

**Aufklärung des Resistenzmechanismus gegen
Tospoviren von *Nicotiana tabacum* L. Pflanzen,
transformiert mit dem Nukleokapsidproteingen des
Tomato Spotted Wilt Virus mit und ohne Leadersequenz
aus dem *Plum Pox Virus*-Genom**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Frank Schwach

aus Hamburg

Hamburg, 2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. G. ADAM

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H.-P. Mühlbach

Tag der Disputation: 28. Juni 2002

Hamburg, den 14. Juni 2002



A handwritten signature in black ink, which appears to read "Udo Wienand".

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Inhalt

1	EINLEITUNG	4
1.1	Virus-Resistenz bei Pflanzen	4
1.1.1	Natürliche Resistenzen	5
1.1.2	Resistenzen in gentechnisch veränderten Pflanzen: Das Prinzip der „pathogen-derived resistance“	6
1.2	Das <i>Tomato Spotted Wilt Virus</i> (TSWV)	9
1.3	Natürliche und gentechnisch erzeugte Resistenzen gegen Tospoviren in Kulturpflanzen	12
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	13
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Material	14
2.1.1	Pflanzen	14
2.1.2	Viren	15
2.1.3	Chemikalien	16
2.1.4	Oligonukleotide für die PCR	16
2.1.5	Antikörper und Antiseren	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Kultivierung der Pflanzen	18
2.2.1.1	Kultivierung im Gewächshaus	18
2.2.1.2	<i>In vitro</i> -Kultur	18
2.2.2	Pfropfung von Tabak-Pflanzen	18
2.2.3	Herstellung von Protoplasten	19
2.2.4	Gewinnung von Inokulum und Inokulation von Pflanzenmaterial	19
2.2.4.1	Virusvermehrung	19
2.2.4.2	Reinigung von <i>Tospovirus</i> -Partikeln (Virionen)	20
2.2.4.3	Reinigung von <i>Tospovirus</i> -Nukleoproteinkomplexen	20
2.2.4.4	Inokulation von Pflanzen	21
2.2.4.5	Inokulation von Blattscheiben	21
2.2.4.6	Inokulation von Protoplasten	22
2.2.5	Nukleinsäure-Techniken	22
2.2.5.1	Gesamt-RNA Extraktion aus Pflanzenmaterial	22
2.2.5.2	Gesamt-DNA Extraktion aus Pflanzenmaterial	23
2.2.5.3	Restriktionsverdau von Nukleinsäuren	23
2.2.5.4	Reverse Transkription von RNA zu cDNA	24
2.2.5.5	Amplifizierung von DNA-Sequenzen mittels PCR	24
2.2.5.6	Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide	25
2.2.5.7	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	25
2.2.5.8	Plasmid-Präparationen aus Bakterienkulturen	26
2.2.5.9	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	27
2.2.5.9.1	Native DNA Gelelektrophorese	27
2.2.5.9.2	Denaturierende RNA Gelelektrophorese	27
2.2.5.10	Hybridisierung von Nukleinsäuren mit DIG-markierten Sonden (Southern- und Northern Blot)	28
2.2.5.10.1	Denaturierung von elektrophoretisch aufgetrennter DNA im Gel	28
2.2.5.10.2	Kapillartransfer von Nukleinsäuren auf Nylon-Membranen	28
2.2.5.10.3	Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden	29

2.2.5.10.4	Detektion von DNA/RNA Sequenzen auf Nylon-Membranen	29
2.2.6	Protein-Techniken	30
2.2.6.1	Reinigung der Protein-Fraktion aus Pflanzenmaterial	30
2.2.6.2	Messung von Protein-Konzentrationen	31
2.2.6.3	Gelelektrophorese von Proteinen	31
2.2.6.4	Western Blot	32
2.2.6.4.1	Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	32
2.2.6.4.2	Serologische Detektion von Proteinen	33
2.2.6.4.3	Unspezifische Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen	33
2.2.6.5	Spezifischer Nachweis von Proteinen in Gewebeabdrücken von Pflanzen (Tissue Print Immunoblot)	34
2.2.6.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	34
2.2.6.7	Reinigung der IgG-Fraktion von Antiseren	35
2.2.7	Computergestützte Auswertung von Nukleinsäure- bzw. Proteinbanden nach Elektrophorese oder Western Blot	36
3	ERGEBNISSE	37
3.1	Charakterisierung der transgenen Tabak-Linien XL 4.24, XL 7.1, XL 8.28, XL 14.1 und X 15.1	37
3.1.1	Computergestützte Sequenz-Analysen der Konstrukte	37
3.1.2	Bestimmung der Integrationshäufigkeit des Transgens in das pflanzliche Genom	38
3.1.3	Nachweis und Quantifizierung der transgenen mRNA	39
3.1.4	Nachweis des Größenunterschiedes zwischen XL-N- und Wildtyp-N-mRNA	41
3.1.5	Untersuchungen des rekombinanten Proteins	42
3.1.5.1	Verwendung der Start-Codons für die Expression des rekombinanten Proteins in Pflanzen der verschiedenen Tabak-Linien	42
3.1.5.2	Nachweis des Leader-Peptids im nativen Zustand	45
3.1.5.3	Verteilung von rekombinantem XL-N-Protein im Blatt	46
3.1.5.4	Mengenbestimmung des rekombinanten N-Proteins in Pflanzen in Abhängigkeit von Blatttage und Pflanzenalter	48
3.2	Bildung von Nukleoproteinkomplexen aus rekombinantem Protein und viraler RNA	50
3.3	Replikation und Ausbreitung von Tospoviren in transgenen und nicht-transgenen Pflanzenlinien	52
3.3.1	Untersuchung früher Replikationsphasen in isolierten Zellen (Protoplasten) und isolierten Gewebeverbänden (Blattscheiben bzw. -streifen)	52
3.3.1.1	Frühe Replikationsphasen in Protoplasten	52
3.3.1.2	Frühe Replikationsphasen in 1 cm ² großen Blattscheiben	55
3.3.1.3	Frühe Replikationsphasen in 4 × 1 cm großen Blattstreifen (Untersuchung der Ausbreitung im Blatt)	57
3.3.2	Untersuchungen zur Etablierung von Infektionen mit Tospoviren in Pflanzen der transgenen Linien	61
3.3.2.1	Inokulation mit verschiedenen <i>Tospovirus</i> -Isolaten	61
3.3.2.2	Inokulation in verschiedenen Stadien der Pflanze	65
3.3.2.3	Ausbreitung von Tospoviren in Pflanzen der transgenen Linien	66
3.3.2.4	Übertragungsversuche mit gepfropften Pflanzen	74
4	DISKUSSION	76
5	ZUSAMMENFASSUNG	95
6	LITERATUR	97

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Antiserum
bp	Basenpaare
dpi	Tage nach Inokulation
DIECA	Diethyldithiocarbamat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G1/G2	Glykoproteine (Tospoviren)
GRSV	Groundnut Ringspot Virus
hpi	Stunden nach Inokulation
INSV	Impatiens Necrotic Spot Virus
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L-RNA	Größtes RNA-Segment der Tospoviren
M-RNA	Mittelgroßes RNA-Segment der Tospoviren
N	Nukleokapsid-Protein (Tospoviren)
NSs	Nicht-Strukturprotein (Tospoviren)
NSm	Transportprotein (Tospoviren)
n.b.	nicht bestimmt
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	“Open reading frame” (Offener Leserahmen)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDR	"Pathogen derived resistance"
PEG	Polyethylenglykol
PPV	Plum Pox Virus
PTGS	"Post transcriptional gene-silencing"
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-RNA	Kleinstes RNA-Segment der Tospoviren
Tab.	Tabelle
TMV	Tobacco Mosaic Virus
TSWV	Tomato Spotted Wilt Virus
U	Einheit (Unit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
X	Präfix für ein Konstrukt mit dem Wildtyp-N-Protein Gen von TSWV
XL	Präfix für ein Konstrukt mit einem modifizierten N-Protein Gen von TSWV
XL-N	Bezeichnung des Fusionsproteins aus TSWV N-Protein und Anteilen der Leader-Sequenz in Pflanzen mit dem XL-Konstrukt

1 Einleitung

1.1 Virus-Resistenz bei Pflanzen

Obwohl Pflanzen in natürlichen Ökosystemen unter ständiger Bedrohung durch pathogene Mikroorganismen wie etwa Bakterien und Viren stehen, bilden erfolgreiche Infektionen doch die Ausnahme (Takken und Joosten, 2000).

