Funktionen in der Ausbreitung von Zelle zu Zelle übernimmt (Rodríguez-Cerezo et al., 1997; Roberts et al., 1998, Carrington et al., 1998), kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass homologe Ausbreitungsfaktoren sich

tatsächlich gegenseitig behindern und so eine weitere Ausbreitung in bereits infiziertes Gewebe unterbleibt, bzw. eine separate Verteilung entsteht.

Parallelen zu Mosaiksymptomen

In der Literatur gibt es keine direkten Hinweise auf einen Mechanismus, der der oben beschriebenen Trennung zugrunde liegen könnte. Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, weisen Mosaiksymptome gewisse Ähnlichkeiten mit der getrennten Verteilung von Viruspopulationen auf. Das Zustandekommen von Mosaiksymptomen, bzw. die sich bei einem Mosaik bildenden dunkel- und hellgrünen Gewebebereiche, wurden mit dem Vorkommen von Sequenzvarianten in einem Virusisolat begründet. Demnach können einzelne Sequenzvarianten sich in bestimmten Bereichen etablieren, und die aus diesen Arealen durch Zellteilung hervorgehenden neuen Zellen sind dann mit den entsprechenden Nachkommen infiziert (Chalcroft & Matthews, 1966; Reid & Matthews, 1966; Chalcroft & Matthews, 1967a; b). Diese Vorstellung zum Zustandekommen von Mosaiksymptomen berücksichtigt die Ausbreitungsmechanismen ("cell-to-cell movement") der Viren aber nicht ausreichend. Zudem ist bekannt, dass Mosaiksymptome auch von Viren verursacht werden, die nach Inokulation mit "full-length"-Klonen eine Pflanze infizieren (Carrère et al., 1999). Bei der Inokulation von Pflanzen mit cDNAs kommt es jedoch – zumindest in den untersuchten Zeiträumen – zu keiner Sequenzvariabilität (Sáenz et al., 2001). Es ist daher fraglich, welche Rolle eine Sequenzvarianz tatsächlich als Ursache für das Auftreten von Mosaiksymptomen und damit evtl. auch für die getrennte Verteilung von Viruspopulationen spielt.

Verbindungen zur "cross protection"

Da in den hier diskutierten Viruskombinationen eine Trennung der Populationen vorlag, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein der "cross protection" verwandtes Phänomen vorliegt. Es erscheint möglich, dass diese Trennung den Ausschluss einer Viruspopulation durch eine bereits etablierte Viruspopulation bewirkt, wie in Abbildung 3-30 für die Kombinationen TVMV-*gfp*/PPV-NAT/SoC-*red* bzw. TVMV-*red*/CIYVV-GFP gezeigt werden konnte. In diesen Kombinationen konnte die Fluoreszenz jeweils eines Virus (PPV-NAT/SoC-*red*, CIYVV-GFP) in einer doppelt infizierten Pflanze weniger oft nachgewiesen werden, als das zweite, vorherrschende Potyvirus. Dies stimmt gut mit den Beobachtungen von Al Abdallah (2002) überein, der zeigen konnte, dass PPV-NAT/SoC in einer Mischinfektion von PPV-NAT verdrängt wurde, auch wenn PPV-NAT in wesentlich geringeren Ausgangskonzentrationen zusammen mit PPV-NAT/SoC inokuliert wurde. Die Vermutung liegt nahe,

dass PPV-NAT/SoC-*red* bzw. CIYVV-GFP in *N. benthamiana* weniger kompetitiv sind als TVMV und durch den Trennungseffekt ausgeschlossen wurden.

Die Arbeiten von McKinney (1929) und Hull & Plaskitt (1970) werden von Hull (2000) im Zusammenhang mit "cross protection" diskutiert. Als "cross protection" wird in der Pflanzenvirologie der Schutz bezeichnet, den eine Vor- bzw. Erstinokulation einer Pflanze mit einem Virus, welches keine oder nur sehr milde Symptome verursacht, gegenüber einer Infektion mit einem stark virulentem Virus auslösen kann (Fulton, 1986). Als Ursache für "cross protection" wurden lange Zeit mehrere mögliche Faktoren angenommen, wie z.B. der Verbrauch essentieller Metaboliten oder Konkurrenz um Orte der Virusreplikation (Fulton, 1986; Pennazio et al., 2001). Allerdings konnte keine der bislang postulierten Theorien das "cross protection" Phänomen zufrieden stellend erklären. In neuerer Zeit konnten Ratcliff et al. (1999) anhand eines Tobra-/Potexvirussystems nachweisen, dass in diesem System "cross protection" durch ein RNA-vermitteltes, posttranskriptionales "gene silencing" verursacht wurde. Inwiefern diese Erklärung Allgemeingültigkeit besitzt, ist unklar.

Geht man bezüglich des Mechanismus wie Ratcliff et al. (1999) von einem "gene silencing" aus, so ist fraglich, ob dies ohne weiteres auf die hier gezeigten Potyviruskombinationen übertragen werden kann. Da Potyviren mit der HC-Pro über sehr effektive "gene silencing" Suppressoren verfügen (Brigneti et al., 1998), erscheint es eher unwahrscheinlich, dass ein "gene silencing" die Trennung hervorruft. Da PTGS jedoch ein natürlicher Abwehrmechanismus von Pflanzen ist (Baulcombe, 2002b), ist es schwierig ihr Vorkommen bei einer Infektion mit identischen, jedoch unterschiedlich markierten Viruspopulationen in Verbindung zu bringen, weil hier im Grunde eine Infektion mit nur einem Virus vorliegt.

Da "gene silencing"-Signale systemisch sind (Voinnet & Baulcombe, 1997), wird davon ausgegangen, dass dies in der "cross protection" zum Schutz vor weiteren Infektionen dienen kann. Dies kann aber nicht uneingeschränkt gelten, da die Versuche mit PVX0014-*red* und PVX201-*gfp* gezeigt haben, dass auch 24 Tage nach der Erstinokulation mit PVX0014-*red* sich PVX201-*gfp* noch lokal etablieren kann (Abbildung, 3-31).

Voraussetzung für das PTGS und die systemische Ausbreitung des Signals ist die Bildung von siRNAs (Voinnet & Baulcombe, 1997; Hamilton et al., 2002). Würde die getrennte Verteilung von Viruspopulationen auf einem PTGS-Mechanismus aufbauen, so müssten siRNAs gebildet werden. Ob eine Bildung von siRNAs aufgrund der Anwesenheit der HC-Pro (s.o.) überhaupt gegeben ist, muss infrage gestellt werden. Zudem ist die Bildung von siRNAs von hoher Sequenzübereinstimmung abhängig. Im diskutierten Potyvirus-System wäre im Falle identischer Viren (z.B. PPV-NAT-*AgfpS*/PPV-NAT-*red*) bis auf das Markergen eine vollständige Homologie gegeben. Aber auch bei unterschiedlichen Potyviren, wie z.B. PPV-NAT/TVMV, wäre trotz Übereinstimmungen im Genom von nur 56% und einer maximalen perfekt konservierten Region von 18 Nukleotiden, die Bildung von siRNAs evtl.

vorstellbar, da bei deren Entstehung keine 100%ige Basenpaarung vorliegen muss (Llave et al., 2002; Kasschau et al., 2003). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass in Mischinfektionen identischer oder nahe verwandter Populationen ein eventuell lokaler (Ryabov et al., 2004) "silencing"-Effekt möglicherweise Einfluss auf deren Verteilung nimmt. Da bei "cross protection" der Schutz nicht immer vollständig sein muss (Bennet, 1950; Fulton, 1986), kann es durchaus sein, dass Areale in der Pflanze, die von dem erstinokulierten Virus noch nicht okkupiert wurden, von dem zweiten Virus ("challenging") noch besiedelt werden können. Kommen beide Viruspopulationen dann an einer Stelle in Kontakt, unterbleibt eine weitere Ausbreitung, was die Ergebnisse mit PVX0014-*red*/PVX201-*gfp* gezeigt haben (3.3.9). Das würde bedeuten, dass das protektive Virus möglichst homogen in der Pflanze verteilt vorkommen muss, damit ein ausreichender Schutz gewährleistet ist. Es ist vorstellbar, dass wenn ein protektives Virus, welches evtl. sogar hohe Titer erreicht, nicht homogen in der Pflanze verteilt ist, das virulentere Virus sich zu Beginn der Infektion erst lokal etablieren, dann systemisch ausbreiten und sich im weiteren Infektionsverlauf gegen den protektiven Stamm durchsetzen kann. Dies würde auch erklären, warum PVX201-*gfp* nach Etablierung von PVX0014-*red* noch an einigen Stellen detektiert werden konnte (Abbildung 3-31).

Valkonen et al. (2002) berichten, dass verschiedene Stämme des PVA über ein unterschiedliches Potenzial verfügen, gegenseitig als protektiver Stamm in "cross protection" Versuchen zu fungieren. Legt man allerdings einen PTGS-Mechanismus zugrunde, so müsste die Bildung von siRNAs durch die pflanzeneigene Abwehr auf unterschiedlichen Niveaus möglich sein, da auch der oben zitierte "cross protection"-Schutz auch nicht auf einem einheitlichen Niveau besteht. Betrachtet man die Ergebnisse von Valkonen et al. (2002) aus dem Blickwinkel der getrennten Verteilung von Viruspopulationen, so könnten die unterschiedlichen Schutzniveaus mit der oben diskutierten Möglichkeit in Verbindung gebracht werden, dass eine Zweitinfektion möglich ist, wenn die protektive Viruspopulation nicht völlig homogen etabliert ist. Demnach müssten die verschiedenen PVA-Stämme die Wirtspflanzen unterschiedlich stark bzw. unterschiedlich homogen infizieren, was bei einer schwach ausgeprägten Ausbreitung einen geringen, bei einer homogenen Ausbreitung einen guten Schutz bedeutet. Die Charakteristik der Verteilung von Virusstämmen mit unterschiedlicher Fähigkeit zur "cross protection" müsste untersucht werden, um einen Zusammenhang zwischen "cross protection" und getrennter Ausbreitung herzustellen.

Mögliche Vorgehensweise zur Aufklärung des Mechanismus der getrennten Verteilung

Um einen Aufschluss über den der getrennten Virusverteilung zugrunde liegenden Mechanismus zu erlangen, muss versucht werden, die Trennung zu beeinflussen. Hierfür bieten sich die PVX/Potyviruskombinationen an. Durch Nutzung des p35PVX201-*optRed* als

Expressionsvektor für ein potyviraies 6K2 kann untersucht werden, ob dieses modifizierte Virus in einer Mischinfektion mit einem Potyvirus immer noch gemeinsam verteilt vorkommen kann, oder ob es zu einer Trennung kommt. Wesentlich aufwendiger wäre die Herstellung transgener Pflanzen, die funktionsfähige, virale Proteine exprimieren. In diesen Pflanzen könnten dann die Viruskombinationen untersucht werden, die normalerweise eine getrennte Verteilung aufweisen. Hier konnten die bereits durchgeführten Versuche mit den transgenen *N. benthamiana* Linien 17.27.4 und 4.30.45 zeigen, dass die Anwesenheit von PPV-Hüllproteinen keinen Einfluss auf die Trennung von TVMV-Populationen hat (3.3.10).

Über eine mutmaßliche Bedeutung der getrennten Verteilung von Viruspopulationen kann zum momentanen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit sollten rekombinante Viren in Mischinfektionen von Potyviren nachgewiesen werden. Ob die ausgebliebene Detektion von Rekombinanten im Zusammenhang mit der Verteilungsform stehen könnte, bzw. welchen Einfluss die Virusverteilung auf die Durchsetzung rekombinanter Genotypen hat, wird im anschließenden Kapitel 4.4 diskutiert.

4.4 Verteilung von Viruspopulationen und Auftreten rekombinanter Viren

Im Kapitel 4.1.1 wurde gezeigt, dass in Mischinfektionen von PPV-NAT und TVMV keine rekombinanten Viren gefunden wurden. Die wichtigste Grundvoraussetzung für ein Rekombinationsereignis im Allgemeinen und daher auch für ein solches Ereignis zwischen zwei Pflanzenviren, ist die Anwesenheit beider Rekombinationspartner zur selben Zeit am selben Ort (Aaziz & Tepfer, 1999a). Wie die Beobachtungen der fluoreszenzmarkierten Viren gezeigt haben, ist in Fällen, in welchen nahe verwandte oder identische, aber unterschiedlich markierte Viren sich in einer Mischinfektion befinden diese Voraussetzung nur in wenigen Zellen erfüllt (3.3.6 bis 3.3.9). In den Viruskombinationen, in welchen eine getrennte Verteilung vorliegt, kann Rekombination nur in den doppelt infizierten Zellen entlang der Grenze zweier Viruspopulationen erfolgen. Dies wäre auch der Fall für die Kombination PPV-NAT/TVMV. Vorausgesetzt, die für eine RNA-Rekombination notwendigen Motive, wie Sequenzhomologie *etc.* (Aaziz & Tepfer, 1999a; b) sind bei zwei Viren in einer Mischinfektion gegeben, würde eine Rekombinante immer in einer doppelt infizierten Zelle entstehen. Wie in Abbildung 3-27 gezeigt wurde, sind solche Zellen aber meist von bereits infizierten Zellen umgeben. Die Rekombinante hätte, folgt man der Argumentation in 4.3.3, keine Möglichkeit aus der initialen Zelle in benachbarte Zellen gelangen, wenn diese bereits vollständig infiziert sind. Es würden jedoch einige Faktoren in Betracht kommen, die ein "Entkommen" aus der

Zelle positiv beeinflussen könnten. Zum einen wäre dies möglich, wenn die Rekombination zu einem sehr frühen Zeitpunkt stattfindet, an welchem die umliegenden Zellen noch nicht vollständig infiziert sind. Dies könnte dadurch gefördert werden, wenn die Elternviren in dem jeweiligen Wirt natürlicherweise oder bedingt durch äußere Einflüsse (z.B. hohe Temperaturen; Manganaris et al., 2003) über eine niedrigere Replikationsrate bzw. eine wenig effektive Ausbreitung verfügen. Da die Rekombinante ohnehin vom Zeitpunkt ihres Entstehens unter dem kompetitiven Einfluss der Elternviren steht, muss eine hohe Fitness dazu beitragen, dass das rekombinante Virus sich weiter ausbreiten kann. Im Falle einer Vektorübertragung könnte ein rekombinantes Virus auf einen neuen Wirt übertragen werden, in dem es sich dann unter denselben Ausgangsbedingungen wie eventuell mit übertragene Elternviren ausbreiten kann (Aaziz & Tepfer, 1999a). Auch wenn die genannten Szenarien hypothetisch sind, so scheint es doch offensichtlich, dass rekombinante Pflanzenviren, die in einer Kombination mit getrennter Virusverteilung entstanden sind, nicht ohne Weiteres von der Zelle ihres Entstehens aus weitere Zellen infizieren können.

In den Versuchen, in welchen zwei verschiedene Viruspopulationen unterschiedlich markiert wurden (3.3), ist bis jetzt davon ausgegangen worden, dass eine Pflanze nur von zwei Populationen infiziert wurde. Genauer betrachtet stellt jedoch z.B. jeder Infektionshof in einem primär oder systemisch infizierten Blatt eine neue Population dar. Das bedeutet, dass sich in einer Pflanze sehr viele Populationen befinden, die sich, wenn sie in Kontakt kommen, weitgehend ausschließen. Kleine Populationen jedoch neigen zum schnellen Verlust ihrer relativen Fitness (Roossinck, 1997). Da natürliche Pflanzenviruspopulationen zwar immer eine gewisse Heterogenität aufweisen (Sáenz et al., 2001; Moreno et al., 2004), ansonsten unter normalen Bedingungen aber keine Variationen im Sinne eines Fitnessverlustes zeigen (Moreno et al., 2004), verhalten sich die vielen kleinen Populationen anscheinend wie eine große Population.