In Nutzpflanzenkulturen liegt jedoch eine ganz andere Situation vor. Nutzpflanzen wurden oft über Jahrhunderte hinweg auf maximalen Ertrag oder Qualität der nutzbaren Bestandteile hin gezüchtet, weniger auf die Resistenz gegenüber Pflanzenkrankheiten. Die relativ enge Verwandtschaft der meisten Nutzpflanzen untereinander erleichtert zudem die Übertragung pathogener Organismen. Insgesamt werden weniger als 2 % der auf der Welt vorkommenden höheren Pflanzenarten landwirtschaftlich genutzt und die meisten krautigen Nutzpflanzen gemäßigter Breiten gehören zu einer von nur fünf Familien: *Poaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Brassicaceae* und *Chenopodiaceae* (Geisler, 1991). Durch den Einsatz solcher Pflanzen in Monokulturen sowie den weltweiten Transport von Pflanzenmaterial wurden optimale Bedingungen für die Verbreitung von Pflanzenviren etabliert. Nicht zuletzt schafft der zunehmende Anteil intensiven Unter-Glas-Anbaus vielerorts erst geeignete Lebensbedingungen für Viren-übertragende Insekten.

Da Viruserkrankungen bei Pflanzen schwere Verluste anrichten können und nicht kurierbar sind, müssen geeignete Präventivmaßnahmen zum Schutz der Nutzpflanzen getroffen werden. Die chemische Bekämpfung der Vektoren phytopathogener Viren bringt aber neue Probleme mit sich und hilft nicht gegen Viren, die, wie etwa Tobamoviren, leicht durch Werkzeuge oder mechanisches Aneinanderreiben von Pflanze zu Pflanze übertragen werden können. Fruchtwechsel auf dem Feld können nur Erfolg haben, wenn gleichzeitige Unkrautbekämpfung für eine Vernichtung natürlicher Virus-Reservoirs sorgt, was wiederum mit massivem Einsatz von Herbiziden verbunden ist.

Letztlich ist die Gewinnung resistenter Pflanzen durch konventionelle Züchtung oder gentechnische Veränderungen der nachhaltigste Weg, verlässlichen Schutz gegen virale Infektionen zu erlangen (Fraser, 1989).

Eine Pflanze wird als "virusresistent" bezeichnet, wenn sie in der Lage ist, virale Aktivität zu unterdrücken oder zu verlangsamen. Solche Resistenzen können unterschiedlich stark ausgeprägt sein. "Immunität" beschreibt das völlige Fehlen jeglicher viraler Aktivität in der Pflanze und kann als Extremfall einer Resistenz angesehen werden. Laufen virale Replikation und Ausbreitung in der Pflanze normal ab, führen aber nicht, oder nur stark abgemildert, zu Krankheits-Symptomen, so spricht man von "Toleranz" gegenüber dem betreffenden Virus (Fischer, 1998).

1.1.1 Natürliche Resistenzen

Die molekularen Wirkungsmechanismen natürlicher Resistenzgene gegen Viren beruhen zumeist auf der Translation von Proteinen, die Pathogene bzw. deren Proteine spezifisch erkennen, um Abwehrreaktionen oder das Absterben der befallenen Zelle über Signalkaskaden auszulösen. Letzteres wird als "hypersensitive Reaktion" bezeichnet und verhindert die systemische Ausbreitung eingedrungener Pathogene (Takken und Joosten, 2000 und Referenzen darin).

Obgleich bereits viele natürliche Resistenzgene in Nutzpflanzen-Arten eingekreuzt werden konnten (Hulbert *et al.*, 2001), sind für viele Nutzpflanzen bislang noch keine natürlichen Resistenzen in verwandten Arten gefunden worden, die zur Einkreuzung in kommerzielle Kultivare zur Verfügung stehen könnten.

Das Einkreuzen von Resistenzen in Nutzpflanzen-Kultivare wird zudem dadurch erschwert, dass die Resistenz häufig auf mehr als nur einem Gen beruht (Fraser, 1992). Zudem werden klassische Züchtungsprogramme durch die oft extrem schnelle Anpassung von Viren an eingekreuzte Resistenzgene vor schwerwiegende Probleme gestellt. Die rasche Entstehung resistenzbrechender Isolate konnte von Fraser und Gerwitz (1987) beispielhaft durch Mutagenese-Versuche mit dem *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) demonstriert werden.

Eine besondere Form natürlich vorkommender Resistenz wurde bereits 1929 von McKinney beschrieben. Er beobachtete, dass Tabak-Pflanzen, die bereits mit einem TMV-Isolat infiziert waren, nicht gleichzeitig mit einem zweiten TMV-Isolat infiziert werden konnten. Dieses Phänomen wurde später als "cross-protection" bezeichnet und für die Praxis definiert als "Verwendung milder Virus-Isolate, um Pflanzen vor Infektionen mit anderen Isolaten des selben Virus zu schützen, die wirtschaftliche Schäden verursachen können" (Gonsalves und Garnsey, 1989). Diese Methode wurde, und wird, für einige Nutzpflanzen erfolgreich eingesetzt (Fuchs *et al.*, 1997; Broadbent, 1976; Fernow, 1967; Costa und Muller, 1980). Über den molekularen Mechanismus der "cross-protection" ist wenig bekannt. Folgende Möglichkeiten wurden diskutiert: (i) Erschöpfung von Wirts-Bestandteilen, welche für die virale Replikation benötigt werden, (ii) Besetzung von Replikations-Orten durch das erste Virus, (iii) Synthese von inhibitorischen Stoffen durch die Pflanze, (iv) Verpackung der Nukleinsäuren des zweiten Isolates durch die Hüllproteine des bereits in der Pflanze etablierten Virus und eine damit verbundene Behinderung der Entpackung, Replikation und Translation sowie (v) direkte RNA-RNA Wechselwirkung (Lecoq und Raccach, 2001 und Referenzen darin). Nachteile in der Anwendung der "cross-protection" bei Kulturpflanzen sind u.a. der hohe Aufwand für die Inokulation der Pflanzen mit dem milden Isolat, die Gefahr einer Rekombination, wodurch das milde Isolat virulent werden könnte, die aufwendige und häufig erfolglose Suche nach geeigneten milden Isolaten sowie die meist auch mit milden Isolaten auftretenden Ertragsverluste.

1.1.2 Resistenzen in gentechnisch veränderten Pflanzen: Das Prinzip der „pathogen-derived resistance“

Eine Alternative zur Suche nach natürlich vorkommenden Resistenzen zur Gewinnung resistenter Kulturpflanzen beruht auf den Möglichkeiten der Gentechnik und wurde 1985 von Sanford und Johnston vorgestellt. Sie bezeichneten dieses Konzept als "parasite-derived resistance", inzwischen hat sich allerdings eher die Bezeichnung "pathogen-derived resistance" (PDR) durchgesetzt.

Das Prinzip der PDR ist die Expression von Genen des Pathogens im Wirtsorganismus, wobei dies entweder (i) unzeitgemäß, (ii) in nicht-funktionaler Form oder (iii) im Überschuss zu erfolgen hat. Die Bekämpfung eines Pathogens durch dessen eigene Gen-Produkte ist im Grunde dem oben beschriebenen natürlichen Phänomen der "cross-protection" nachempfunden.

Diese Vorgehensweise bietet vor allem in Bezug auf virale Pathogene einen großen Vorteil gegenüber der Suche nach natürlichen Resistenzen: Viren besitzen sehr viel kleinere Genome als ihre Wirtsorganismen und die Funktionen ihrer Genprodukte sind häufig bereits bekannt. Durch die fehlenden Introns sind virale Gene zudem vergleichsweise klein und lassen sich daher leicht zur Transformation von Pflanzen einsetzen. Außerdem ist es für die Viren schwierig eine Resistenz zu brechen, die mit ihren eigenen Genprodukten erzeugt wird.

Ein mögliches Risiko des Einsatzes der PDR gegen Pflanzenviren ist die schwer vorhersehbare Interaktion der transgenen Nukleinsäuren oder deren Genprodukte mit anderen Viren, die noch in der Pflanze replizieren können (Robinson, 1996).

Sanford und Johnston (1985) diskutierten die PDR ursprünglich anhand des Modellsystems "Bakteriophage Q β (ein RNA-Virus) in *E. coli*". Folgende potenzielle Angriffspunkte der PDR in diesem System wurden vorgeschlagen:

Hüllprotein: Das Hüllprotein des Q β -Phagen besitzt strukturelle und regulatorische Funktionen. Dies gilt auch für die Hüllproteine der meisten Viren höherer Wirts-Organismen, also auch für Pflanzen-Viren (Callaway *et al.*, 2001). Wenn das Hüllprotein die Funktion eines konzentrations-abhängigen Schalters von Replikation zu Verpackung besitzt, so würde eine hohe Konzentration in der Zelle bereits die frühen Replikationsphasen eindringender Viren verhindern.

"Anti-sense"-Interferenz: Transkription von mRNA, deren Sequenz revers-komplementär zur viralen RNA ist ("anti-sense"-RNA), würde zur Ausbildung doppelsträngiger RNA führen, von der weder repliziert noch virale mRNA transkribiert werden könnte.

Replikase: In Wirts-Zellen exprimierte defekte Replikase würde mit dem intakten Enzym um die virale RNA konkurrieren. Die Replikase kann nur bei RNA-Viren als Angriffspunkt dienen, da DNA-Viren zumeist auf die wirtseigenen DNA-Polymerasen zurückgreifen.

Substrat der Replikase: Expression von verkürzten viralen mRNAs, die mit der intakten Virus-RNA um Replikase konkurriert. Diese werden auch als „defective interfering“ (DI) RNAs bezeichnet.

Eine erste praktische Umsetzung der PDR bei Pflanzenviren wurde 1986 von Powell-Abel *et al.* berichtet. Sie exprimierten das Hüllproteingenes des *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) in Tabak-Pflanzen und erreichten damit eine Verzögerung der Symptomausprägung gegenüber der nicht-transgenen Kontrolle, die in manchen Fällen sogar zu symptomlos bleibenden Pflanzen führte. Da diese Resistenz durch "nackte" TMV-RNA in späteren Versuchen überwunden werden konnte (Nelson *et al.*, 1987), wurde eine Blockierung der Entpackung der TMV-Virionen bei Eintritt in die Zelle durch die hohe Konzentration rekombinanten Hüllproteins als Resistenzmechanismus angenommen.

Ogleich die ersten Versuche mit PDR in Bezug auf das Virus-Pflanze System der Erwartung zu entsprechen schienen, zeigten sich bereits frühzeitig Phänomene, die nicht mit einem Eingreifen des rekombinanten Virus-Proteins in den viralen Replikationszyklus erklärt werden konnten, zumal häufig keine Korrelation zwischen Resistenz und Menge des rekombinanten Proteins erkennbar war, wie dies nach der Theorie zu erwarten wäre. Lindbo und Dougherty (1992) berichteten erstmals über eine Resistenz, die nur durch eine nicht-translatierbare mRNA verursacht wurde, die von einem mutierten viralen Transgen transkribiert wurde. Dies wurde als "RNA-vermittelte Resistenz" bezeichnet.

Seit dem wurden in der Literatur viele Beispiele für RNA-vermittelte Resistenzen gegen Pflanzenviren aufgeführt, die einige Gemeinsamkeiten aufweisen (Baulcombe, 1996): (i) ein rekombinantes Protein ist nicht erforderlich, (ii) häufig sind mehrere Insertionsstellen des Transgens im pflanzlichen Genom vorhanden, (iii) die Pflanzen zeigen entweder gar keine Virus-Replikation und Ausbreitung oder sie erholen sich später von einer Infektion und bilden neue, virusfreie Triebe und Blätter aus, (iv) die Resistenz ist normalerweise auf das sequenzhomologe Isolat und seine engsten Verwandten beschränkt, (v) trotz oft hoher Transkriptionsraten finden sich nur geringe Mengen transgener mRNA in der Zelle.

Bereits einige Jahre zuvor wurde bei der Transformation von Petunien mit zusätzlichen Kopien eines endogenen Gens für ein Enzym der Blütenfarbstoff-Synthese ein Phänomen entdeckt, dass ebenfalls hohe Transkriptionsraten und geringe mRNA-Mengen in der Zelle verbindet (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). Bei Einsatz vieler Kopien dieses Gens wurde der Farbstoff unerwarteterweise nicht in größerer Menge, sondern überhaupt nicht mehr gebildet. Die Transkriptionsrate der transgenen mRNA in den Kernen von Zellen ohne Farbstoff war nicht geringer als in Farbstoff-synthetisierenden Zellen. Dies wurde auf eine posttranskriptionale Inaktivierung der transgenen mRNA zurückgeführt und als „Co-Suppression“ bezeichnet (van Blokland *et al.*, 1994). Dougherty und Parks (1995) formulierten schließlich aus den Beobachtungen zur RNA-vermittelten Virus-Resistenz und der Co-Suppression eine zusammenfassende Hypothese. Demnach erfolgt in beiden Fällen ein Abbau einer überexprimierten transgenen mRNA im Cytoplasma. Dieser ist Sequenz-spezifisch, betrifft also nur die homologe Sequenz oder dessen Komplement. Da dieser Mechanismus eine posttranskriptionale Abschaltung von Genen bewirkt, wurde

er als "post-transcriptional gene-silencing" (PTGS) bezeichnet. Die Sequenzspezifität soll dabei über eine cytoplasmaständige RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) vermittelt werden. Diese synthetisiert kurze komplementäre Oligonukleotide von der zur "Abschaltung" vorgesehenen (m)RNA, die dann wiederum an homologe RNA-Sequenzen binden und diese damit zum Abbau markieren. Eine solche RdRp wurde inzwischen erfolgreich aus *Lycopersicon* isoliert und in *Arabidopsis* kloniert, die Synthese der Oligonukleotide wurde *in vitro* nachgewiesen (Schiebel *et al.*, 1993 a+b und 1998). Der Abbau der Ziel-RNA beginnt mit endonukleolytischen Spaltungen an wenigen Stellen, möglicherweise dort, wo sich die Oligonukleotide aus der RdRp-Reaktion anlagern, die dann durch dsRNA-abhängige RNasen abgebaut werden können, und wird durch den exonukleolytischen Abbau der restlichen RNA abgeschlossen (Lee *et al.*, 1997; Metzloff *et al.*, 1997; Goodwin *et al.*, 1996). Es wird angenommen, dass sich PTGS in Pflanzen als Abwehrmechanismus gegen intrazelluläre Parasiten wie Viren und Viroide entwickelt hat (Ratcliff *et al.*, 1997; Covey *et al.*, 1997).