Berichte über natürlicherweise vorkommende rekombinante Potyviren haben sich in letzter Zeit gehäuft. Für PPV (Cervera et al., 1993, Glasa et al., 2002) und PVY konnten rekombinante Stämme und auch die Orte des jeweiligen "crossover" beschrieben werden (Glais et al., 2001; Boonham et al., 2002; Nie & Singh, 2003a). Es wurden auch eine Reihe von Arbeiten veröffentlicht, in welchen aus vergleichenden Sequenzanalysen geschlossen wurde, dass Rekombination bei einigen Potyviren häufig bzw. regelmäßig aufzutreten scheint: BCMV (Revers et al., 1996), YMV (Bousalem et al., 2000; 2003) und WMV (Moreno et al., 2004). Allerdings konnten Revers et al. (1996) für das PPV keine Rekombinanten nachweisen. Größere Variabilitäten werden häufig erst beobachtet, wenn Potyvirusisolate aus geographisch weit auseinander liegenden Gebieten verglichen werden (Glasa et al., 2002; Tomimura et al., 2003). Bei diesen Untersuchungen wurde jedoch das Auftreten von Rekombinanten innerhalb der Populationen eines Virus untersucht. In der vorliegenden

Arbeit wurde dagegen nach Rekombinanten zwischen zwei verschiedenen Potyviren gesucht. Ein Rekombinationsereignis zwischen unterschiedlichen Viren konnte für eine Luteo-/Poleroviruskombination gezeigt werden (Moonan et al., 2000); allerdings sind Berichte hierzu selten.

Berücksichtigt man die getrennte Verteilung von Viruspopulationen, sind jedoch die lokalen Gegebenheiten und Chancen für die Durchsetzung von Rekombinanten in einer Doppelinfektion von PPV-NAT und TVMV und die Gegebenheiten in einer Infektion zweier PPV-"Stämme" (z.B. PPV-NAT-*AgfpS*/PPV-NAT/*SoC-red*) gleich. Wie bereits in 4.1.1 angeführt, kann in solchen Kombinationen nur die Kompatibilität der Rekombinationspartner eine Rekombination und die Bildung kompetitiver Nachkommen gewährleisten. Wie die oben genannten Arbeiten zeigen, besteht zwischen den Viren einer Population eine so große Kompatibilität, dass rekombinante Nachkommen eine ausreichende Fitness besitzen, sich gegen die Elternviren trotz getrennter Verteilung durchzusetzen. Dies scheint jedoch bei Populationen verschiedener Potyviren nicht der Fall zu sein.

Mögliche Unterschiede im Durchsetzungsvermögen von Mutanten oder Rekombinanten in der Abhängigkeit vom Ort ihres Entstehens

Aufbauend auf der hier dargelegten Argumentation können verschiedene Möglichkeiten für das Entstehen von Rekombinanten, aber auch von Mutanten, in einer Mischinfektion mit getrennter Populationsverteilung angenommen werden (Abbildung 4-1). Mutanten werden hier in die Überlegung mit aufgenommen, da die im Folgenden erläuterten Annahmen sich auch auf sie übertragen lassen. Liegt eine Mischinfektion mit zwei unterschiedlichen Viruspopulationen A und B (z.B. PPV-NAT und TVMV) vor, so können Rekombinante nur in der in Abbildung 4-1 gelb markierten mischinfizierten Übergangszone entstehen (Rekombinante AB). Dieses Szenario würde höchstwahrscheinlich auch auf verschiedene Stämme eines Virus zutreffen, wie anhand von Viruskombinationen mit identischen, aber unterschiedlich markierten Viren und der künstlichen Rekombinanten PPV-NAT/*SoC-red* gezeigt werden konnte (Tabelle 3-11). Zum anderen können Rekombinante und Mutanten innerhalb einer Population entstehen. Diese treten entweder in vollständig infizierten Zellen im zentralen Bereich eines Infektionsherdes auf (Typen A⁰ bzw. B⁰) oder am Rande der Population im angrenzenden Bereich zu nicht-infiziertem Gewebe (Typen A⁺ bzw. B⁺). Aus diesem theoretischen Modell und den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen kann unter Vorbehalt abgeleitet werden, dass Rekombinante an verschiedenen Orten innerhalb einer Population auftreten.

Die in den doppelt infizierten Zellen auftretenden Rekombinanten vom AB-Typ und die A⁰- bzw. B⁰-Mutanten haben aufgrund der Tatsache, dass alle umliegenden Zellen vollständig infiziert sind, die geringsten Möglichkeiten sich durchzusetzen. Ausnahmen bilden z.B. die zufällige Akquisition durch einen Vektor oder eine mechanische Übertragung. Die vergleichsweise besten Chancen nicht-infiziertes Gewebe zu erreichen, haben Rekombinante innerhalb einer Population, die am Rande der Ausbreitungsgrenzen entstehen oder über den Langstreckentransport in jüngere, virusfreie Blätter verlagert wurden (Rekombinante A⁺ und B⁺).

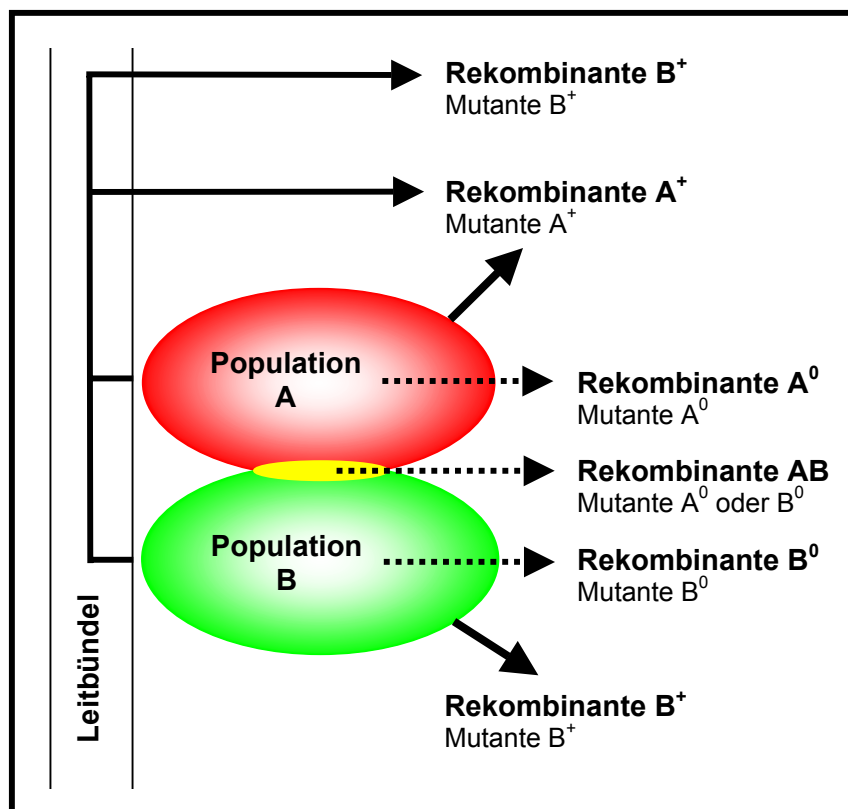


Abbildung 4-1 Mögliche Entstehungsorte rekombinanter und mutierter Viren in einer Mischinfektion von Populationen mit getrennter Virusverteilung

Das rote und das grüne Oval repräsentieren jeweils Gewebebereiche zweier sich konzentrisch ausbreitender Viruspopulationen. Der doppelt infizierte Bereich ist gelb markiert. weitere Erläuterungen im Text

Moury (2004) konnte für das CMV-Hüllprotein zeigen, dass der Faktor Blattlausübertragung stärkeren evolutionären Barrieren unterliegt, als die Wirtsadaptation. Wenn die Verteilung beim CMV dem in Abbildung 4-1 dargestellten Bedingungen entspricht, würde das bedeuten, dass Veränderungen im Genom bezüglich der Wirtsadaptation schneller zum Tragen kommen. Die

Mutanten bzw. Rekombinanten A^+ oder B^+ würden diese Funktion erfüllen, da diese sich unmittelbar in noch nicht infiziertes Gewebe ausbreiten können. Demnach hätten Änderungen vom Typ A^+ bzw. B^+ eine Bedeutung bei der kurz- bzw. mittelfristigen Adaption im Verlauf einer Infektion. Das würde sich dann in der Tatsache widerspiegeln, dass beim CMV die genetische Variabilität in verschiedenen Wirten unterschiedlich ist (Roossinck & Schneider, 2001). Bedenkt man, dass bei der Durchsetzung von Rekombinanten und Mutanten die Wirtspflanzen eine wichtige Rolle spielen (Roossinck, 2003), wäre es vorstellbar, dass bei suboptimalen Bedingungen in der Wirtspflanze Veränderungen vom A^+ - bzw. B^+ -Typ schnell zum Tragen kommen und zur verbesserten Adaption führen. Bei entsprechend guter Anpassung kann dann eine Population über eine geringere Variabilität verfügen (Chen et al., 2001).

Eine vorteilhafte Änderung in Motiven der Blattlausübertragung entspräche eher dem AB- oder A^0 - bzw. B^0 -Typ und kann dagegen nur zufällig und dementsprechend seltener zum Tragen kommen, da dies vom Ort des Einstichs einer Blattlaus abhängt. Diese Virusmutante hätte dann jedoch gute Ausgangsbedingungen im neu-infizierten Wirt, da die Konkurrenz mit Elternviren fehlt und entsprechend dem Modell wieder A^+ - oder B^+ -Typen die Entwicklung bestimmen.

Da die Änderungen durch ein Rekombinationsereignis (AB) im Vergleich zu einer Mutation eine wesentlich umfangreichere Modifikation für das virale Genom bedeuten, stellt sich die Frage, ob auch der evolutionäre Beitrag von entsprechender größerer Bedeutung ist. Beim PVY gibt es zwei Stämme des NTN-Typs, wobei der europäische PVY^{NTN} als rekombinant identifiziert wurde, der amerikanische jedoch seine Eigenschaften infolge einer Mutation erhielt (Boonham et al., 2002; Nie & Singh, 2003a). Dem in Abbildung 4-1 gezeigten Modell nach würde der europäische Stamm dem AB-Typ und der amerikanische einer A^+ - bzw. B^+ -Mutanten entsprechen. Da beide NTN-Stämme sich trotz der Gegenwart ihrer Elternviren etabliert haben, kann davon ausgegangen werden, dass deren Fitness bzw. Wirtsadaption für die Durchsetzung entscheidend war. Somit können beide Typen unabhängig von der Art der Veränderung (Mutation oder Rekombination) und dem Ort ihres Entstehens gleichermaßen zur Entwicklung beitragen.

Rekombinante des Typs A^0 bzw. B^0 würden in Anlehnung an Roossinck (1997) und der hier aufgezeigten Argumentation entsprechend im Wesentlichen dazu dienen, die vorherrschende Sequenz innerhalb einer Population ("master sequence") stabil zu halten und die durch die fehlerbehaftete Replikation der RdRp auftretenden Fehler (z.B. eine Mutante A^0 oder B^0) zu korrigieren. Demnach wäre eine indirekte Rolle der getrennten Verteilung bei der Stabilisierung einer Population zu diskutieren. Der Beitrag von Rekombinanten und Mutanten des 0 -Typs zur Durchsetzung neuer Sequenzvarianten und zur Weiterentwicklung der Population im evolutionären Sinne wäre entsprechend gering. Da die Durchsetzungsfähigkeit

des AB-Typs aufgrund der Lage zwischen zwei Populationen analog zur Situation der A⁰- bzw. B⁰-Rekombinanten ist, kann für diese ebenfalls angenommen werden, dass ihr Beitrag zur evolutionären Weiterentwicklung einer Population nur in Ausnahmefällen Bedeutung erlangt. Lediglich sehr hohe Fitness und Zufallsereignisse (s.o.) können dann zur Entstehung einer neuen, durchsetzungsfähigen Sequenzvariante führen. Es wäre zu überlegen, ob z.B. die mechanische Übertragung von Kartoffelvirosen die genetische Variation der Viren fördert, weil sie u.U. die Durchsetzung von Sequenzvarianten des ⁰- oder AB-Typs positiv beeinflussen.

4.5 Risikobewertung virusresistenter transgener Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Grundlagen der Risikobewertung von VRTP am Beispiel PPV-transgener *N. benthamiana* Pflanzen erarbeitet werden. Wie bereits in der Einleitung definiert, umfasst Risikobewertung die Evaluierung, inwieweit ein bestimmtes Szenario eine Gefahr im Sinne einer nachteiligen Abweichung von den natürlichen Gegebenheiten darstellt und die Feststellung der Eintrittswahrscheinlichkeit dieser Gefahr.

Um eine Vorstellung über die generelle Häufigkeit von Rekombinationsereignissen zu erhalten, wurde versucht eine "natürliche" Rekombinationsrate in Mischinfektionen von PPV-NAT und TVMV zu bestimmen, um diese mit der potenziellen Rekombinationsrate in VRTP zu vergleichen. Da keine PPV-NAT/TVMV-Rekombinanten gefunden wurden, muss, wie bereits in 4.1.1 und 4.1.2 diskutiert, davon ausgegangen werden, dass Rekombination

1. zwischen PPV-NAT und TVMV überhaupt nicht,
2. nicht in detektierbaren Maße oder
3. in anderen Regionen der viralen Genome stattfand.

Da keine Rekombinanten in Mischinfektionen oder VRTP nachgewiesen wurden, konnte keine Rekombinationsrate und damit auch keine Eintrittswahrscheinlichkeit der mutmaßlichen Gefahr (Rekombination) bestimmt werden. Ohne die Bestimmung der Eintrittswahrscheinlichkeit für eine potenzielle Gefahr fehlt einer der beiden wesentlichen Faktoren für das Ableiten eines Risikos, das durch VRTP möglicherweise entsteht. Insofern konnte lediglich der zweite Faktor, die Gefahr selbst, anhand von Untersuchungen mit den künstlichen Rekombinanten PPV-NAT/SoC bzw. PPV-NAT/AT ansatzweise evaluiert werden (3.2). Die Tatsache, dass die beiden Rekombinanten in der Lage waren von den Elternviren abweichende Symptome hervorzurufen, wurde bereits in Abschnitt 4.2 diskutiert. Im Sinne der Risikobewertung dieser Rekombinanten müssen verschiedene Aspekte in Betracht

gezogen werden. Die Ausprägung stärkerer Symptome kann, zumindest im Falle der Wirtspflanze *C. quinoa*, als negative Abweichung vom Normalzustand betrachtet und damit als potenzielle Gefahr gewertet werden. Für eine analoge Aussage bezüglich der Symptomausprägung bei *N. benthamiana* müsste eine Verifizierung des in Kapitel 4.2 angesprochenen Temperatureffekts unter definierten Bedingungen erfolgen. Die Schlussfolgerung, dass der Austausch der Hüllproteine zwischen Stämmen eine Gefahr darstellt, kann aber aus mehreren Gründen nicht generalisiert werden. Zum einen war der Austausch künstlich durchgeführt worden, und die Größe des ausgetauschten Fragments hing von der Klonierungsstrategie ab (Al Abdallah, 2002). Wichtig für die Bewertung der potenziellen Gefahr wäre aber, ob solch ein Austausch auch unter natürlichen Bedingungen stattfinden könnte. Aber nicht der Symptomeffekt allein ist für die Bewertung ausschlaggebend, sondern das kompetitive Verhalten der Rekombinanten und die Häufigkeit ihres Auftretens. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass PPV-NAT/SoC nicht in der Lage war, mit PPV-NAT zu konkurrieren (Al Abdallah, 2002). Dass ein artifizieller Austausch zwar stärkere Symptome herbeiführen konnte, die entstandene Rekombinante aber nicht kompetitiv war, könnte bedeuten, dass selbst wenn eine ähnliche Rekombinante *in planta* entstünde, diese nicht prinzipiell die Fähigkeit haben muss, sich durchzusetzen. Entstände PPV-NAT/SoC in einer natürlichen Mischinfektion, würde die Durchsetzung von der Konkurrenzsituation mit dem kompetitiveren Elternvirus PPV-NAT und der Tatsache, dass dies eine Rekombinante vom Typ AB wäre (4.4 und Abbildung 4-1), beeinträchtigt werden. Aus den hier vorliegenden Ergebnissen kann demnach nicht gefolgert werden, dass Rekombination *per se* ein Risiko darstellt.