Wie wird das "gene-silencing" jedoch ausgelöst und welche Eigenschaften kennzeichnen die abzubauen (m)RNA? Die Initiierung des PTGS wurde in der ursprünglichen Hypothese mit einem Schwellen-Mechanismus erklärt (Dougherty und Parks, 1995). Nach diesem Modell wird "gene-silencing" aktiviert, sobald die Menge einer (m)RNA einen bestimmten Schwellenwert überschritten hat. Dies führt bei transgenen Pflanzen, die eine virale Sequenz enthalten, zu drei möglichen Phänotypen: (i) **Immunität**: der Schwellenwert ist bereits vor der Inokulation mit dem betreffenden Virus durch die transgene mRNA überschritten, schon frühe Replikationsereignisse werden so durch den bereits aktiven Abbau viraler Sequenzen verhindert, (ii) **Erholung**: der Schwellenwert wird erst überschritten, wenn transgene mRNA und virale RNA des replizierenden Virus gemeinsam in der Zelle vorliegen. Die Pflanzen erkranken zunächst, bilden jedoch später gesunde Blätter aus, die dann gegen weitere Infektionen mit diesem Virus immun sind, (iii) **keine Resistenz**, die Mengen transgener mRNA sind so gering, dass sie selbst zusammen mit der viralen RNA des replizierenden Virus nicht die Schwelle überschreiten und daher nie zu einer Aktivierung des PTGS führen können.

PTGS wird jedoch nicht immer durch eine Überproduktion von Transkripten ausgelöst, wie Versuche mit weniger aktiven oder gar promotorlosen Transgen-Konstrukten beweisen (van Blokland *et al.*, 1994; English *et al.*, 1996; Voinnet *et al.*, 1998). Es wurde daher diskutiert, ob möglicherweise nicht die Menge einer (m)RNA, sondern bestimmte aberrante (=abweichende) Merkmale diese zum Abbau kennzeichnen (Dougherty und Parks, 1995; English *et al.*, 1996; Waterhouse *et al.*, 1998). Solche aberranten Merkmale könnten sein: (i) Nichttranslatierbarkeit, (ii) Fehlen von Introns, (iii) Selbst-Komplementarität, die zur Ausbildung von doppelsträngigen Abschnitten führt, oder (iv) verkürzte mRNA ohne Poly-A-Schwanz. Solche aberrante RNA könnte von der RdRp im Cytoplasma erkannt werden, welche komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, die wiederum homologe (m)RNA zum Abbau durch RNasen markieren. Ist das PTGS einmal aktiviert, so breitet

sich ein Signal durch die Pflanze aus, das für die Aktivierung dieses Abwehrmechanismus im gesamten Organismus sorgt. Dieser Vorgang wird "systemisch erworbene Resistenz" genannt und kann durch Pfropfungsversuche von PTGS-aktivierten auf nicht-aktivierte Pflanzen übertragen werden (Palauqui *et al.*, 1997). Das Signal verbreitet sich, vermutlich in Form von Nukleinsäuren, durch Plasmodesmata von Zelle zu Zelle und nutzt das Phloem für den Langstreckentransport (Voinnet *et al.*, 1998; Palauqui *et al.*, 1997; Palauqui und Vaucheret, 1998; Jorgensen *et al.*, 1998). PDR die auf "gene-silencing", also einem RNA-vermittelten Resistenzmechanismus, beruht wurde zwar bereits häufig erfolgreich in transgenen Pflanzen eingesetzt, ist aber vor allem mit folgenden beiden Nachteilen behaftet: (i) Der Abbau der viralen RNA erfolgt sequenzabhängig durch die Markierung mit spezifischen Oligonukleotiden, was nur mit der identischen oder einer sehr ähnlichen Sequenz möglich ist. Die Resistenz beschränkt sich daher auf das homologe Isolat und seine engsten Verwandten. (ii) Abwehrmechanismen der Pflanzen und Gegenmaßnahmen der Viren haben sich in einer Co-Evolution entwickelt. Viele Viren besitzen daher bereits Proteine, die PTGS unterdrücken und eine transgene Resistenz daher wirkungslos machen können. Der Vorteil eines RNA-vermittelten Resistenzmechanismus liegt vor allem in der Abkömmlichkeit eines rekombinanten Genproduktes, wodurch damit verbundene Risiken für den Verbraucher und die Umwelt verringert werden können.

Demgegenüber hat echte Protein-vermittelte Resistenz den Vorteil einer breiter angelegten Wirkung gegen viele Virus-Spezies des gleichen Genus oder gar darüber hinaus, da die funktionalen Bereiche der verschiedenen viralen Proteine sehr viel konservierter sind als die Nukleinsäuresequenzen viraler Genome. Zudem ist es für die Viren schwierig, einer Resistenz entgegenzuwirken, die durch eines ihrer eigenen Proteine bewirkt wird.

1.2 Das Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)

Das *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV, deutsche Bezeichnung: "Tomatenbronzefleckenvirus") ist der Typstamm des Genus *Tospovirus* innerhalb der Familie der *Bunyaviridae*. Der Genus *Tospovirus* ist der einzige der Familie, dessen Angehörige Pflanzen infizieren.

TSWV befällt mehr als 900 verschiedene Pflanzenarten in gemäßigten und tropischen Breiten (Peters, 1998). Hierdurch werden immense Ertrags-Verluste in der Landwirtschaft verursacht, die auf über 1 Milliarde US Dollar jährlich geschätzt wurden (Goldbach und Peters, 1996). Die natürliche Verbreitung des Virus erfolgt ausschließlich durch Thripse (Fransenflügler, Ordnung *Thysanoptera*, Familie *Thripidae*). Das Virus wird dabei nur im Larvenstadium aufgenommen, kann aber zeitlebens wieder auf neue Wirtspflanzen übertragen werden (Sakimura, 1963; van de Wetering *et al.*, 1996).

Tospoviren zeichnen sich durch quasisphärische Partikel mit einer Lipidhülle aus, was eine Besonderheit unter Pflanzenviren darstellt. Diese Hülle ist mit vielen Kopien der Glykoproteine G1 und

G2 besetzt, die bei der Partikel-Reifung in Pflanzen sowie der Wirtszellen-Spezifität im Vektor eine wichtige Rolle spielen. In der Hülle ist das virale Genom eingeschlossen. Dieses ist verteilt auf drei verschieden große RNA-Segmente, die als L-RNA (8,9 kb) M-RNA (4,9 kb) und S-RNA (2,9 kb) bezeichnet werden (de Haan *et al.*, 1990; de Haan *et al.*, 1991; German *et al.*, 1992; Law *et al.*, 1992). Die L-RNA beinhaltet nur einen "Offenen Leserahmen" ("open reading frame", ORF) auf dem viral-komplementären Strang, der für ein 330 kDa großes Protein kodiert, die putative Replikase (de Haan *et al.*, 1991). M- und S-RNA weisen jeweils zwei ORFs auf, wovon sich je einer auf dem viralen und einer auf dem viral-komplementären Strang befindet (de Haan *et al.*, 1990; Kormelink *et al.*, 1992; Law *et al.*, 1992). Die M-RNA kodiert für das Vorläuferprotein der Glykoproteine (Adkins *et al.*, 1996; Law *et al.*, 1992), das zur Reifung endoproteolytisch in G1- und G2-Protein gespalten wird sowie das Nicht-Strukturprotein NSm, das tubuläre Strukturen in Plasmodesmata ausbildet und vermutlich dem Transport der Viren von Zelle zu Zelle dient (Storms *et al.*, 1995). Auf der S-RNA liegen die Leserahmen für ein weiteres Nicht-Strukturprotein, NSs, dem bislang keine Funktion zugeordnet werden konnte, und das Nukleokapsid-Protein N (de Haan *et al.*, 1990), das die virale RNA enkapsidiert. Das N-Gen ist für die Herstellung transgener TSWV-resistenter Pflanzen nach dem oben vorgestellten Konzept der Hüllprotein-vermittelten Resistenz von Interesse.