Zwar muss jedes Ergebnis hinsichtlich des Entstehens von Rekombinanten unter dem Gesichtspunkt betrachtet werden, dass mit einem nicht ausreichenden Detektionslimit gearbeitet wurde. Jedoch ist in einer Risikobewertung nicht die Entstehung von Rekombinanten an sich, sondern deren Fitness und die daraus resultierenden Auswirkungen von herausragender Bedeutung. Die Tatsache, dass mit dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Ansatz keine Rekombinanten gefunden werden konnten, wirft die Frage auf, ob für weitere Versuche eine Risikobewertung von VRTP durchzuführen eine alternative Strategie angewendet werden sollte.

In Bezug auf die Ermittlung einer Rekombinationsrate in Mischinfektionen sollte bedacht werden, dass das Versuchsdesign so ausgerichtet ist, dass erstens zwei eng verwandte Viren verwendet werden, von welchen bekannt ist, dass unter natürlichen Bedingungen eine Rekombinante entstehen kann. Zweitens sollte die Möglichkeit bestehen, dass im Falle eines Rekombinationsereignisses die Rekombinante eine hohe Fitness aufweist, um sich gegen die Elternviren durchzusetzen. Für eine derartige Versuchsplanung könnten z.B. die in Kapitel 4.1.1 angeführten PVY-Stämme PVY^N und PVY^O verwendet werden, aus welchen

infolge von Rekombination PVY^{NTN} entstehen könnte (Glais et al., 2002). Dieses Beispiel ist zudem interessant, als dass der NTN-Typ auch durch Mutation entstehen kann, wie in 4.4 bereits berichtet wurde. Alternativ kann untersucht werden, ob in PVY^N-transgenen Pflanzen, die mit PVY^O infiziert werden, rekombinante Nachkommen des NTN-Typs auftreten. Die Reproduktion eines solchen Rekombinationsereignisses unter Versuchsbedingungen könnte zudem Aufschluss über Rekombinations-"hot spots" geben. Außerdem sollten Untersuchungen von VRTP vorerst in Pflanzen durchgeführt werden, die zwar transgen, aber nicht resistent sind, damit die Resistenz sich nicht gegen die Rekombinante richtet. Interessant wäre auch die Verwendung unterschiedlicher Stämme eines Virus, wobei sich die Resistenz der VRTP nur gegen einen Stamm richtet (analog zu Silbernagel et al., 2001). Der oder die Stämme, die nicht von der Resistenz betroffen sind, könnten dann für die Suche nach Rekombinationsereignissen verwendet werden. VRTP und die entsprechenden Stämme könnten dem Beispiel von Zaitlin et al. (1994) folgend, aus den Subgruppen des CMV gewählt werden.

Da Rekombinante zwischen Stämmen dem in Abbildung 4-1 vorgestellten AB-Typ entsprechen, kann eine alternative Strategie darin bestehen, den Konkurrenzdruck in einer Mischinfektion abzuschwächen. Dies könnte z.B. dadurch geschehen, dass Viruspopulationen aus mischinfizierten Pflanzen, evtl. verdünnt, auf neue Wirtspflanzen übertragen werden. Auch eine mehrmalige Wiederholung der Passagierung würde die Population theoretisch immer wieder ausdünnen, so dass Rekombinante sich trotz des Trennungseffektes bis zu einem detektierbaren Niveau durchzusetzen könnten.

Der in Abbildung 4-1 beschriebene Einfluss des Ortes einer Rekombination auf die Entwicklungsmöglichkeiten einer Rekombinanten in einer Mischinfektion mit getrennter Ausbreitungen kann ebenfalls ein Ansatzpunkt für eine alternative Strategie zur Identifizierung von Rekombinationsereignissen in Mischinfektionen sein. Zum einen könnten PVX-Vektoren verwendet werden, Teile potyviralere Sequenzen, die mutmaßlich an Rekombinationen beteiligt sind, in einer Mischinfektion mit einem Potyvirus exprimieren. Da gezeigt werden konnte, dass PVX und die in dieser Arbeit verwendeten Potyviren sich in *N. benthamiana* Pflanzen gemeinsam ausbreiten, wäre die räumliche Nähe für ein Rekombinationsereignis gegeben, und der Trennungseffekt würde die Durchsetzung nicht mehr beeinflussen. Z.B. könnte ein auf p35PVX201 aufbauender Vektor die Hüllprotein-kodierende Sequenz des PPV-NAT in einer Mischinfektion mit PPV-NAT/SoC exprimieren. Infolge einer Rekombination könnte dann PPV-NAT restauriert werden und sich auch gegen PPV-NAT/SoC durchsetzen, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Ein ähnlicher Effekt würde auch erreicht werden, wenn es gelänge, die Trennung der Viruspopulationen aufzuheben. Ist z.B. das potyvirale 6K2 verantwortlich für die Trennung, so könnte versucht werden in transgenen Pflanzen das 6K2 zu exprimieren. Wird dadurch bei einer

Potyvirusdoppelinfection die Trennung ganz oder teilweise aufgehoben, so kann im Weiteren vorgegangen werden, wie es oben für das Beispiel PVX/PPV-NAT/SoC beschrieben wurde. Abschließend muss bemerkt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte Trennung von Viruspopulationen von erheblicher Bedeutung für die weitere Bewertung von VRTP ist. Eine Grundforderung bei der Risikobewertung ist der Vergleich einer aus Mischinfektionen gewonnenen, natürlichen Rekombinationsrate mit der Rekombinationsrate aus VRTP, um hieraus Rückschlüsse auf Gefahr und Häufigkeit bzw. Risiko ziehen zu können (1.1.3). Da in VRTP aber in der Regel alle Zellen das Transgen konstitutiv exprimieren, ist bei einer Infektion mit einem Virus Rekombination theoretisch in allen Zellen möglich. In einer Mischinfektion jedoch herrscht jedoch u.U. eine separate Virusverteilung, d.h., dass Rekombination nur in einigen wenigen Zellen stattfinden kann. Repräsentativ wäre nur eine Viruskombination, die eine gemeinsame Verteilung der Viruspopulationen aufweist. Allerdings ist fraglich, ob solche Kombinationen (z.B. PVX/PPV) für Rekombination überhaupt kompatibel sind, bzw. replikationsfähige Nachkommen daraus entstehen können. Es muss daher in Zukunft unbedingt darauf geachtet werden, dass bei der Ermittlung von Rekombinationsraten die Zahl der doppelinfizierten Zellen in einzeln infizierten VRTP und mischinfizierten nicht-transgenen Pflanzen ein ähnliches Ausmaß hat, um einen korrekten Vergleich zuzulassen. Unabhängig von der verwendeten Viruskombination sollte von der Methodik her so vorgegangen werden, dass von vornherein nicht das Rekombinationsereignis in einem engen Zeitrahmen an sich im Vordergrund der Untersuchungen steht, sondern dass der Versuchsansatz so gewählt wird, dass das Auftreten kompetitiver Rekombinanten nach einer gewissen Selektionszeit evaluiert wird. So kann im Rahmen der Risikoforschung unter praxisnahen und der Rekombination Rechnung tragenden Bedingungen eine Identifizierung von Sequenzen erfolgen, die Rekombination in besonderen Maße fördern.

4.6 Schlussbetrachtung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich des Auftretens von Rekombinationen in VRTP bzw. Mischinfektionen der Viruskombination PPV-NAT/TVMV konnten nicht belegen, dass Rekombination in den untersuchten Genomabschnitten auftrat. Zwar konnte eine mutmaßliche Gefahr im Sinne der Definition aus 1.1.3 für zwei künstliche Rekombinante gezeigt werden, jedoch ist nicht bekannt, ob und wie häufig ein vergleichbares Ereignis unter natürlichen Bedingungen eintreten kann. Da weder die Eintrittswahrscheinlichkeit von Rekombinationsereignissen, noch deren Gefahr in einem

System evaluiert werden konnten, kann Rekombination in den verwendeten VRTP- und Viruskombinationen nicht als Risiko angesprochen werden.

Bei der Untersuchung von Rekombination in der VRTP-Risikobewertung sollten in Zukunft folgende Kriterien bei der Wahl der Viruskombinationen beachtet werden. Um realistische Bedingungen für das Auftreten von Rekombinanten zu gewährleisten, sollten bei der Wahl der Viruskombinationen vorrangig Stämme eines Virus ("inner species") verwendet werden. Damit wären die besten Chancen gegeben, Rekombinations-"hot spots" zu identifizieren. Können dort Rekombinante detektiert werden, so kann das Versuchsdesign auf Viren eines Genus ("intra group") und evtl. auf Viren unterschiedlicher Genera ("inter group") erweitert werden. Bei der Wahl der Viruskombinationen sollte auch darauf geachtet werden, dass in erster Linie Untersuchungen in natürlichen, gemeinsamen Wirtspflanzen stattfinden, um möglichst naturnahe Bedingungen hinsichtlich Selektionsdruck und Durchsetzung zu simulieren.

5 Literatur

- Aaziz, R. & Tepfer, M. (1999a).** Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *J Gen Virol* **80**, 1339-1346.
- Aaziz, R. & Tepfer, M. (1999b).** Recombination between genomic RNAs of two cucumoviruses under conditions of minimal selection pressure. *Virology* **263**, 282-289.
- Adams, M.J. (1991).** Transmission of plant viruses by fungi. *Ann Appl Biol* **118**, 479-492.
- Al Abdallah, Q. (2002).** Construction of *Plum Pox Virus* (PPV) chimeric full-length clones and their use for detection of homologous recombination of PPV. Master of Science Thesis, Universität Hannover.
- Allison, R.F., Greene, A. E. & Schneider, W. L. (1997).** Significance of RNA recombination in capsid-protein-mediated virus-resistant transgenic plants. In: *Virus-Resistant Transgenic Plants: Potential Ecological Impact*. Tepfer, M. & Balázs, E. (eds.). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
- Allison, R.F., Schneider, W. L. & Deng, M. (1999).** Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. In: *Proceedings of the 5th International Symposium on Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms*, Braunschweig. Schiemann, J. & Casper, R. (eds.) Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. Braunschweig, Berlin.
- Alzhanova, D.V., Hagiwara, Y. Peremyslov, V.V. & Dolja, V.V. (2000).** Genetic analysis of the cell-to-cell movement of *Beet yellows closterovirus*. *Virology* **268**, 192-200.
- An, H., Melcher, U., Doss, P., Payton, M., Guenzi, A.C. & Verchot-Lubicz, J. (2003).** Evidence that the 37 kDa protein of *Soil-borne wheat mosaic virus* is a virus movement protein. *J Gen Virol* **84**, 3153-3163.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H. & Vance, V.B. (1998).** A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13079-13084.
- Anonym (1988).** Verordnung zur Bekämpfung der Scharkakrankheit vom 7. Juni 1971 (Bundesgesetzblatt Teil 1, S. 804). Geändert durch Verordnung vom 20. Mai 1988 (Bundesgesetzblatt Teil 1, S. 641).
- Anonym (1999).** Living Colors[®] User Manual Volume II: red fluorescent protein. CLONTECH User Manual.
- Arazi, T., Slutsky, S.G., Shibolet, Y.M., Wang, Y., Rubinstein, M., Barak, S., Yang, J. & Gal-On, A. (2001).** Engineering *Zucchini yellow mosaic potyvirus* as a non-pathogenic vector for expression of heterologous proteins in cucurbits. *J Biotechnol* **87**, 67-82.
- Ares, X., Calamante, G., Cabral, S., Lodge, J., Hemenway, P., Beachy, R.N., Mentaberry, A. (1998).** Transgenic plants expressing *Potato virus X* ORF2 protein (p24) are resistant to *Tobacco mosaic virus* and *Ob tobamoviruses*. *J Virol* **72**, 731-738.
- Atabekov, J.G. & Taliansky, M. E. (1990).** Expression of a plant virus-coded transport function by different viral genomes. *Adv Virus Res* **38**, 201-248.
- Atreya, C.D. & Pirone, T.P. (1993).** Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus - effects of amino-acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11919-11923.

- Atreya, C.D., Atreya, P.L., Thornbury, D.W. & Pirone, T.P. (1992).** Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology* **191**, 106-111.
- Atreya, C.D., Raccah, B. & Pirone, T.P. (1990).** A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* **178**, 161-165.
- Atreya, P.L., López-Moya, J.J., Chu, M., Atreya C.D. & Pirone T.P. (1995).** Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *J Gen Virol* **76**, 265-270.
- Baird, G.S., Zacharias, D.A. & Tsien, R.Y. (2000).** Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 11984-11989.
- Barnett, O.W. (1991).** *Potyviridae*, a proposed family of plant viruses. *Arch Virol* **118**, 139-141.
- Bartsch, D. (2004).** Schadensbegriffe in Zusammenhang mit Europäischen Regelungen zu gentechnisch veränderten Pflanzen. In: Potthast, T. (Hg.) *Ökologische Schäden - begriffliche, methodologische und ethische Aspekte*, Reihe "Theorie in der Ökologie". Band 10. Peter Lang Verlag, Frankfurt am Main.
- Baulcombe, D. (2002a).** RNA silencing. *Curr Biol* **12**, 382-384.
- Baulcombe, D. (2002b).** Viral suppression of systemic silencing. *Trends Microbiol* **10**, 1-2.
- Baulcombe, D., Gilbert, J., Goulden, M., Kohm, B. & Cruz, S.S. (1994).** Molecular biology of resistance to *Potato virus X* in potato. *Biochem Soc Symp* **60**, 207-218.
- Baulcombe, D.C. (1996).** Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**, 1833-1844.
- Baulcombe, D.C., Chapman, S. & Santa Cruz, S. (1995).** Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J* **7**, 1045-1053.
- Ben-Artzi, H., Zeelon, E., Gorecki, M. & Panet, A. (1992).** Double-stranded RNA-dependent RNase activity associated with *Human immunodeficiency virus* type 1 reverse transcriptase1. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 927-931.
- Bennett, C. W. (1951).** Interactions between viruses and virus strains. *Adv Virus Res* **1**, 39-67.
- Bevis, B.J. & Glick, B.S. (2002).** Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* **20**, 83-87.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Blanc, S., Ammar, E.D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J. & Pirone, T.P. (1998).** Mutations in the helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J Gen Virol* **79**, 3119-3122.
- Blanc, S., López-Moya, J.J., Wang, R., Garcia-Lampasona, S., Thornbury, D.W. & Pirone, T.P. (1997).** A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* **231**, 141-147.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim van Dillen, P.M.E. & van der Noordaa, J. (1990).** Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* **28**, 495-503.
- Boonham, N., Walsh, K., Preston, S., North, J., Smith P. & Barker, I. (2002).** The detection of tuber necrotic isolates of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVY(O), PVY(N) and PVY(C) strains using RT-PCR. *J Virol Methods* **102**, 103-112.