Die Genprodukte der Tospoviren werden ausschließlich von mRNAs translatiert (Kormelink *et al.*, 1992a). Diese viralen mRNAs werden mit 5'-Cap-Strukturen der Wirts-Zelle versehen (Kormelink *et al.*, 1992b). Einen Überblick über die Genomorganisation sowie den Aufbau der TSWV-Partikel gibt **Abb. 1**.

Die tripartite Genomorganisation sowie die Tatsache, dass Tospoviren auch in ihren Vektoren replizieren, ergibt vielfältige Möglichkeiten der genetischen Rekombination und führt zur Ausbildung vieler distinkter Isolate (Wijkamp *et al.*, 1993). Dies stellt die Resistenzzüchtung vor besondere Probleme.

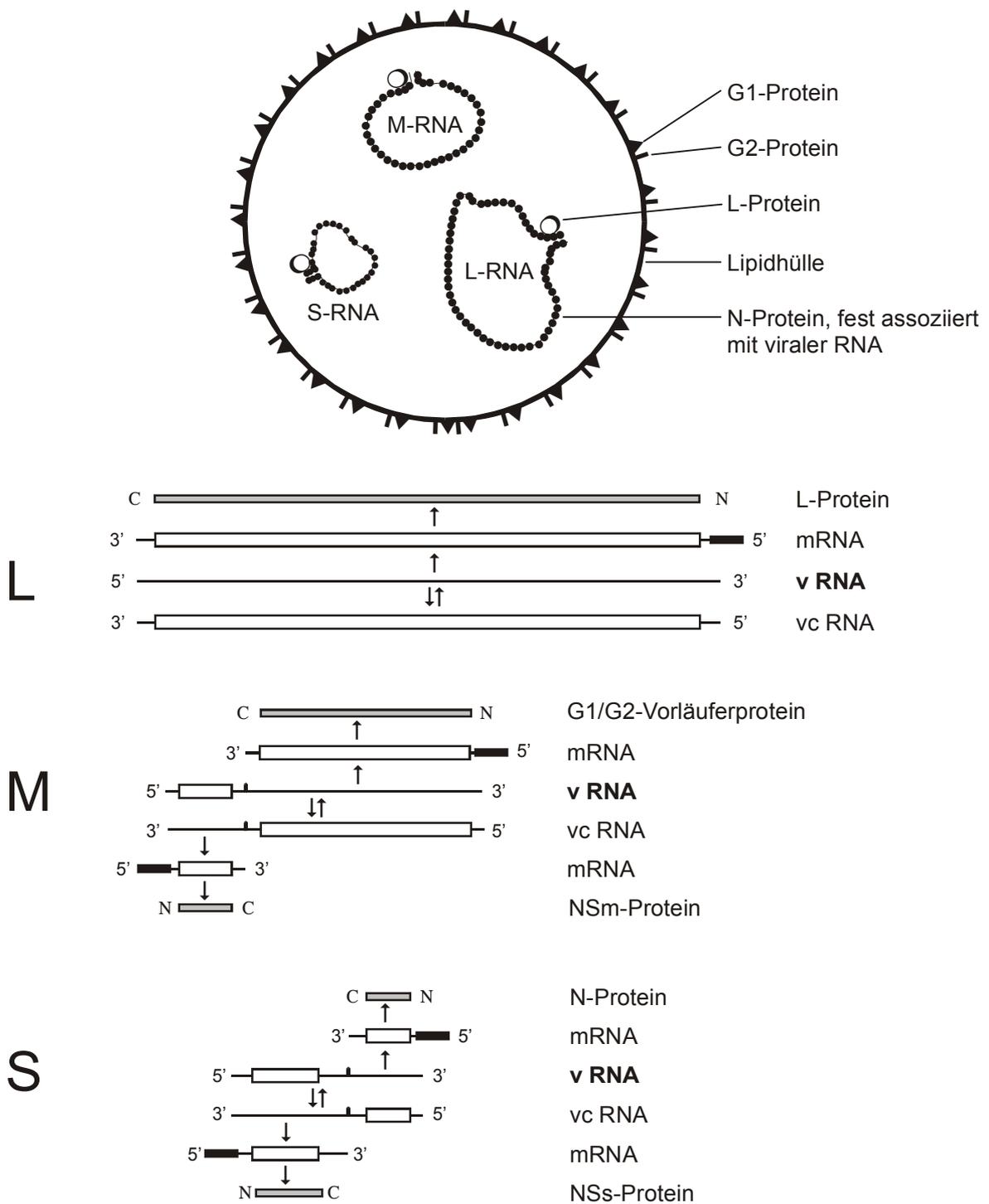


Abb. 1: Partikelbau und Genomorganisation von Tospoviren.

Oben: schematische Darstellung eines Virus-Partikels. In einer ca. 100 nm durchmessenden Lipidhülle, die mit den Glykoproteinen G1 und G2 besetzt ist, befinden sich die drei genomischen RNA-Segmente L, M und S. Diese sind mit vielen Kopien des N-Proteins besetzt und mit der Replikase (L-Protein) assoziiert.

Unten: Genomorganisation der L-, M- und S-RNA. Weiße Balken stellen Offene Leserahmen in „sense“-Orientierung dar, kleine schwarze Balken stehen für die vom Wirt stammenden 5'-Cap-Strukturen, graue Balken repräsentieren die Genprodukte und kurze senkrechte Striche deuten die sekundärstrukturreichen Intergen-Regionen (IGR) an. Doppelpfeile stehen für Replikations-, einfache Pfeile für Transkriptionsereignisse. v RNA = virale, vc RNA = viral komplementäre RNA

1.3 Natürliche und gentechnisch erzeugte Resistenzen gegen Tospoviren in Kulturpflanzen

Natürliche Resistenzgene gegen Tospoviren in Kulturpflanzen oder nahe verwandten Arten sind selten. Adam und Kegler (1994) nennen einige Beispiele aus Tomate, Salat, Paprika, Chrysantheme, Erdnuss und Tabak. Selbst wenn das Einkreuzen der für die Resistenz verantwortlichen Gene in kommerzielle Kultivare gelingt, zeigt sich häufig eine schnelle Anpassung der Viren an die Resistenzen unter Feld-Bedingungen. Häufig richtet sich die Resistenz auch nur gegen lokale Tospovirus-Isolate und wird bei Einsatz der resistenten Kultivare an anderen Orten der Erde sofort von dort vorkommenden Isolaten gebrochen.

Natürliche Resistenzen gegen Tospoviren in Tabak sind bisher kaum bekannt. Kennedy und Nielsen (1993) berichteten von einem TSWV-resistenten Kultivar "Polalta", das vermutlich aus einer Kreuzung des Ziertabaks *N. alata* mit *N. tabacum* hervorgegangen ist. Ob sich diese Resistenz in kommerzielle Kultivare einkreuzen lässt, ist bislang nicht bekannt.

Da die klassische Züchtung also wenig Möglichkeiten für die Gewinnung von *Tospovirus*-resistenten Nutztobak-Kultivaren bot, wurde der oben erwähnte Ansatz der "pathogen-derived resistance" (PDR) genutzt. Gielen *et al.* (1991) beschrieben als erste die Erzeugung transgener TSWV-resistenter Tabak-Linien durch Expression von TSWV N-Protein.