- Bourdin, D. & Lecoq, H. (1991).** Evidence that heteroencapsidation between two potyviruses is involved in aphid transmission of a non-transmissible isolate from mixed infections. *Phytopathology* **81**, 1459-1464.
- Bousalem, M., Candresse, T., Quiot-Douine, L. & Quiot, J.B. (1994).** Comparison of three methods for assessing plum pox virus variability: Further evidence for the existence of two major groups of isolates. *J Phytopathol* **142**, 163-172.
- Bousalem, M., Dallot, S., Fuji, S. & Natsuaki, K.T. (2003).** Origin, world-wide dispersion, biogeographical diversification, radiation and recombination: an evolutionary history of *Yam mild mosaic virus* (YMMV). *Infect Genet Evol* **3**, 189-206.
- Bousalem, M., Douzery, E.J. & Fargette, D. (2000).** High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of *Yam mosaic virus*: a contribution to understanding potyvirus evolution. *J Gen Virol* **81**, 243-255.
- Brakenhoff, R.H., Schoenmakers, J.G. & Lubsen, N.H. (1991).** Chimeric cDNA clones: a novel PCR artifact. *Nucleic Acids Res* **19**, 1949.
- Brantley, J.D. & Hunt, A.G. (1993).** The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus *Tobacco vein mottling virus* is an RNA binding protein. *J Gen Virol* **74**, 1157-1162.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.-X., Ji, L.-H., Ding, S.-W. & Baulcombe, D.C. (1998).** Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* **17**, 6739-6746.
- Bujarski, J.J. & Kaesberg, P. (1986).** Genetic recombination between RNA components of a multipartite plant virus. *Nature* **321**, 528-531.
- Bujarski, J.J. & Nagy, P.D. (1994).** Targeting of the site of nonhomologous recombination in *Brome mosaic virus*. *Arch Virol* **9**, 231-238.
- Bujarski, J.J. & Nagy, P.D. (1996).** Different mechanisms of homologous and nonhomologous recombination in *Brome mosaic virus*: role of RNA sequences and replicase proteins. *Semin Virol* **7**, 363-372.
- Bujarski, J.J., Nagy, P.D. & Flasiński, S. (1994).** Molecular studies of genetic RNA-RNA recombination in *Brome mosaic virus*. *Adv Virus Res* **43**, 275-302.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A. & Tsien, R.Y. (2002).** A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7877-7882.
- Campbell, R.N. (1996).** Fungal transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* **34**, 87-108.
- Campbell, R.N. (1979).** Fungal vectors of plant viruses. In: Fungal Viruses. XIIth Int. Congr. Microbiol., Mycol. Sect., Munich, 1978. Molitoris, H.P., Hollings, M. & Wood, H.A. (Hg.). pp 8-24. Springer-Verlag, Berlin.
- Candelier-Harvey, P. & Hull, R. (1993).** *Cucumber mosaic virus* genome is encapsidated in *Alfalfa mosaic virus* coat protein expressed in transgenic tobacco plants. *Transgenic Res* **2**, 277-285.
- Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscia, D., Quiot, J.B. & Dunez, J. (1998).** Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of *Plum pox virus*. *Phytopathology* **88**, 198-204.
- Canto, T., Prior, D.A.M., Hellwald, K.-H., Oparka K.J. & Palukaitis, P. (1997).** Characterization of *Cucumber mosaic virus*: IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of *Cucumber mosaic virus*. *Virology* **237**, 237-248.

- Carrere, I., Tepfer, M. & Jacquemond, M. (1999).** Recombinants of *Cucumber mosaic virus* (CMV): determinants of host range and symptomatology. *Arch Virol* **144**, 365-379.
- Carrington, J.C., Cary, S.M. & Dougherty, W.G. (1988).** 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.
- Carrington, J.C., Cary, S.M. Parks, T.D. & Dougherty, W.G. (1989).** A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J* **8**, 365-370.
- Carrington, J.C., Jensen, P.E. & Schaad, M.C. (1998).** Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J* **14**, 393-400.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D. & Johansen, L.K. (2001).** Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology* **281**, 1-5.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K. & Schaad, M.C. (1996).** Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* **8**, 1669-1681.
- Cascone, P.J., Carpenter, C.D., Li, X.-H. & Simon, A.E. (1990).** Recombination between satellite RNAs of *Turnip crinkle virus*. *EMBO J* **9**, 1709-1715.
- Cascone, P.J., Haydar, T.F. & Simon, A.E. (1993).** Sequences and structures required for recombination between virus-associated RNAs. *Science* **260**, 801-805.
- Cervera, M.T., Riechmann, J.,L., Martín, M.T. & García, J.A. (1993).** 3'-terminal sequence of *Plum pox virus* PS and 06 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. *J Gen Virol* **74**, 329-334.
- Chalcroft, J.P. & Matthews, R.E.F. (1966).** Cytological changes induced by Turnip yellow mosaic virus infections. *Virology* **28**, 555-562.
- Chalcroft, J.P. & Matthews, R.E.F. (1967a).** Virus strains and leaf ontogeny as factors in the production of leaf mosaic patterns by *Turnip yellow mosaic virus*. *Virology* **33**, 167-171.
- Chalcroft, J.P. & Matthews, R.E.F. (1967b).** Role of virus strains and leaf ontogeny in the production of leaf mosaic patterns by *Turnip yellow mosaic virus*. *Virology* **33**, 659-673.
- Chalfie, M. (1995).** Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol* **62**, 651-656.
- Chalfie, M., Tu, Y. Euskirchen, G. Ward, W.W. & Prasher, D.C. (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Chen, Y.K., Derks, A.F., Langeveld, S., Goldbach, R. & Prins, M. (2001).** High sequence conservation among *Cucumber mosaic virus* isolates from lily. *Arch Virol* **146**, 1631-1636.
- Chetverin, A.B. (1997).** Recombination in bacteriophage Q β its satellite RNAs: the *in vivo* and *in vitro* studies. *Semin Virol* **8**, 121-129.
- Chu, M., Desvoyes, B., Turina, M., Noad, R. & Scholthof, H.B. (2000).** Genetic dissection of *Tomato bushy stunt virus* p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion. *Virology* **266**, 79-87.
- Cramer, A., Whitehorn, E. Tate, E. & Stemmer, P. (1996).** Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol* **14**, 315-319.
- Crescenzi, A., D'Aquino, L., Comes, S., Nuzzaci, M., Piazzolla, P. & Hadidi, A. (1997).** Characterization of the sweet cherry isolate of *Plum pox potyvirus*. *Plant Dis* **81**, 711-714.

- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M.C. & Carrington, J.C. (1995).** Long-distance movement factor: A transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* **7**, 549-559.
- Cubitt, A.B., Heim, R. Adams, S.R. Boyd, A.E. Gross, L.A. & Tsien, R.Y. (1995).** Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**, 448-455.
- Dasgupta, S., Collins, G.B. & Hunt, A.G. (1998).** Co-ordinated expression of multiple enzymes in different subcellular compartments in plants. *Plant J* **16**, 107-116.
- Davis, S.J. & Vierstra, R.D. (1998).** Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol* **36**, 521-528.
- DeJong, W. & Alquist, P. (1992).** A hybrid plant RNA virus made by transferring the noncapsid movement protein from a rod-shaped virus to an icosahedral virus is competent for systemic infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 3284-3288.
- Dietrich, C. (2000).** Markierung des *Plum pox virus* (PPV) und des *Potato virus X* mit verschiedenen Varianten des 'green fluorescent protein' aus *Aequoria victoria*. Diplomarbeit, Universität Hannover.
- Dijkstra, J. & de Jager, C.P. (1998).** Practical plant virology - Protocols and exercises. (Springer lab manual) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Ding, S.W., Shi, B.J., Li, W.X. & Symons, R.H. (1996).** An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7470-7474.
- Divéki, Z., Salánki, K. & Balázs, E. (2002).** Limited utility of blue fluorescent protein in monitoring plant virus movement. *Biochimie* **84**, 997-1002.
- Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G. & Carrington, J.C. (1994).** Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of *Tobacco etch potyvirus* in plants. *EMBO J* **13**, 1482-1491.
- Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., VandenBosch, K.A. & Carrington, J.C. (1995).** Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of *Tobacco etch potyvirus*. *Virology* **206**, 1007-1016.
- Dolja, V.V., Herndon, K.L., Pirone, T.P. & Carrington, J.C. (1993).** Spontaneous mutagenesis of a plant potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *J Virol* **67**, 5968-5975.
- Domier, L. L., Franklin, K. M. Shahabuddin, M., Hellmann G.M., Overmeyer, J.H., Hiremat, S.T., Siaw, M.F.E., Lomonosoff, G.P., Shaw, J.G. & Rhoads, R.E. (1986).** The nucleotide sequence of *tobacco vein mottling virus* RNA. *Nucl Acids Res* **14**, 5417-5430.
- Domier, L.L., Franklin, K.M., Hunt, A.G., Rhoads, R.E. & Shaw, J.G. (1989).** Infectious in vitro transcripts from cloned cDNA of a potyvirus, *Tobacco vein mottling virus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 3509-3513.
- Dosba, F., Maison, P., Lansac, M. & Massonie, G., (1987).** Experimental transmission of *Plum pox virus* (PPV) to *Prunus mahaleb* and *Prunus avium*. *J Phytopathol* **120**, 199-204.
- Dreher, T.W. (1999).** Functions of the 3'-untranslated regions of positive strand RNA viral genomes. *Annu Rev Phytopathol* **37**, 151-174.
- Dunez, J. & Sutic, D. (1988).** *Plum pox virus*. In: Smith, I.M., Dunez, J., Elliot, R.A., Phillips, D.H. & Archer, A.A. (eds.). European Handbook of Plant Diseases, pp. 44-46. Blackwell, London.
- Dzianott, A. & Bujarski, J.J. (2004).** Infection and RNA recombination of *Brome mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana*. *Virology* **318**, 482-492.

- Eagles, R.M., Balmori-Melián, E., Beck, D.L., Gardner, R.C. & Forster, R.L.S. (1994).** Characterization of NTPase, RNA-binding and RNA helicase activities of the cytoplasmic inclusion protein of *Tamarillo mosaic potyvirus*. *Eur J Biochem* **224**, 677-684.
- Erhardt, M., Morant, M. Ritzenthaler, C. Stussi-Garaud, C. Guilley, H. Richards, K. Jonard, G. Bouzoubaa, S. & Gilmer, D. (2000).** P42 movement protein of *Beet necrotic yellow vein virus* is targeted by the movement proteins P13 and P15 to punctate bodies associated with plasmodesmata. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**, 520-528.
- Fanigliulo, A., Comes, S., Maiss, E., Piazzolla, P. & Crescenzi, A. (2003).** The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* isolates from sweet (PPV-SwC) and sour (PPV-SoC) cherry and their taxonomic relationships within the species. *Arch Virol* **148**, 2137-2153.
- Fedorkin, O., Solovyev, A., Yelina, N., Zamyatnin, A. Jr., Zinovkin, R., Makinen, K., Schiemann, J. & Yu Morozov, S. (2001).** Cell-to-cell movement of *Potato virus X* involves distinct functions of the coat protein. *J Gen Virol* **82**, 449-458.
- Fellers, J., Wan, J., Hong, Y., Collins, G.B. & Hunt, A.G. (1998).** *In vitro* interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* **79**, 2043-2049.
- Fernández, A., Guo, H.S., Sáenz, P., Simón-Buella, L., Gómez de Cedrón, M. & García, J.A. (1997).** The motif V of *Plum pox potyvirus* CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus replication. *Nucl Acids Res* **25**, 4474-4480.
- Fernández-Cuartero, B., Burgyán, J., Aranda, M. A., Salánki, K., Moriones, E. & García-Arenal, F. (1994).** Increase in the relative fitness of a plant virus RNA associated with its recombinant nature. *Virology* **203**, 373-377.
- Fernández-Fernández, M.R., Martínez-Torrecuadrada, J.L., Casal, J.I. & García, J.A. (1998).** Development of an antigen presentation system based on *Plum pox potyvirus*. *FEBS Lett* **427**, 229-235.
- Fernández-Fernández, M.R., Mourino, M., Rivera, J., Rodríguez, F., Plana-Duran, J. & García, J.A. (2001).** Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. *Virology* **280**, 283-291.
- Fulton, R. W. (1986).** Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annu Rev Phytopathol* **24**, 67-81.
- Gal, S., Pisan, B., Hohn, T., Grimsley, N. & Hohn, B. (1992).** Agroinfection of transgenic plants leads to viable *Cauliflower mosaic virus* by intermolecular recombination. *Virology* **187**, 525-533.
- Gal-On, A., Meiri, E., Raccah, B. & Gaba, V. (1998).** Recombination of engineered defective RNA species produces infective potyvirus in planta. *J Virol* **72**, 5268-5270.
- Gal-On, A., Meiri, H., Huet, H., Hua, W.J., Raccah, B. & Gaba, V. (1995).** Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned DNA of *Zucchini yellow mosaic potyvirus*. *J Gen Virol* **76**, 3223-3227.
- Gerlach, W.L., Llewellyn, D. & Haseloff, J. (1987).** Construction of a plant disease resistance gene using satellite RNA of *Tobacco ringspot virus*. *Nature* **328**, 802-805.
- German-Retana, S., Candresse, T. Alias, E. Delbos, R.-P. & Le Gall, O. (2000).** Effects of green fluorescent protein or β -glucuronidase tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance-breaking *Lettuce mosaic virus isolate* in susceptible and resistant lettuce cultivars. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**, 316-324.
- Gibbs, M.J. (1994).** Risks in using transgenic plants? *Science* **264**, 1650-1651.

- Giesman-Cookmeyer, D. Silver, S., Vaewhongs, A., Lommel, S.A. & Deom, C.M. (1995).** Tobamovirus and dianthovirus movement proteins are functionally homologous. *Virology* **213**, 38-46.
- Glais, L., Tribodet, M. & Kerlan, C. (2002).** 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**, 363-378.
- Glasa, M., Labonne, G. & Quiot, J.B. (2003).** Effect of temperature on *Plum pox virus* infection. *Acta Virol* **47**, 49-52.
- Glasa, M., Marie-Jeann, V., Moury, B., Kúdela, O. & Quiot, J.-B. (2002).** Molecular variability of the P3-6K1 region among geographically and biologically distinct isolates of *Plum pox virus*. *Arch Virol* **147**, 563-575.
- Goodman, R.M. & Ross, A.F. (1974a).** Enhancement of *Potato virus X* synthesis in doubly infected tobacco occurs in doubly infected cells. *Virology* **58**, 16-24.
- Goodman, R.M. & Ross, A.F. (1974b).** Enhancement by *Potato virus X* synthesis in doubly infected tobacco depends on the timing of invasion by the viruses. *Virology* **58**, 263-271.
- Gopinath, K., Wellink, J. Porta, C. Taylor, K.M. Lomonossoff, G.P. & van Kammen, A. (2000).** Engineering *Cowpea mosaic virus* RNA-2 into a vector to express heterologous proteins in plants. *Virology* **267**, 159-173.
- Gray, D.J., Hiebert, E., Lin, C.M., Compton, M.E., McColley, D.W., Harrison, R.J. & Gaba, V.P. (1994).** Simplified construction and performance of a device for particle bombardment. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **37**, 179-184.
- Greene, A. E. & Allison, R. F. (1994).** Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* **263**, 1423-1425.
- Greene, A. E. & Allison, R. F. (1996).** Deletions in the 3' untranslated region of *Cowpea chlorotic mottle virus* transgene reduce recovery of recombinant viruses in transgenic plants. *Virology* **225**, 231-234.
- Grumet, R. (1995).** Genetic engineering for crop virus resistance. *HortScience* **30**, 449-456.
- Guo, H.S. & García, J.A. (1997).** Delayed resistance to *Plum pox potyvirus* mediated by a mutated RNA replicase gene: involvement of a gene-silencing mechanism. *Mol Plant-Microbe Interact* **10**, 160-170.
- Guo, H.S., Cervera, M.T. & García, J.A. (1998).** *Plum pox potyvirus* resistance associated to transgene silencing that can be stabilized after different number of plant generations. *Gene* **206**, 263-272.
- Guo, H.S., Lopez-Moya, J.J. & García, J.A. (1998).** Susceptibility to recombination rearrangements of a chimeric *Plum pox potyvirus* genome after insertion of a foreign gene. *Virus Res* **57**, 183-195.
- Haldeman-Cahill, R., Daros, J.A. & Carrington, J.C., (1998).** Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the *Tobacco etch virus* genome. *J Virol* **72**, 4072-4079.
- Hall, J.S., French, R., Hein, G.L., Morris, T.J. & Stenger, D.C. (2001).** Three distinct mechanisms facilitate genetic isolation of sympatric *Wheat streak mosaic virus* lineages. *Virology* **282**, 230-236.
- Hall, T.A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, D. (2002).** Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* **21**, 4671-4679.
- Hammond, J. & Dienelt, M.M. (1997).** Encapsidation of a potyviral RNA in various forms of transgene coat protein is not correlated with resistance in transgenic plants. *Mol Plant-Microbe Interact* **10**, 1023-1027.
- Hammond, J. & Hammond, R.W. (2003).** The complete nucleotide sequence of isolate BYMV-GDD of *Bean yellow mosaic virus*, and comparison to other potyviruses. *Arch Virol* **148**, 2461-2470.
- Hanahan, D., (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harrison, B.D., Mayo, M.A. & Baulcombe, D.C. (1987).** Virus resistance in transgenic plants that express *Cucumber mosaic virus* satellite RNA. *Nature* **328**, 799-802.
- Hartmann, W. (1999).** Jojo - die erste absolut scharkaresistente Zwetschensorte. *Obstbau* **2**, 68-69.
- Hartmann, W. (2002).** The importance of hypersensitivity for breeding plums and prunes resistant to *Plum pox virus* (Sharka). *Acta Hort* **577**, 33-37.
- Hartmann, W., (1995).** Elena - eine neue spätreife Zwetschensorte aus Hohenheim. *Obstbau* **20**, 443-445.
- Hartmann, W., Grzyb, Z.S., Zmarlicki, K. & Sitarek, M., (1997).** Strategy for breeding sharka resistant plums. *Acta Hort* **478**, 31-38.
- Haseloff, J. (2000).** Green fluorescent protein. Homepage: <http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/Home.html>, weitere Seiten, Stand: Juni 2004.
- Haseloff, J., Siemering, K.R. Prasher D.C. & Hodge, S. (1997).** Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 2122-2127.
- Heim, R., Cubitt, A. & Tsien, R.Y. (1995).** Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.
- Heim, R., Prasher D.C. & Tsien, R.Y. (1994).** Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 12501-12504.
- Heinlein, M., Epel, B.L. Padgett H.S. & Beachy, R.N. (1995)** Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* **270**, 1983-1985.
- Hellmann, G.M., Shaw, J.G. & Rhoads, R.E. (1988).** In vitro analysis of *Tobacco vein mottling virus* NIa cistron: evidence for a virus-encoded protease. *Virology* **163**, 554-562.
- Hibbs, A.R. (2004).** Confocal microscopy for biologists. Kluwer Academic Publishers.
- Hollings, M. & Brunt, A.A. (1981).** Potyvirusgroup. CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No. 245.
- Hong, Y. & Hunt, A.G. (1996).** RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **226**, 146-151.
- Hong, Y., Levay, K., Murphy, J.F., Klein, P.G., Shaw, J.G. & Hunt, A.G. (1995).** A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. *Virology* **214**, 159-166.
- Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H. & Raccah, B. (1994).** Mutations in the helper component protease gene of *Zucchini yellow mosaic virus* affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J Gen Virol* **75**, 1407-1414.
- Hull, R. & Plaskitt, A. (1970).** Electron microscopy on the behaviour of two strains of *Alfalfa mosaic virus* in mixed infections. *Virology* **42**, 773-776.

- Hull, R. (1994).** Risks in using transgenic plants? *Science* **264**, 1649-1650.
- Hull, R. (2002).** Matthews' Plant Virology. 4th edn. Academic Press San Diego.
- Husiman, M.J., Linthorst, H.J.M. Bol, J.F. & Cornelissen, B.J.C. (1988).** The complete nucleotide sequence of *Potato virus X* and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. *J Gen Virol* **69**, 1789-1798.
- Innis, M. & Gelfand, D. (1999).** Optimization of PCR: Conversations between Michael and David. In: PCR applications: Protocols for functional genomics. Innis, M.A., Gelfand, D.H. & Sinninsky, J.J. (eds.). Academic Press, San Diego.
- Jacquet, C., Delecolle, B., Raccach, B., Lecoq, H., Dunez, J. & Ravelonandro, M. (1998a).** Use of modified *Plum pox virus coat* protein genes developed to limit heteroencapsidation-associated risks in transgenic plants. *J Gen Virol* **79**, 1509-1517.
- Jakab, G., Vaistij, F.E., Droz, E. & Malnoe, P. (1997).** Transgenic plants expressing viral sequences create a favourable environment for recombination between viral sequences. In: Virus-Resistant Transgenic Plants: Potential Ecological Impact. Tepfer, M. & E. Balázs (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. & Bewan, M.W. (1987).** GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**, 3901-3907.
- Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. (1998).** A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**, 461-470.
- Kasschau, K.D., Cronin, S. & Carrington, J.C. (1997).** Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of *Tobacco etch potyvirus* helper component-proteinase. *Virology* **228**, 251-262.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, J., Krizan, K.A. & Carrington, J.C. (2003).** P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev Cell* **4**, 205-217.
- Kegler, H. & Schade, C. (1971).** *Plum pox virus*. CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No. 70.
- Kegler, H., Fuchs, E., Gruntzig, M. & Schwarz, S., (1998).** Einige Ergebnisse 50jähriger Forschung zur Scharkaresistenz. *Erwerbsobstbau* **40**, 180-184.
- Kim, K.-H., Kwon, S.J. & Hemenway, C. (2002).** Cellular protein binds to sequences near the 5'-terminus of *Potato virus X* RNA that are important for virus replication. *Virology* **301**, 305-312.
- Klein, P.G., Klein, R.R., Rodríguez-Cerezo, E., Hunt, A.G. & Shaw, J.G. (1994).** Mutational analysis of the *Tobacco vein mottling virus* genome. *Virology* **204**, 759-769.
- Koenig, R. & Büttner, G. (2004).** Strategies for the detection of potential *Beet necrotic yellow vein virus* genome recombinations which might arise as a result of growing A type coat protein gene-expressing sugarbeets in soil containing B type virus. *Transgenic Res* **13**, 21-28.
- Koenig, R. & Lesemann, D.-E. (1989).** *Potato virus X*. CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No. 354.
- Korte, A.M., Maiss, E., Kramer, I. & Casper, R. (1995).** Biosafety considerations of different *Plum pox potyvirus* (PPV) genes used for transformation of plants. *Acta Hort* **368**, 280-284.
- Krishnamurthy, K., Heppler, M., Ruchira, M., Blancaflor, E., Payton, M., Nelson, R.S. & Verchot-Lubicz, J. (2003).** The *Potato virus X* TGBp3 protein associates with the ER network for virus cell-to-cell movement. *Virology* **309**, 135-151.

- Krishnamurthy, K., Mitra, R., Payton, M.E. & Verchot-Lubicz, J. (2002).** Cell-to-cell movement of the PVX 12K, 8K, or coat proteins may depend on the host, leaf developmental stage, and the PVX 25K protein. *Virology* **300**, 269-281.
- Lai, M.M. (1992).** RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Rev* **56**, 61-79.
- Laimer da Camara Machado, M., da Camara Machado, A., Hanzer, V., Weiss, H., Regner, F., Steinkellner, A., Mattanovich, D., Plail, R., Knapp, E., Kalthoff, B. & Kattinger, H. (1992).** Regeneration of transgenic plants of *Prunus armenica* containing the coat protein of *Plum pox virus*. *Plant Cell Rep* **11**, 25-29.
- Láin, S., Riechmann, J.L. & García, J.A. (1990).** RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive-strand RNA virus. *Nucl Acids Res* **18**, 7003-7006.
- Láin, S., Riechmann, J.L. & García, J.A. (1989).** The complete nucleotide sequence of *Plum pox potyvirus* RNA. *Virus Res* **13**, 157-172.
- Langenberg, W.G. (1986).** Virus protein association with cylindrical inclusions of two viruses of two viruses that infect wheat. *J Gen Virol* **67**, 1161-1168.
- Laporte, C., Vetter, G., Loudes, A.M., Robinson, D.G., Hillmer, S., Stussi-Garaud, C. & Ritzenthaler, C. (2003).** Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of *Grapevine fanleaf virus* movement protein in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* **15** 2058-2075.
- Lecoq, H., Ravelonandro, M., Wipf-Scheibel, C., Monsion, M., Raccah, B. & Dunez, J. (1993).** Aphid transmission of a non-aphid-transmissible strain of *Zucchini yellow mosaic potyvirus* from transgenic plants expressing the capsid protein of *Plum pox potyvirus*. *Mol Plant-Microbe Interact* **6**, 403-406.
- Léonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M.G. & Laliberté, J.-F. (2000).** Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J Virol* **74**, 7730-7737.
- Lesemann, D.-E. (1988).** Cytopathology. In: *The Plant Viruses – The Filamentous Plant Viruses*, pp. 179-235. Milne, R.G. (ed.). New York: Plenum Publishing.
- Lin, N.S., Hsu, Y.T. & Hsu, H.T. (1990).** Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* **80**, 824-828.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M. & Dougherty, W.G. (1993).** Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* **5**, 1749-1759.
- Lippincott-Schwartz, J. & Patterson, G.H. (2003).** Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* **300**, 87-91.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A. & Carrington, J.C. (2002).** Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* **14**, 1605-1619.
- Lomonosoff, G.P. (1995).** Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* **33**, 323-343.
- López-Moya, J.J., Fernández-Ferández, M.R., Cambra, M. & García, J.A. (2000).** Biotechnological aspects of *Plum pox virus*. *J Biotechnol* **76**, 121-136.
- López-Moya, J.J., Wang, R.Y. & Pirone, T.P. (1999).** Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *J Gen Virol* **80**, 3281-3288.

- Lough, T.J., Netzler, N.E., Emerson, S.J., Sutherland, P., Carr, F., Beck, D.L., Lucas, W.J. & Forster, R.L.S. (2000).** 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**, 962-974.
- Lough, T.J., Shash, K., Xoconostle-Cazares, B., Hofstra, K.R., Beck, D.L., Balmori, E., Forster, R.L.S. & Lucas, W.J. (1998).** 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**, 801-814.
- MacFarlane, S.A. & Popovic, A.H. (2000).** Efficient expression of foreign proteins in roots from tobnavirus vectors. *Virology* **267**, 29-35.
- Maia, I.G. & Bernardi, F. (1996).** Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed *Potato virus Y* helper component-proteinase. *J Gen Virol* **77**, 869-877.
- Maiss, E. (1993).** Das Scharka-Virus der Pflaume (PPV): Ein Beispiel für die Nutzung der molekularbiologischen Charakterisierung von Pflanzenviren. Habilitationsschrift Universität Hannover.
- Maiss, E., Timpe, U., Briske, A., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, G., Mattanovich, D. & Katinger, H.W.D. (1989).** The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* RNA. *J Gen Virol* **70**, 513-524.
- Maiss, E., Timpe, U., Briske, A., Lesemann, D.E. & Casper, R., (1992).** Infectious in vivo transcripts of *Plum pox potyvirus* full-length cDNA clone containing the *Cauliflower mosaic virus* 35S RNA promoter. *J Gen Virol* **73**, 709-713.
- Maiti, I.B., Murphy, J.F., Shaw, J.G. & Hunt, A.G. (1993).** Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 6110-6114.
- Malinowski, T., Zawadzka, B., Ravelonandro, M. & Scorza, R. (1998).** Preliminary report on the apparent breaking of resistance of a transgenic plum by chip bud inoculation of *Plum pox virus* PPV-S. *Acta Virol* **42**, 241-243.
- Manganaris, G.A., Economou, A.S., Boubourakas, I.N. & Katis, N.I. (2003).** Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Rep* **22**, 195-200
- Marathe, R., Anandalakshmi, R., Smith, T.H., Pruss, G.J. & Vance, V.B. (2000).** RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol Biol* **43**, 295-306.
- Masuta, C., Ueda, S., Suzuki, M. & Uyeda, I. (1998).** Evolution of a quadripartite hybrid virus by interspecific exchange and recombination between replicase components of two related tripartite RNA viruses. *Proc Nat Acad Sci USA* **95**, 10487-92.
- Masuta, C., Yamana, T., Tacahashi, Y., Uyeda, I., Sato, M., Ueda, S. & Matsumura, T. (2000).** Development of *Clover yellow vein virus* as an efficient, stable gene-expression system for legume species. *Plant J* **23**, 539-546.
- Matthews, R.E.F. (1991).** Plant Virology. 3rd Edition. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovic, Publishers. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Matz, V.M., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitzky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov M.L. & Lukyanov, S.A. (1999).** Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat Biotechnol* **17**, 969-973.
- McKinney, H.H. (1929).** Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *J Agric Res* **39**, 557-578.