In den folgenden Jahren veröffentlichten verschiedene Arbeitsgruppen Ergebnisse mit TSWV-N-transgenen Pflanzen, zumeist Tabak, und deren Resistenz gegenüber Tospoviren (MacKenzie und Ellis, 1992; Pang *et al.*, 1992, 1993 und 1994; Vaira *et al.*, 1995; Prins *et al.*, 1995; Stoeva *et al.*, 1998). Dabei zeichnete sich immer wieder folgendes Bild ab: Resistenz gegen das homologe Virus-Isolat, also dasjenige aus dem das klonierte N-Gen stammte, wurde in allen Fällen, jedoch in unterschiedlichen Ausprägungen, erhalten. Entgegen der Erwartung aus der Theorie der PDR ergab sich aber keine proportionale Beziehung zwischen der Menge exprimierten N-Proteins und dem Grad der Resistenz. Häufig wurde sogar berichtet, dass diejenigen Linien mit der ausgeprägtesten Resistenz gegen das homologe Isolat die geringsten Expressionsniveaus aufwiesen. Im Unterschied dazu waren Resistenzen gegen andere *Tospovirus*-Spezies (v.a. *Impatiens Necrotic Spot Virus*, INSV) tatsächlich eher mit größeren Mengen rekombinanten Proteins in den betreffenden Pflanzen korreliert (Pang *et al.*, 1993). Resistenzen gegen das *Groundnut Ringspot Virus* (GRSV), ebenfalls eine *Tospovirus*-Spezies, wurden bei TSWV-N-transgenen Pflanzen nie gefunden, lediglich von leicht verzögerten Symptomentwicklungen wurde in einigen Fällen berichtet (Pang *et al.*, 1992 und 1994, Vaira *et al.*, 1995).

Um Pflanzen zu erhalten, die gegen mehrere *Tospovirus*-Spezies resistent waren, transformierten Prins *et al.* (1995) Tabak mit einem Konstrukt aus drei hintereinandergeschalteten N-Genen von drei Spezies (TSWV, TCSV und GRSV). Alle erhaltenen Linien exprimierten nur geringe Mengen an Transkripten und N-Proteinen, wiesen aber zum Teil eine sehr gute Resistenz gegenüber allen drei *Tospovirus*-Spezies auf.

Es scheint also, als wäre für die meisten bislang erreichten transgenen Resistenzen gegen homologe Tospoviren der oben beschriebene „gene-silencing“ Mechanismus (PTGS) entscheidend. Lediglich die Resistenzen gegen heterologe Spezies, die jedoch meist nur sehr schwach ausgeprägt waren und meist nur zu einer verzögerten Infektion führten, scheinen Protein-vermittelt zu sein.

Bereits 1992 berichteten de Haan *et al.* über Versuche mit Konstrukten, die nicht-translatierbare mRNA des TSWV N-Gens exprimierten, also kein rekombinantes Protein synthetisieren konnten. Einige der so erhaltenen Linien zeigten Resistenz gegen das homologe Isolat, nicht aber gegen heterologe Isolate. Die Ergebnisse von Pang *et al.* (1993) deuten in die gleiche Richtung: Resistenz gegen alle getesteten TSWV-Isolate wurde nur in Pflanzen beobachtet, die wenig transgene mRNA enthielten, was auf einen Abbau derselben hindeutete. In Protoplasten-Versuchen konnte eine Verzögerung der Replikation von TSWV in diesen Linien gezeigt werden. Resistenz gegenüber der Spezies INSV wurde in diesen Pflanzen jedoch nicht gefunden. Prins *et al.* (1996) konnten schließlich zeigen, dass der RNA-vermittelte Resistenzmechanismus sequenzspezifisch arbeitet und nur mit N- oder NSm-Gen Sequenzen funktioniert, wobei es unwichtig ist, ob diese translatierbar sind.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren neuartige transgene Tabak-Linien, die durch Transformation mit einem modifizierten TSWV-N-Proteingen eine bislang nicht erreichbare Breitband-Resistenz gegen verschiedene Tospoviren zeigten (Schreier *et al.*, 1994).

Da die Translation eines Fusionsproteins in diesen Pflanzen ursprünglich nicht beabsichtigt worden war und keine vergleichbaren Beispiele aus der Literatur bekannt waren, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den zugrundeliegenden Resistenz-Mechanismus aufzuklären.

Zu diesem Zweck sollten die Pflanzen zunächst bezüglich der zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster des rekombinanten Proteins charakterisiert werden. Da das Konstrukt theoretisch mehrere mögliche Translations-Starts beinhaltet, sollte dabei auch geklärt werden, welcher von diesen tatsächlich genutzt wird und ob die resultierende N-terminale Verlängerung im Fusionsprotein versteckt oder auf der Oberfläche exponiert vorliegt, ob also Interaktionen mit anderen viralen oder pflanzlichen Komponenten möglich sind.

Um Vergleiche mit der Literatur zu ermöglichen, stand auch eine transgene Tabak-Linie zur Verfügung, die ein nicht-modifiziertes TSWV N-Protein exprimierte. Durch Inokulations-Experimente mit vereinzelt Zellen, Gewebeabschnitten und vollständigen Pflanzen sollten Replikation und Ausbreitung von Tospoviren in transgenen Pflanzen mit modifizierten und nicht-modifizierten N-Protein-Konstrukten verglichen werden.

Mit den so gewonnenen Daten sollte schließlich eine Hypothese zur Wirkungsweise des modifizierten TSWV N-Proteins in resistenten Pflanzen erarbeitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzen

Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Tabak-Linien wurden von der Arbeitsgruppe von P. Schreier (Bayer AG) freundlicherweise zur Verfügung gestellt und sind Gegenstand eines EU-Patents (Schreier *et al.*, 1994).

Es handelt sich um "*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN" Pflanzen. Die Bezeichnung "NN" bezieht sich dabei auf das natürliche Resistenzgen "N", das gegen systemische Infektionen mit TMV wirkt (Witham *et al.*, 1994) und homozygot in diesem Kultivar vorliegt. Es hat keine bekannte Bedeutung für Infektionen mit TSWV.

Die Pflanzen wurden jeweils mit einem der beiden folgenden Konstrukte (N bzw. XL-N) transformiert:

Das **N-Konstrukt** beinhaltet die 35S Promotor Region (439 nt) des *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV), an die sich die vollständige Nukleoprotein-Gen (N) Sequenz (850 nt) des *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV), Isolat L3 (2.1.2), anschließt. Am 3'-Ende befindet sich eine Linker-Sequenz von 17 nt, gefolgt von einer Sequenz, die ein Terminations- und Polyadenylierungssignal beinhaltet und aus der 3'-nicht-translatierten Region des CaMV-Genomes stammt (226 nt).

Das **XL-N-Konstrukt** enthält zusätzlich eine Sequenz, die den Nukleotiden 1-152 aus dem Genom des *Plum Pox Potyvirus* (PPV) entspricht (Maiss *et al.* 1989). Diese beinhaltet zwei Start-Codons (Positionen 36 und 147), beide befinden sich im Konstrukt im gleichen Leseraster wie das N-Gen. An die PPV-Sequenz schließt sich eine Linker-Sequenz von 38 nt an, die aus der „Multiple Cloning Site“ von Plasmid pT7T3 19U (Pharmacia) stammt. PPV- und Linker-Sequenz wurden zwischen dem CaMV 35S-Promotor und dem TSWV N-Gen eingefügt.