- Menzel, W., Jelkmann, W. & Maiß, E. (2002).** Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J Virol Methods* **99**, 81-92.
- Merits, A., Guo, D. & Saarma, M. (1998).** VPg, coat protein and five non-structural proteins of *Potato A potyvirus* bind RNA in a sequence-unspecific manner. *J Gen Virol* **79**, 3123-3127.
- Meyershans, A., Vartanian, J.P. & Wain-Hobson, S. (1990).** DNA recombination during PCR. *Nucleic Acids Res* **18**, 1687-1691.
- Moonan, F., Molina, J. & Mirkov, T.E. (2000).** *Sugarcane yellow leaf virus*: an emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. *Virology* **269**, 156-171.
- Moreno, I.M., Malpica, J.M., Diaz-Pendon, J.A., Moriones, E., Fraile, A. & García-Arenal, F. (2004).** Variability and genetic structure of the population of *Watermelon mosaic virus* infecting melon in Spain. *Virology* **318**, 451-60.
- Moreno, M., Bernal, J.J., Jimenez, I. Rodriguez-Cerezo, E. (1998).** Resistance in plants transformed with the P1 or P3 gene of *Tobacco vein mottling potyvirus*. *J Gen Virol* **79**, 2819-2827.
- Moury, B. (2004).** Differential selection of Genes of *Cucumber Mosaic Virus* subgroups. *Mol Biol Evol* [im Druck].
- Murphy, J.F., Klein, P.G., Hunt, A.G. & Shaw, J.G. (1996).** Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology* **220**, 535-538.
- Murphy, J.F., Rhoads, R.E., Hunt, A.G. & Shaw, J.G. (1990).** The VPg of *Tobacco etch virus* RNA is the 49 kDa proteinase or the N-terminal 24 kDa part of the proteinase. *Virology* **178**, 285-288.
- Murphy, J.F., Rychlik, W., Rhoads, R.E., Hunt, A.G. & Shaw, J.G. (1991).** A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of *Tobacco vein mottling virus* links the VPg to the viral RNA. *J Virol* **65**, 511-513.
- Myrta, A., Potere, O., Crescenzi, A., Nuzzaci, M. & Boscia, D. (2000).** Properties of two monoclonal antibodies specific to the cherry strain of *Plum pox virus*. *J Plant Pathol* **82**, 95-101.
- Nagy, P.D. & Bujarski, J.J. (1995).** Efficient system of homologous RNA recombination in *Brome Mosaic Virus*: sequence and structure requirements and accuracy of crossovers. *J Virol* **69**, 131-140.
- Nagy, P.D. & Simon, A.E. (1997).** New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* **235**, 1-9.
- Nagy, P.D. & Simon, A.E. (1998a).** *In Vitro* characterization of late steps of RNA recombination in *Turnip Crinkle Virus* I. Role of the motif1-hairpin structure *Virology* **249**, 379-392
- Nagy, P.D. & Simon, A.E. (1998b).** *In vitro* characterization of late steps of RNA recombination in *Turnip Crinkle Virus* II. The role of the priming stem and flanking sequences. *Virology* **249**, 393-405.
- Nemchinov, L., Crescenzi, A., Hadidi, A., Piazzolla, P. & Verderevskaya, T.D. (1998).** Plant virus disease control. In: Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa H (eds), Present status of the new cherry subgroup of *Plum pox virus* (PPV-C), pp 629-638. APS press, St. Paul Minnesota, USA.
- Nemchinov, L., Hadidi, A, Maiss, E., Cambra, M., Candresse, T. & Damsteegt, V. (1996).** Sour cherry strain of *Plum pox potyvirus* (PPV): Molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains. *Phytopathology* **86**, 1215-1221.
- Nemchinov, L., Hadidi, A. & Verderevskaya, T.D. (1995).** Detection and partial characterization a *Plum pox virus* isolate from infected sour cherry. *Acta Hort* **386**, 207-221.

- Nemchinov, L., Hammond, J. & Hadidi, A. (1998).** Nucleotide sequence of the putative replicase gene of the sour cherry strain of *Plum pox potyvirus*. *Arch Virol* **143**, 2247-2252.
- Németh, M. (1986).** Viruses, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Németh, M. (1994).** History and importance of *Plum pox virus* in stone-fruit production. *EPPO Bull* **24**, 525-536.
- Nicolas, O., Dunnington, S.W., Gotow, L.F., Pirone, T.P. & Hellmann, G.M. (1997).** Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome va gene resistance in tobacco. *Virology* **237**, 452-459.
- Nicolas, O., Pirone, T.P. & Hellmann, G.M. (1996).** Construction and analysis of infectious transcripts from a resistance-breaking strain of *Tobacco vein mottling potyvirus*. *Arch Virol* **141**, 1535-1552.
- Nie, X. & Singh, R.P. (2003a).** Evolution of North American PVY(NTN) strain Tu 660 from local PVY(N) by mutation rather than recombination. *Virus Genes* **26**, 39-47.
- Nie, X. & Singh, R.P. (2003b).** Specific differentiation of recombinant PVY(N:O) and PVY(NTN) isolates by multiplex RT-PCR. *J Virol Methods* **113**, 69-77.
- Okabe, M. (1997).** "Green mice" as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407**, 313-319.
- Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M.A., Candresse, T., Esteban, O., Gorrís, M.T. & Asensio M. (1997).** Simultaneous detection and typing of *Plum pox potyvirus* (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *J Virol Methods* **68**, 127-137.
- Oparka, K.J., Roberts, A.G. Prior, D.A.M. Chapman, S. Baulcombe, D. & Santa Cruz, S. (1995).** Imaging the green fluorescent protein in plants – viruses carry the torch. *Protoplasma* **189**, 133-141.
- Oparka, K.J., Roberts, A.G. Santa Cruz, S. Boevink, P. Prior, D.A.M. & A. Smallcombe, (1997).** Using GFP to study virus invasion and spread in plant tissues. *Nature* **388**, 401-402.
- Ormö, M., Cubitt, A.B. Kallio, K. Gross, L.A. Tsien R.Y. & Remington, S.J. (1996).** Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395.
- Osbourn, J.K., Sarkar, S. & Wilson, T.M.A. (1990).** Complementation of coat protein-defective TMV mutants in transgenic tobacco plants expressing TMV coat protein. *Virology* **179**, 921-925.
- Ow, D.W., Wood, K.V. DeLuca, M. de Wet, J.R. Helinski, D.R. & Howell, S.H. (1986).** Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* **234**, 856-859.
- Paalme, V., Gammelgård, E., Järvekülg, L. & Valkonen, J.P.T. (2004)** *In vitro* recombinants of two nearly identical potyviral isolates express novel virulence and symptom phenotypes in plants. *J Gen Virol* **85**, 739-747.
- Palkovics, L., Wittner, A & Balázs, E. (1995).** Pathogen-derived resistance induced by integrating the *Plum pox coat* protein gene into plants of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Hort* **386**, 311-317.
- Pang, S.-Z., Jan, F.-J., Carney, K., Stout, J., Tricoli, D.M., Quemada, H.D. & Gonsalves, D. (1996).** Post-transcriptional transgene silencing and consequent tospovirus resistance in transgenic lettuce are affected by transgene dosage and plant development. *Plant J* **9**, 899-909.
- Pennazio, S., Roggero, P. & Conti, M. (2001).** A history of plant virology: Cross protection. *New Microbiol* **24**, 99-114.

- Petruschke, M. & Schröder, M. (1999).** Scharaka - Resistenzverhalten von neuen Hohenheimer Zwetschenkreuzungen. *Obstbau* **3**, 166-169.
- Petruschke, M., (1990).** Scharkatolerante Sorten für einen wirtschaftlichen Pflaumen- und Zwetschenanbau. *Erwerbsobstbau* **32**, 80-83.
- Petzold, E. (2000).** Scharka – das große Problem. *Monatsschrift* **4**, 282-284.
- Pio-Riberio, G., Wyatt, S.D. & Kuhn, C.W. (1978).** Cowpea stunt: A disease caused by a synergistic interaction of two viruses. *Phytopathology* **68**, 1260-1265.
- Pirone, T. & Shaw, J.G. (1988).** *Tobacco vein mottling virus*. AAB Descriptions of Plant Viruses No. 325.
- Pogue, G.P., Lindbo, J.A., Garger, S.J. & Fitzmaurice, W.P. (2002).** Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. *Annu Rev Phytopathol* **40**, 45-74.
- Polák, J., Oukropec, I., Kominek, P., Krska, B. & Bittoova, M., (1997).** Detection and evaluation of resistance of apricots and peaches to *Plum pox virus*. *Z Pflanzenkr Pflanzenschutz* **104**, 466-473.
- Pooggin, M., Shivaprasad, P.V., Veluthambi, K. & Hohn, T. (2003).** RNAi targeting of DNA virus in plants. *Nat Biotechnol* **21**, 131-132.
- Pouwels, J., Kornet, N., van Bers, N., Guighelaar, T., van Lent, J., Bisseling, T. & Wellink, J. (2003).** Identification of distinct steps during tubule formation by the movement protein of *Cowpea mosaic virus*. *J Gen Virol* **84**, 3485-3494.
- Powell-Abel, P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Frayley, R.T. & Beachy, R.N. (1986).** Delay of disease development in transgenic plants that express the *Tobacco mosaic virus* coat protein gene. *Science* **232**, 738-43.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. & Cormier, M.J. (1992).** Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. & Vance, V.B. (1997).** Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**, 859-868.
- Raccach, B., Blanc, S. & Huet, H. (2001).** Molecular basis of vector transmission. In: Harris, K., Duffus, J.E. & Smith, O.P. (eds.). *Virus-Insect-Plant Interactions*. Academic Press, San Diego.
- Rajamäki, M. & Valkonen, J.T.P. (1999).** The 6K2 protein and the VPg of *Potato virus A* are determinants of systemic infection in *Nicotiana glauca*. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**, 1074-1081.
- Rajamäki, M. & Valkonen, J.T.P. (2002).** Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**, 136-149.
- Rajamäki, M. & Valkonen, J.T.P. (2003).** Localization of a potyvirus and the genome-linked protein in wild potato leaves at an early stage of systemic infection. *Mol Plant-Microbe Interact* **16**, 25-34.
- Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A. & Baulcombe, D.C. (1999).** Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* **11**, 1207-1215.
- Ravelonandro, M., Monsion, M., Delbos, R. & Dunez, J. (1993).** Variable resistance to *Plum pox virus* and *Potato virus-Y* infection in transgenic *Nicotiana* plants expressing *Plum pox virus* coat protein. *Plant Sci* **91**, 157-169.

- Regner, F., da Camara Machado, A., da Camara Machado, M.L., Steinkellner, H., Mattanovich, D., Hanze, V., Weiss, H. & Katinger, H. (1992).** Coat protein mediated resistance to *Plum pox virus* in *Nicotiana clevelandii* and *benthamiana*. *Plant Cell Rep* **11**, 33-33.
- Reichel, C., Más P. & Beachy, R.N. (1999).** The role of the ER and cytoskeleton in plant viral trafficking. *Trends Plant Sci* **4**, 458-461.
- Reid, M.S. & Matthews, R.E.F. (1966).** On the origin of the mosaic induced by *Turnip yellow mosaic virus*. *Virology* **28**, 563-570.
- Restrepo-Hartwig, M.A. & Carrington, J.C. (1992).** Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *J Virol* **66**, 5662-5666.
- Restrepo-Hartwig, M.A. & Carrington, J.C. (1994).** The *Tobacco etch potyvirus* 6-kilodalton protein is membrane-associated and involved in viral replication. *J Virol* **68**, 2388-2397.
- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T. & Maule, A.J. (1999).** New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions *Mol Plant-Microbe Interact* **12**, 367-376.
- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., Le Romancer, M. & Dunez, J. (1996).** Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *J Gen Virol* **77**, 1953-1965.
- Riechmann, J.L., Lain, S. & García, J.A. (1992).** Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* **73**, 1-16.
- Riedel, D., Lesemann, D.E. & Maiss, E. (1998).** Ultrastructural localization of nonstructural and coat proteins of 19 potyviruses using antisera to bacterially expressed proteins of *Plum pox potyvirus*. *Arch Virol* **143**, 2133-2158.
- Roberts, I.M., Boevink, P., Roberts, A.G., Sauer, N., Reichel, C. & Oparka, K.J. (2001).** Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. *Protoplasma* **218**, 31-44.
- Roberts, I.M., Wang, D., Findlay, K. & Maule, A.J. (1998).** Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* **245**, 173-181.
- Rochow, W.F. & Ross, A.F. (1955).** Virus multiplication in plants doubly infected by *Potato virus X* and *Y*. *Virology* **1**, 10-27.
- Rodriguez-Cerezo, E. & Shaw, J.G. (1991).** Two newly detected nonstructural viral proteins in potyvirus-infected cells. *Virology* **185**, 572-579.
- Rodríguez-Cerezo, E., Findlay, K., Shaw, J.G., Lomonosoff, G.P., Qiu, S.G., Linstead, P., Shanks, M. & Risco, C. (1997).** The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* **236**, 296-306.
- Rodriguez-Cerezo, E., Klein, P.G. & Shaw, J.G. (1991).** A determinant of disease symptom severity is located in the 3'-terminal noncoding region of the RNA of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 9863-9867.
- Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L. & Lucas, W.J. (1997).** Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**, 283-295.
- Roossinck, M.J. (1997).** Mechanisms of plant virus evolution. *Ann Rev Phytopathol* **35**, 191-209.
- Roossinck, M.J. (2003).** Plant RNA virus evolution. *Curr Opin Microbiol* **6**, 406-409.
- Roth, B.M., Pruss, G.J. & Vance, V.B. (2004).** Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res* **102**, 97-108.

- Roudet-Tavert, G., German-Retana, S., Delaunay, T., Delecolle, B., Candresse, T. & Le Gall, O. (2002). Interaction between potyvirus helper component-proteinase and capsid protein in infected plants. *J Gen Virol* **83**, 1765-1770.
- Rubio, M., Dicenta F. & Martínez-Gómez, P. (2003). Susceptibility to sharka (*Plum pox virus*) in *Prunus mandshurica* x *P. armeniaca* seedlings. *Plant Breed* **122**, 465-466.
- Ryabov, E.V., Roberts, I.M. Palukaitis, P. & Taliansky, M. (1999). Host-specific cell-to-cell and long-distance movements of *Cucumber mosaic virus* are facilitated by the movement protein of *Groundnut rosette virus*. *Virology* **260**, 98-108.
- Ryabov, E.V., van Wezel, R., Walsh, J. & Hong, Y. (2004). Cell-to-Cell, but not long-distance, spread of RNA silencing that is induced in individual epidermal cells. *J Virol* **78**, 3149-3154.
- Sáenz, P., Cervera, M.T., Dallot, S., Quiot, L., Quiot, J.B., Riechmann, J.L. & García, J.A. (2000). 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**, 557-566.
- Sáenz, P., Quiot, L., Quiot, J.B., Candresse, T. & García, J.A. (2001). Pathogenicity determinants in the complex virus population of a *Plum pox virus* isolate. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**, 278-287.
- Sáenz, P., Salvador, B., Simon-Mateo, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. & García, J.A. (2002). Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *J Virol* **76**, 1922-1931.
- Salánki, K., Carrere, I., Jacquemond, M., Balázs, E. & Tepfer, M. (1997). Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with *Cucumber mosaic virus* and *Tomato aspermy virus*. *J Virol* **71**, 3597-3602.
- Salánki, K., Gellert, A., Huppert, E., Naray-Szabo, G. & Balázs, E. (2004). Compatibility of the movement protein and the coat protein of cucumoviruses is required for cell-to-cell movement. *J Gen Virol* **85**, 1039-1048.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanford, J.C. & Johnston, S.A. (1985). The concept of pathogen derived resistance: deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J Theor Biol* **113**, 395-405.
- Santa Cruz, S., Chapman, S. Roberts, A.G. Roberts, I.M. & Prior, D.A.M. (1996). Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6268-6290.
- Savenkov, E.I. & Valkonen, J.P.T. (2001). Coat protein gene-mediated resistance to *Potato virus A* in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *J Gen Virol* **82**, 2275-2278.
- Schaad, M.C., Anderberg, A.J. & Carrington, J.C. (2000). Strain-specific interaction of *Tobacco etch virus* N1a protein with the translation initiations factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* **273**, 300-306.
- Schaad, M.C., Jensen, P.E. & Carrington, J.C. (1997). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: Role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein *EMBO J* **16**, 4049-4059.
- Schneider, W.L. & Roossinck, M.J. (2001). Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *J Virol* **75**, 6566-6571.
- Schoelz, J.E. & Wintermantel, W.M. (1993). Expansion of viral host range through complementation and recombination in transgenic plants. *Plant Cell* **5**, 1669-1679.

- Scorza, R., Callahan, A., Levy, L., Damsteegt, V., Webb, K. & Ravelonandro, M. (2001).** Post-transcriptional gene silencing in *Plum pox virus* resistant transgenic European plum containing the *Plum pox potyvirus* coat protein gene. *Transgenic Res* **10**, 201-209.
- Shahabuddin, M., Shaw, J.G. & Rhoads, R.E. (1998).** Mapping of the *Tobacco vein mottling virus* VPg cistron. *Virology* **163**, 635-637.
- Shapka, N. & Nagy, P.D. (2004).** The AU-rich RNA recombination hot spot sequence of *Brome mosaic virus* is functional in tombusviruses: implications for the mechanism of RNA recombination. *J Virol* **78**, 2288-2300.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. & Saiga, Y. (1962).** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-239.
- Shivprasad, S., Pogue, G.P. Lewandowski, D.J. Hidalgo, J. Donson, J. Grill, L.K. & Dawson, W.O. (1999).** Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in *Tobacco mosaic virus*-based vectors. *Virology* **225**, 312-323.
- Shukla, D.D. & Ward, C.W. (1988).** Amino acid sequence homology of coat protein as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *J Gen Virol* **69**, 2703-2710.
- Shukla, D.D., Ward, C.W. & Brunt, A.A. (1994).** The Potyviridae. CAB International. Wallingford, UK.
- Shuldiner, A.R., Nirula, A. & Roth, J. (1989).** Hybrid DNA artifact from PCR of closely related target sequences. *Nucleic Acids Res* **17**, 4409.
- Silbernagel, M.J., Mink, G.I., Zhao, R.L. & Zheng, G.Y. (2001).** Phenotypic recombination between *Bean common mosaic* and *Bean common mosaic necrosis potyviruses* in vivo. *Arch Virol* **146**, 1007-1020.
- Slilaty, S.N. & Lebel, S. (1998).** Accurate insertional inactivation of lacZalpha: construction of pTrueBlue and M13TrueBlue cloning vectors. *Gene* **213**, 83-91.
- Solomon-Blackburn, R.M. & Barker, H. (2001a).** A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations. *Heredity* **86**, 8-16.
- Solomon-Blackburn, R.M. & Barker, H. (2001b).** Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. *Heredity* **86**, 17-35.
- Sriskanda, V.S., Pruss, G., Ge, X. & Vance, V.B. (1996).** 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**, 5266-5271.
- SSP, (2000).** Report of the Scientific Steering Committee's Working Group on Harmonisation of Risk Assessment Procedures in the Scientific Committees advising the European Commission in the area of human and environmental health. 26-27 October 2000. (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out82_en.pdf, Stand: Juni 2004)
- Strasser, R.J. & Buttler, W.L. (1977).** The yield of energy transfer and the spectral distribution of excitation energy in the photochemical apparatus of flashed bean leaves. *Biochim Biophys Acta* **462**, 295-306.
- Sudarshana, M.R., Wang, H.L. Lucas W.J. & Gilbertson, R.L. (1998).** Dynamics of *Bean dwarf mosaic geminivirus* cell-to-cell and long distance movement in *Phaseolus vulgaris* revealed, using the green fluorescent protein. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**, 277-291.
- Sun, M.K.C., Gooding, G.V., Pirone, T.P. & Tolin, S.A. (1974).** Properties of *Tobacco vein-mottling virus*, a new pathogen of tobacco. *Phytopathology* **64**, 1133-1136.

- Suzuki, M., Hibi, T. & Masuta, C. (2003).** RNA recombination between cucumoviruses: possible role of predicted stem-loop structures and an internal subgenomic promoter-like motif. *Virology* **306**, 77-86.
- Suzuki, M., Kuwata, S., Masuta, C. & Takanami, Y. (1995).** Point mutations in the coat protein of *Cucumber mosaic virus* affect symptom expression and virion accumulation in tobacco. *J Gen Virol* **76**, 1791-1799.
- Svarovskaia, E.S., Delviks, K.A., Hwang, C.K. & Pathak, V.K. (2000).** Structural determinants of *Murine leukemia virus* reverse transcriptase that affect the frequency of template switching. *J Virol* **74**, 7171-7178.
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnar, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Banfalvi, Z. & Burgyán, J. (2003).** Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J* **22**, 633-640.
- Takeshita, M., Suzuki, M. & Takanami, Y. (2001).** Combination of amino acids in the 3a protein and the coat protein of *Cucumber mosaic virus* determines symptom expression and viral spread in bottle gourd. *Arch Virol* **146**, 697-711.
- Tamai, A., Kubota, K., Nagano, H., Yoshii, M., Ishikawa, M., Mise, K. & Meshi, T. (2003).** Cucumovirus- and bromovirus-encoded movement functions potentiate cell-to-cell movement of tobamo- and potexviruses. *Virology* **315**, 56-67.
- Tavert-Roudet, G., Ravelonandro, M., Bachelier, J.-C. & Dunez, J. (1998).** Transgenic *Nicotiana benthamiana* plants containing the P1 gene of *Plum pox virus* are resistant to virus challenge. *Eur J Plant Pathol* **104**, 103-107.
- Tepfer, M. (1993).** Viral genes and transgenic plants: What are the potential environmental risks? *BioTechnology* **11**, 1125-1132.
- Tepfer, M. (2002).** Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annu Rev Phytopathol* **40**, 467-491.
- Timpe, U., Maiss, E., Landsmann, J. & Casper, R. (1992).** "Coat protein mediated cross protection" gegen das Scharka Virus. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* **238**, 212.
- Tobias, I., Palkovics, L., Tzekova, L. & Balázs, E. (2001).** Replacement of the coat protein gene of *Plum pox potyvirus* with that of *Zucchini yellow mosaic potyvirus*: characterization of the hybrid potyvirus. *Virus Res* **76**, 9-16.
- Tomimura, K., Gibbs, A.J., Jenner, C.E., Walsh, J.A. & Ohshima, K. (2003).** The phylogeny of *Turnip mosaic virus*; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent 'emergence' in east Asia. *Mol Ecol* **12**, 2099-2111.
- Toth, R.L., Pogue, G.P. & Chapman, S. (2002).** Improvement of the movement and host range properties of a plant virus vector through DNA shuffling. *Plant J* **30**, 593-600.
- Tsien, R.Y. (1998).** The green fluorescent protein. *Ann Rev Biochem* **67**, 509-544.
- Tsien, R.Y. (1999).** Rosy dawn for fluorescent proteins. *Nat Biotechnol* **17**, 956-957.
- Ullmann, A. (1967).** Characterisation by *in-vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase gene of *E. coli*. *J Mol Biol* **24**, 339.
- Unsel, S., Ringel, M., Hofer, P., Hohnle, M., Jeske, H., Bedford, I.D., Markham, P.G. & Frischmuth, T. (2000)** Host range and symptom variation of pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. *Arch Virol* **145**, 1449-1454.

- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.L. & Bernardi, F. (2001).** Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res* **74**, 157-175.
- Valentine, T.A., Roberts, I.M. & Oparka, K.J. (2002).** Inhibition of *Tobacco mosaic virus* replication in lateral roots is dependent on an activated meristem-derived signal. *Protoplasma* **219**, 184-196.
- Valkonen, J.P., Rajamaki, M.L. & Kekarainen, T. (2002).** Mapping of viral genomic regions important in cross-protection between strains of a potyvirus. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**, 683-692.
- van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes M.K., Lemon, S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. & Wickner, R.B. (2000).** Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego.
- Vance V.B., Berger, P.H., Carrington, J.C., Hunt, A.G., & Shi, X.M. (1995).** 5' proximal sequences mediate *Potato virus X*/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* **206**, 583-590.
- Varrelmann, M. & Maiss, E. (2000).** 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**, 567-576.
- Varrelmann, M. (1999).** Begrenzung von Heterologer Enkapsidierung und Rekombination bei Pathogen-vermittelter Resistenz gegen das *Plum pox virus* der Pflaume (PPV). Dissertation, Universität Hannover.
- Varrelmann, M., Palcovics, L. & Maiss, E. (2000).** Transgenic or plant expression vector-mediated recombination of *Plum pox virus*. *J Virol* **74**, 7462-7469.
- Verchot, J. & Carrington, J.C. (1995).** Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome amplification. *J Virol* **69**, 3668-3674.
- Verchot, J., Koonin, E.V. & Carrington, J.C. (1991).** The 35-kDa protein from the N-terminus of a potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* **185**, 527-535.
- Verver, J., Wellink, J. Van Lent, J. Gopinath, K. & Van Kammen, A. (1998).** Studies on the movement of *Cowpea mosaic virus* using the jellyfish green fluorescent protein. *Virology* **242**, 22-27.
- Verwoerd, T.C., Dekker, B.M.M. & Hoekema, A., (1989).** A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res* **17**, 2362.
- Voinnet, O. & Baulcombe, D.C. (1997).** Systemic signaling in gene silencing. *Nature* **389**, 553-555.
- von Bodman, S.B., Domier, L.L. & Farrand, S.K. (1995).** Expression of multiple eukaryotic genes from a single promoter in *Nicotiana*. *BioTechnology* **13**, 587-591.
- Wang, D. & Maule, A.J. (1995).** Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication. *Science* **267**, 229-231.
- Wassenegger, M. (1999).** Signalling in gene silencing. *Trends Plant Sci* **4**, 207-209.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.-B. & Lough, T. (2001).** Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-841.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Delbos, R.P., Mazyad, H., Aboul-Ata, A.E. & Dunez, J. (1991).** Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of the El Amar strain of *Plum pox potyvirus*. *J Gen Virol* **72**, 1741-1746.
- White, K. A., and Morris, T. J. (1995).** RNA determinants of junction site selection in RNA virus determinants and defective interfering RNAs. *RNA* **1**, 1029-1040.

- White, K. A., Bancroft, J. B. & Mackie, G.A. (1992).** Mutagenesis of a hexanucleotide sequence conserved in potexvirus RNAs. *Virology* **189**, 817-820.
- Wintermantel, W.M. & Schoelz, J.E. (1996).** Isolation of recombinant viruses between *Cauliflower mosaic virus* and a viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selection pressure. *Virology* **223**, 156-164.
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M.G. & Laliberté, J.-F. (1997).** Interaction of the viral protein linked genome of *Turnip yellow mosaic potyvirus* with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**, 84-92.
- Wittner, A., Palkovics, L. & Balázs, E. (1998).** *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the *Plum pox virus* helicase gene are resistant to virus infection. *Virus Res* **53**, 97-103.
- Wouters, F.S., Verveer, P.J. & Bastiaens, P.I. (2001).** Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol* **11**, 203-211.
- Yambao, Ma.L.M., Masuta, C., Nakahara, K. & Uyeda, I. (2003).** The central and C-terminal domains of VPg of *Clover yellow vein virus* are important for VPg-HC-Pro and VPg-VPg interactions. *J Gen Virol* **84**, 2861-2869.
- Yang, S. & Ravelonandro, M. (2002).** Molecular studies of the synergistic interactions between *Plum pox virus* HC-Pro protein and *Potato virus X*. *Arch Virol* **147**, 2301-2312.
- Yang, Y., Ding, B., Baulcombe, D.C. & Verchot, J. (2000).** Cell-to-cell movement of the 25K protein of *Potato virus X* is regulated by three other viral proteins. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**, 599-605.
- Zaitlin, M., Anderson, J.M., Perry, K.L., Zhang, L. & Palukaitis, P. (1994).** Specificity of replicase-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus*. *Virology* **201**, 200-205.
- Zamyatnin, A.A. Jr., Solovyev, A.G., Sablina, A.A., Agranovsky, A.A., Katul, L., Vetten, H.J., Schiemann, J., Hinkkanen, A.E., Lehto, K. & Morozov, S.Y. (2002).** Dual-colour imaging of membrane protein targeting directed by *Poa semilatent virus* movement protein TGBp3 in plant and mammalian cells. *J Gen Virol* **83**, 651-662.
- Zhang, G. & Weiner, J.H. (2000).** CTAB-mediated purification of PCR products. *BioTechniques* **29**, 982-986.
- Zheng, H., Chen, J., Chen, J., Adams, M.J. & Hou, M. (2002).** *Bean common mosaic virus* isolates causing different symptoms in asparagus bean in China differ greatly in the 5'-parts of their genomes. *Arch Virol* **147**, 1257-1262.
- Zhu, Y.Y., Machleder, E.M. Chenchik, A.C. Li, R. & Siebert, P.D. (2001).** Reverse transcriptase template-switching: A SMARTTM approach for full-length cDNA library construction. *BioTechniques* **30**, 892-897.
- Ziebell, H. (2003).** Investigations on infectiousness and spread of a *Plum pox virus* chimera. Diplomarbeit, Universität Hannover.

6 Anhang

6.1 Filtersätze für die Epifluoreszenzmikroskopie

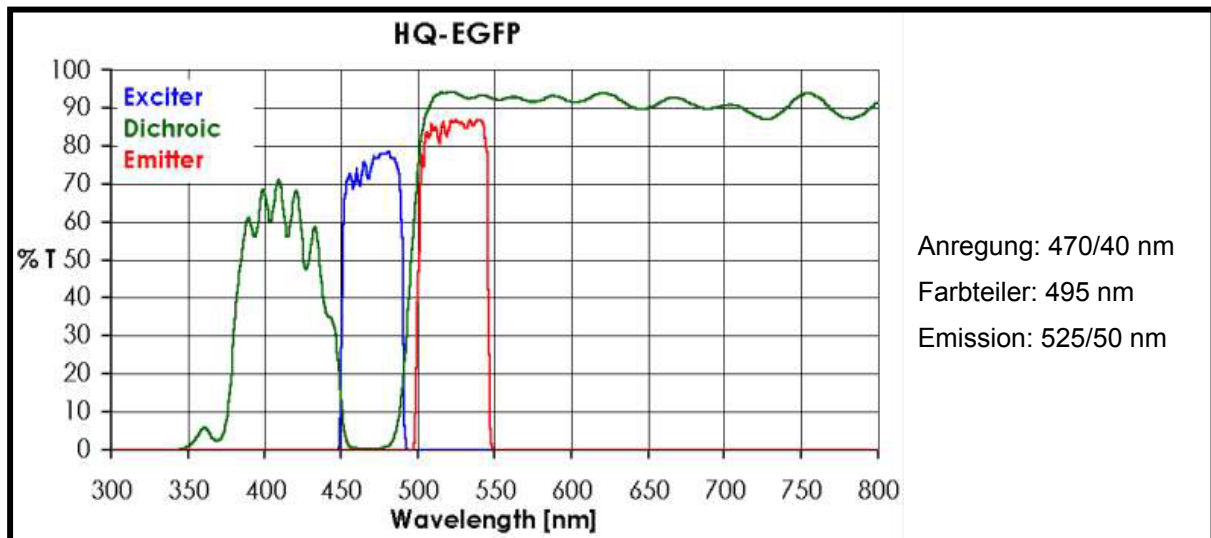


Abbildung 6-1 Filtersatz zur Detektion von S65T-GFP-Varianten in Pflanzengewebe

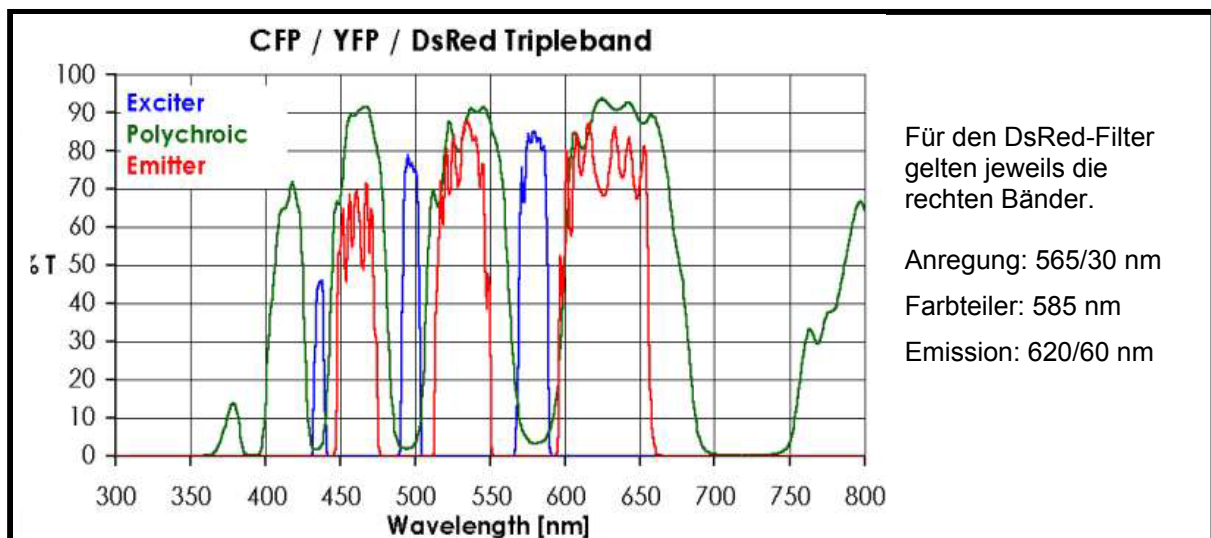


Abbildung 6-2 Filtersatz zur Detektion von CFP, YFP und DsRed in Pflanzengewebe

Der in dieser Arbeit verwendete Filtersatz war nur für die Detektion von DsRed Fluoreszenz optimiert.