Die PPV-Sequenz war als Translationsverstärker eingefügt worden, die Translation in ein Leader-Peptid war ursprünglich nicht vorgesehen. Eine Übersicht über die Konstrukte zeigt **Abb. 2**. Für diese Arbeit wurden die Linien XL 4.24, XL 7.1, XL 8.28, XL 14.1 (alle transformiert mit dem XL-N-Konstrukt) sowie die Linie X 15.1 (transformiert mit dem N-Konstrukt) zur Verfügung gestellt. Alle waren durch Selbstung aus solchen Klonen hervorgegangen, bei denen die Expression von N-Protein nachgewiesen sowie Resistenz gegenüber verschiedenen *Tospovirus*-Isolaten beobachtet werden konnte.

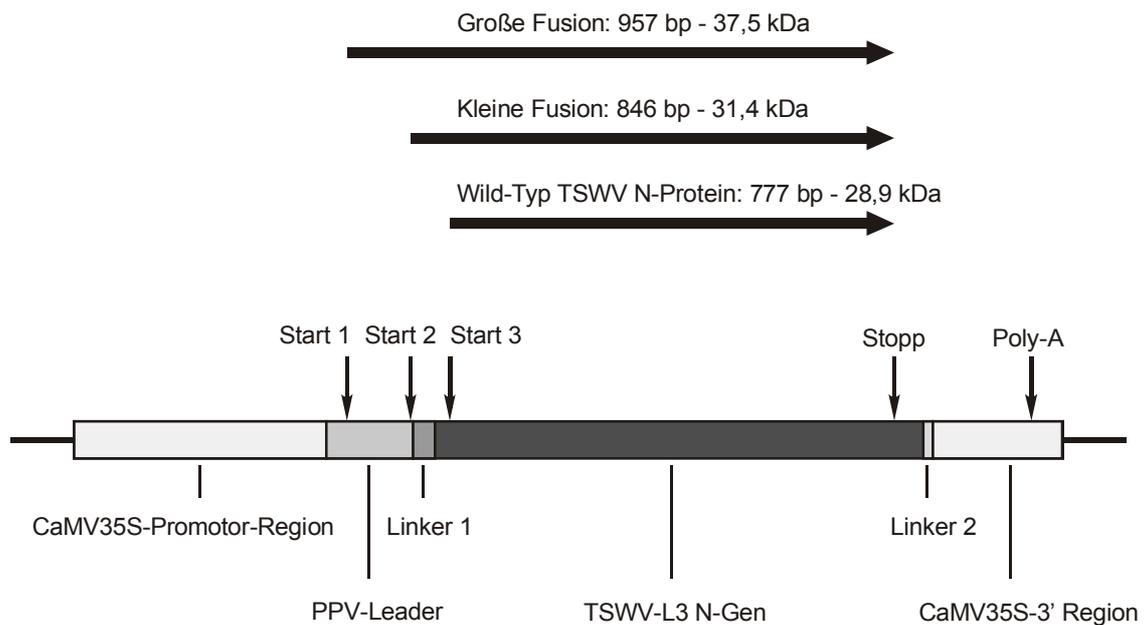


Abb. 2: Das XL-N-Konstrukt. Alle Sequenzen sind längengetreu dargestellt. Die 3 möglichen Start-Codons, das Stopp-Codon der TSWV N-Gen Sequenz und das Polyadenylierungssignal sind gekennzeichnet. Die drei Pfeile oben repräsentieren die drei theoretisch möglichen Translationsprodukte (s. Abschnitt 3.1.1). Im N-Konstrukt fehlen die PPV-Leader- und Linker 1-Sequenz.

2.1.2 Viren

Folgende Virus Spezies und Isolate aus dem Genus *Tospovirus*, Familie *Bunyaviridae*, wurden für Inokulationsexperimente verwendet:

- **Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) Isolat L3** DSMZ-Nr: PV-0182 (Maiss *et al.*, 1991). Aus diesem Isolat stammte das N-Gen, das in den X- und XL-Konstrukten verwendet wurde, es wird daher im Folgenden als das "homologe Isolat" bezeichnet.
- **Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) Isolat DH37** (=37D-97): dieses Isolat war bei Biotests als besonders aggressiv aufgefallen. Es verursachte schwere Nekrosen auf Tabak-Pflanzen und vermochte die Resistenz einiger bulgarischer N-transgener Tabak-Linien zu brechen (Hristova *et al.*, 2001; Heinze *et al.*, 2001).
- **Groundnut Ringspot Virus (GRSV) Isolat SA05**. DSMZ-Nr.: PV-0205 (de Avila *et al.*, 1993).

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien für die Pflanzen- und Bakterienkultur wurden von der Firma Duchefa (Niederlande) bezogen. Antikörper-Konjugate und Detektionschemikalien stammten von der Firma Sigma (Steinheim). Von der Firma Roche (Mannheim) wurden die Chemikalien für die Detektion von Nukleinsäuren bezogen. Blotmembranen und Filme stammten von den Firmen Amersham (Freiburg) oder Roth (Karlsruhe). Für die Reinigung von Protein- und Nukleinsäurefraktionen aus Pflanzenmaterial wurde das TriFast-Reagenz der Firma pegLab (Erlangen) verwendet. Alle übrigen Feinchemikalien wurden von den Firmen Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Fluka (Steinheim) bezogen.

Wasser: Wenn nicht anders angegeben, wurde stets autoklaviertes Reinstwasser (bidest H₂O) aus einer MiliQ-Anlage (Milipore) verwendet.

2.1.4 Oligonukleotide für die PCR

Für die Amplifizierung von DNA mittels PCR (2.2.5.5) wurden folgende Oligonukleotid-Primer-Paare verwendet:

Bezeichnung	Sequenz	Eigenschaft
TSWV-N-ATG	5'-ATG TCT AAG GTT AAG CTC AC-3'	amplifizieren ein 665 bp großes Fragment aus dem TSWV N-Gen
TSWV-N-Ende	5'-GCT GGA GCT GAG TAT AGC-3'	
Aktin1	5'-AGT TGC TGA CTA TAC CAT GC-3'	amplifizieren ein 210 bp großes Fragment aus dem <i>N. tabacum</i> Aktin-Gen
Aktin2	5'-GAC AAT GGA ACT GGA ATG GT-3'	

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

2.1.5 Antikörper und Antiseren

Folgende Antikörper und Antiseren wurden verwendet:

Bezeichnung	Art	Erzeugt in	Erzeugt gegen
AS-0580*	Polyklonales Rohserum, 1. Abnahme	Kaninchen	TSWV-L3 N-Protein
Hühner- Antikörper N	Polyklonaler Antikörper aus 1 Ei, 4 Wochen nach Immunisierung. Gereinigte IgG-Fraktion, Konzentration: 1 mg/ml	Huhn	TSWV-L3 N-Protein
AS-0116/1* (Adam <i>et al.</i> , 1991)	Monoklonaler Antikörper	Maus	TSWV-L3 Virionen. Detektiert TSWV G1-Protein
AS-338 (Heinze <i>et al.</i> , 2000)	Polyklonales Rohserum	Kaninchen	Polypeptid aus dem C-terminalen Ende des TSWV NSs- Proteins
AS-8349	Polyklonales Serum, 2. Abnahme, gereinigte IgG-Fraktion (2.2.6.7), Konzentration 1 mg/ml	Kaninchen	Polypeptid aus der Leadersequenz des XL-N Konstruktes

* Erhalten von: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig)

Das Serum AS-8349 wurde für diese Arbeit bei der Firma Eurogentec (Belgien) gegen ein Polypeptid mit folgender Sequenz hergestellt:

H_2N - MSR IRA RYP PDP LES C – $CONH_2$ (16 Aminosäuren).