7974 gacaatacactcatggttatTTTTGGCAATGACATATTCCTCCTTAAGCTTGGACACCATCCGGATACACACGATTGCAT 8053
D N T L M V I L A M T Y S L L K L G H H P D T H D C I

8054 ttgtcggtaactttgtgaatgggtgatgatcttgcctcgcagtgaccccgatatacgagacatttatgatgagcttcaag 8133
C R Y F V N G D D L V L A V H P A Y E S I Y D E L Q

8134 aacacttttcccaacttggattgaattacacattcaccacaaagactgaaaacaaggaagagctgtggtttatgtccat 8213
E H F S Q L G L N Y T F T T K T E N K E E L W F M S H

8214 aaaggcgttctctacgatgacatgtacattcccaagctggagcctgagaggattgtatcaatacttgaatgggacagatc 8293
K G V L Y D D M Y I P K L E P E R I V S I L E W D R S

8294 aaatgagccaatccatcgtattggaggcaatTTGTGCATCAATGGTGGAAAGCGTGGGGTTATAAGGAGCTGCTGAGGGAGA 8373
N E P I H R L E A I C A S M V E A W G Y K E L L R E

8374 tccgaaaatTTTACAGTTGGGTTCTTGAACAAGCACCATACAATGCTCTTTCAAAGATGGAAAAGCCCCGTACATTGCG 8453
I R K F Y S W V L E Q A P Y N A L S K D G K A P Y I A
→ *N.benthamiana* 17.27.4

8454 gagacagcactgaagaagctttacactgacactgaagcatccgagacagaaattgagcgatatcttgaagctttttacga 8533
E T A L K K L Y T D T E A S E T E I E R Y L E A F Y D
→ *N.benthamiana* 30.45.1

P10+ N1b ← → CP

8534 caacattaacgatgatgggtgagtCCAACGTTGTTGTGCACCAA gctgacgaaagagaagacgaggaggaagtgtgatgcac 8613
N I N D D G E S N V V V H Q A D E R E D E E V D A

P9-

8614 ttcaaccacctccagtcatacagcctgcaccccgactacggcgccaatgctcaacccattTTCACGCCAGCAACAAC 8693
L Q P P P V I Q P A P R T T A P M L N P I F T P A T T

8694 CAaccagcaaaaaaccagtttccaggtgtcaggacctcaactgcaaaacttttgaacatatagtcatgaggatgcac 8773
Q P A T K P V S Q V S G P Q L Q T F G T Y S H E D A S

8774 acctagcaactcaaacgcgctagtcacaacaaacagagacaggatgtcgatgcaggatcaactggaacttttacagtgc 8853
P S N S N A L V N T N R D R D V D A G S T G T F T V

8854 cacgtttgaaggcaatgacttccaaactatctctgccaaaggtgaagggaaggctattatgaacttgaaccatttggca 8933
P R L K A M T S K L S L P K V K G K A I M N L N H L A

8934 cattatagtcctgcacaggttgacttgcacaaacagagagctccgcagcttctgtttccaaacttggatgaaggagtaa 9013
H Y S P A Q V D L S N T R A P Q S C F Q T W Y E G V K

9014 gcgagactatgatgtcacggacgatgaaatgagcatcattttaaatggcttattggtttggatgcatagagaatggaacat 9093
R D Y D V T D D E M S I I L N G L M V W C I E N G T
CR2

9094 cccgaatatcaatggaatgtgggtgatgatggatggggaaacacaagtggagtatccaataaagccattgttgatcat 9173
S P N I N G M W V M M D G E T Q V E Y P I K P L L D H

9174 gcaaaaccacttttagacaaattatggcacatttcagtaacgtggctgaagcgtatattgaaaaacgaaattatgaaaa 9253
A K P T F R Q I M A H F S N V A E A Y I E K R N Y E K

9254 agcatacatgccaaaggtatggaattcagcgcacctgacagactacagcctcgccagatagcctttgatTTTTACGAAA 9333
A Y M P R Y G I Q R N L T D Y S L A R Y A F D F Y E

9334 tgacttcaacgacaccctacgggcacgtgaagctcatatccaaatgaaggcagcagcattgagaaatgttcaaaatcgt 9413
M T S T T P V R A R E A H I Q M K A A A L R N V Q N R

9414 ttatttggcttggatggaacgtcggaacacaagaagaggacacagagagacacaccgctggatgtaaatcgcaacat 9493
L F G L D G N V G T Q E E D T E R H T A G D V N R N M
CP ← → 3'-NTR *N.benthamiana* 17.27.4

9494 gcacaacctcctcggtatgagggagtgtagtggctctcggatctatcataaactctacctgggtgagagtctaaccatc 9573
H N L L G M R G V
←

9574 cagttgttttagattcctgtagcatccttttctccgctttaaagcagtagcattcagtgagggttttacctccatagt 9653

P10- *N.benthamiana*

9654 gctagctctgtaTTGTCGAACACAGGCCCTTGTatctgatgtagcagtggttccactccattcgggttatagttctgtg 9733

30.45.1 ←

9734 caagagac 9741

9289 agttacatatagcgtatctactcgcatttgtccaaacttctacttgcccatttttatcatttctgatggtaaacattcaa 9368

9369 gtaagtttgcgcaataaatatatgtacttctactattctatgattagattttcaacaaagcgaggagtacctccgttgt 9448

9449 gatctagtcactcttatactgtcggaga 9475

6.4 Fragmente des DNA-Größenmarkers λ -PstI

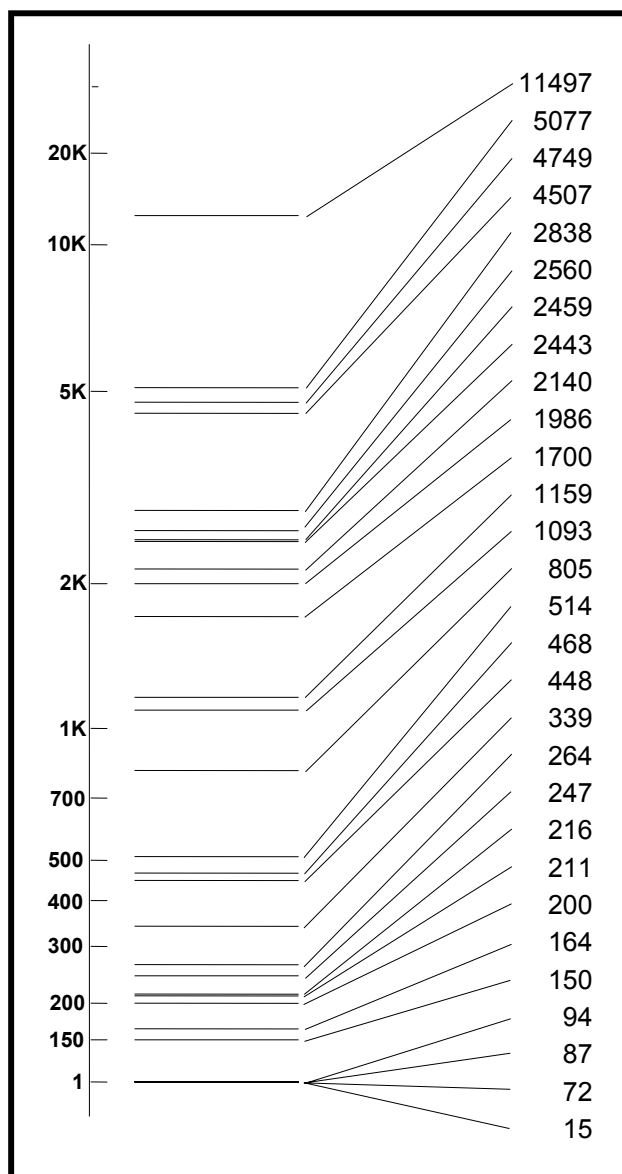


Abbildung 6-3 DNA-Fragmente nach einem Verdau von λ -DNA mit PstI

Angaben der Fragmentgrößen in bp

7 Veröffentlichungen

Im Zusammenhang mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurden vorab Teilergebnisse auf Tagungen präsentiert und in Fachzeitschriften publiziert.

Publikationen in Fachzeitschriften

Dietrich, C. & Maiss, E. (2002). Red fluorescent protein DsRed from *Discosoma* sp. as a reporter protein in higher plants. *BioTechniques* **32**, 286-295.

Dietrich, C. & Maiss, E. (2003). Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *J Gen Virol* **84**, 2871-2876.

Tagungsbeiträge

Dietrich, C., Maiss, E. & Varrelmann, M. (2000). Nachweis der systemischen Ausbreitung des *Plum pox virus* (PPV) mit dem Jellyfish green fluorescent protein (GFP). *Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft* **30** (2), 28-29.

Dietrich, C., Varrelmann, M. & Maiss, E. (2000). Verwendung des green fluorescent protein (GFP) und der beta-glucuronidase (GUS) als Reporterproteine für die Infektion des *Plum pox virus* (PPV) in *Nicotiana benthamiana* Pflanzen. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* **376**, 560-561.

Dietrich, C. & Maiss, E. (2001). Using the red fluorescent protein DsRed from *Discosoma* sp. as a reporter protein in higher plants. *Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft* **31**, 36-37.

Dietrich, C. & Maiss, E. (2002). Getrennte Ausbreitung unterschiedlich markierter viraler Klone des *Potato virus X* und des *Plum pox virus* in *N. benthamiana*. *Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft* **32**, 30-31.

Dietrich, C. & Maiss, E. (2002). Ausbreitung fluoreszenzmarkierter Viren in mischinfizierten Pflanzengeweben. *Mitteilungen aus der Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*. **390**, 499-500.

Dietrich, C. & Maiss, E. (2003). Räumliche Verteilung von Potyvirus Populationen in mischinfizierten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen. *Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft* **33**, 23.

Al Abdallah, Q., Ziebell, H., Dietrich, C. & Maiss, E. (2003). Symptomausprägung und kompetitives Verhalten eines chimären *Plum pox virus* (PPV). *Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft* **33** (2), 44.

Maiss, E., Dietrich, C. & Stephan, D. (2003). Plant virus full-length clones – Discovery of virus functions in single and mixed infections. EMBO Workshop: Genomic Approaches in Plant Virology. 28.-31. Mai, Keszthely, Ungarn.

Eidesstattliche Erklärung

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

Hannover, den 3. Juni 2004

(Christof Dietrich)

Lebenslauf

geboren am 14.06.1971 in Wehrda/Marburg a.d. Lahn,
ledig, zwei Kinder

1977 – 1992	Grundschule, Neuhausen a.d. Fildern Gymnasium Kleine Burg, Braunschweig
1992 – 1993	Zivildienst in Braunschweig
1994 – 1996	Berufsausbildung (Gärtnergehilfe) in Westerode/Duderstadt
1996 – 2000	Studium der Gartenbauwissenschaften an der Universität Hannover
1997 – 2000	Wissenschaftliche Hilfskraft an den Instituten für Angewandte Genetik und Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz der Universität Hannover
September 2000	Abschluss des Studiums als Dipl.-Ing. agr. mit der Diplomarbeit "Markierung des <i>Plum pox virus</i> und des <i>Potato virus X</i> mit verschiedenen Varianten des 'green fluorescent protein' aus <i>Aequorea victoria</i> "
01.11.2000 – 31.10.2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pflanzen- krankheiten und Pflanzenschutz, Abteilung Molekulare Phytopathologie/Virologie der Universität Hannover
seit dem 01.04.2004	Wissenschaftlicher Angestellter bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Abteilung Pflanzenviren, Braunschweig

Danksagung

Bei allen, die zum Entstehen dieser Arbeit direkt oder indirekt beigetragen haben, bedanke ich mich an dieser Stelle ausdrücklich. Mein Dank gilt vor allem

Prof. Dr. Edgar Maiß, der mir dieses Thema vermittelte und diese Arbeit mit viel Interesse und außerordentlicher Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bis zum Schluss begleitete. Ich bedanke mich auch für die Übernahme des Referates und für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Gartenbau der Universität Hannover.

Prof. Dr. H.-P. Mühlbach für sein freundliches Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Koreferates.

Prof. Dr. H.-M. Poehling für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, sowie für die Gelegenheit an der CLSM-Schulung bei Leica teilzunehmen.

der **AG Pflanzenvirologie**: Qusai Al Abdallah, Rosanna Blawid, Jill Engelmann, Stefan Flatken, Christina Gehrke, Kassa Getu, Dr. Reinhard Götz, Hannah Hassan, Anh Ta Ho, Dennis Knierim, Dr. Wulf Menzel, Ilona Rolfes, Dirk Stephan, Angelika Waltermann, Heiko Ziebell und Jutta Zimmermann für die Unterstützung und die außerordentlich gute Zusammenarbeit.

Dr. Gisela Grunewaldt-Stöcker für ihre überaus kompetenten Ratschläge und Anregungen in Sachen Fluoreszenzmikroskopie und die angenehme Zusammenarbeit.

J. Seelbinder und **W. Arndt** für ihre zuverlässige und freundliche Unterstützung im Gewächshausbereich.

Dr. Stephan Winter für seine Unterstützung während des Zusammenschreibens dieser Arbeit und seine Anregungen für Teile des Manuskripts.

I thank all members of the **VRTP IMPACT Research Consortium** for having nice meetings and helpful discussions. Additionally, I have to express my gratitude to the following scientists for kindly providing essential viral cDNA clones: **Dr. D.C. Baulcombe** (p35PVX201), **Dr. T. Pirone** (pXBS7) and **Dr. I. Uyeda** (p35CIYVV-GFP). I also thank the **Arabidopsis Biological Research Centre** (Columbus) for providing CD-328smRS-GFP.

This work was supported by contract QLK3-CT-2000-00361 from the **European Commission**.

Ich danke **Annegret Wichura** und **Helmut Schulz**, die uns in der Schlussphase dieser Arbeit so nachhaltig unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern **Monika Dietrich-Ostertag** und **Alfons Dietrich**, die mir Ausbildung und Studium ermöglicht und mich insbesondere während dieser Zeit mit ihrer Hilfsbereitschaft und Aufmerksamkeit fortwährend unterstützt haben.

Alexandra, Merret und **Hauke Wichura** haben mit mir enorm viel Geduld gehabt und mir unermüdlich gezeigt, dass "Doktorandsein" nicht alles ist. Vielen Dank!

Alexandra Wichura danke ich darüber hinaus für die Durchsicht und ausführliche Kommentierung des Manuskripts.