Dies entspricht dem Translationsprodukt der ersten 45 Nukleotide beginnend mit dem zweiten Start-Codon der PPV-Leader Sequenz im XL-N-Konstrukt (**Abb. 2**). Am amidierten carboxyterminalen Ende wurde ein Cystein-Rest eingefügt, über den das Polypeptid an das Trägermolekül „keyhole limpet hemocyanin“ (KLH) gebunden wurde. Es wurden zwei Kaninchen immunisiert. Die 2. Abnahme eines der Tiere, 66 Tage nach der ersten Injektion, zeigte eine hochgradig spezifische Reaktion im Western Blot (2.2.6.4) mit Homogenat aus Pflanzen, die das XL-N-Konstrukt enthalten.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Pflanzen

2.2.1.1 Kultivierung im Gewächshaus

Die Kultivierung der Pflanzen im Gewächshaus erfolgte bei Temperaturen von 20 - 25 °C und einer Kunstlicht-unterstützten Beleuchtungsdauer von 16 h pro Tag.

Aussaat und Anzucht bis zum 2 - 3-Blatt Stadium erfolgte in TKS1-Substrat. Danach wurden die Pflanzen in ein Mischsubstrat aus 1 Teil Floraton und 2 Teilen TKS2 getopft.

2.2.1.2 *In vitro*-Kultur

Für die *in vitro*-Kultur von Pflanzen wurde Saatgut 2 min in 70 % Ethanol und 10 min in 7 % (v/v) NaOCl sterilisiert, mit sterilem H₂O gewaschen und auf MS-Medium nach Murashige und Skoog (1962) mit 1 % (w/v) Sucrose und 0,8 % (w/v) Pflanzen-Agar (Duchefa) ausgelegt. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Keimung und Kultivierung erfolgten bei 21 °C und einem Hell/Dunkel-Zyklus von 16/8 h. Alle 4-6 Wochen wurden die Vegetationskegel der Pflanzen inklusive einem Blatt abgetrennt und auf frisches MS-Medium umgesetzt.

2.2.2 Pfropfung von Tabak-Pflanzen

Für Übertragungsversuche von TSWV zwischen transgenen und nicht-transgenen Pflanzen wurden diese durch Pfropfung miteinander verbunden.

Hierzu wurden Pflanzen im 6-Blatt-Stadium verwendet. Die als Unterlage dienende Pflanze wurde auf einer Höhe von 2 - 3 cm über dem Substrat abgeschnitten und die Blätter bis auf die beiden untersten abgetrennt. Der Spross wurde ca. 1 cm tief in Richtung der Sprossachse eingeschnitten.

Die aufzupfropfende Pflanze (Reiser) wurde ca. 2 cm unter dem Vegetationskegel abgeschnitten und alle Blätter bis auf die obersten beiden abgetrennt. Der Spross wurde am unteren Ende auf einer Länge von ca. 1 cm in spitzem Winkel keilförmig zugeschnitten. Dieser Keil wurde angefeuchtet und in den eingeschnittenen Spross der Unterlage gesteckt. Die Pfropfstelle wurde mit Parafilm (Roth) zum Schutz vor Austrocknung und als Stabilisationshilfe mehrfach fest umwickelt. Die so gepfropften Pflanzen wurden bis zum Wiedereinsetzen des Blatt- und Sprosswachstums der Reiser unter Plastikfolie inkubiert und stets feucht gehalten. Danach erfolgte die Inkubation unter normalen Gewächshausbedingungen. Von den Reisern ausgehende Wurzeln wurden regelmäßig entfernt.

2.2.3 Herstellung von Protoplasten

W5-Medium	154 mM	NaCl
	125 mM	CaCl ₂
	5 mM	Glukose
	5 mM	KCl
	pH 5,6	
MaMg-Lösung	0,4 M	Mannitol
	15 mM	MgCl ₂
	0,1 % (w/v)	MES pH 7,0

Protoplasten für Inokulationsversuche wurden nach Steinecke *et al.* (1992) hergestellt. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Es wurden 0,25 g Driselase Enzym in 100 ml B5-Medium (Duchefa) mit 0,4 M Saccharose und pH 5,8 gelöst, über einen Faltenfilter gegeben und abschließend sterilfiltriert. Je 40 ml dieser Lösung wurden in 1000ml-Erlenmeyerkolben gefüllt und Blattmaterial aus *in vitro*-Kultur (3 bis 4 Blätter pro Kolben) in ca. 2 × 10 mm großen Streifen ohne Mittelrippe über Nacht unter Lichtabschluss darauf schwimmend inkubiert. Anschließend wurde die Enzym-Lösung mit den Blattstreifen 30 min bei 75 Upm auf einem Schüttler geschwenkt und grobe Bestandteile durch sterile Kunststoffsiebe (100 µm und 20 µm Porendurchmesser) herausgefiltriert. Nach 3 minütiger Zentrifugation bei 60 × g in 12ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner) flottierten die intakten Protoplasten auf dem Puffer. Der Puffer wurde inklusive dem Sediment aus zerstörten Zellen mit Hilfe einer Glaskapillare bis auf einen kleinen Rest, auf dem die intakten Protoplasten flottierten, abgesaugt. Die Protoplasten von 4 Röhrchen wurden in 10 ml W5-Medium vereinigt und ein Aliquot davon in einer Thoma-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 100 × g wurden die Protoplasten mit MaMg-Lösung auf eine Dichte von 3 × 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Die Protoplasten waren dann für die sofortige Inokulation nach 2.2.4.6 bereit.

2.2.4 Gewinnung von Inokulum und Inokulation von Pflanzenmaterial

2.2.4.1 Virusvermehrung

Für die Vermehrung von Tospoviren zur Gewinnung von Inokulum wurden *Nicotiana tabacum* cv. Nevrokop Pflanzen verwendet. Diese wurden im Gewächshaus kultiviert (2.2.1.1) und auf je 2 Blättern bei Erreichen des 4-Blatt Stadiums nach 2.2.4.4 mit Tospoviren inokuliert. Nach 10-14 Tagen waren die Pflanzen systemisch erkrankt und konnten abgeerntet werden. Abgeerntete Blätter wurden entweder direkt zur Inokulation weiterer Pflanzen nach 2.2.4.4 oder sofort für die Reinigung von Virus-Partikeln (2.2.4.2) oder Nukleoprotein-Komplexen (2.2.4.3) verwendet.

2.2.4.2 Reinigung von *Tospovirus*-Partikeln (Virionen)

Extraktionspuffer	100 mM	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ pH 7,0
	10 mM	Na ₂ SO ₃
Viruspuffer	10 mM	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ pH 7,0
	10 mM	Na ₂ SO ₃

Blattmaterial mit systemischen TSWV-Symptomen wurde zur Reinigung von Virus-Partikeln nach Steinecke *et al.* (1998) zunächst in 3 Volumen Extraktionspuffer im vorgekühlten Messer-Homogenisator zerkleinert und durch 3 Lagen Mull filtriert. Das Filtrat wurde 10 min bei 15.000 × g (Rotor SLA1500, Sorvall) und 4 °C zentrifugiert und das Sediment in 2 Volumen Viruspuffer resuspendiert. Zur vollständigen Resuspension der Partikel-Aggregate wurde diese Lösung 30 min mit geringer Drehzahl auf einem Magnetrührer bei 4 °C gerührt. Unlösliche Bestandteile wurden durch 15 minütige Zentrifugation bei 1.000 × g und 4 °C (SLA1500, Sorvall) sedimentiert. Der Überstand wurde 30 min im Ti45-Rotor (Beckmann) bei 70.000 × g und 4 °C zentrifugiert und das Sediment langsam auf Eis in 2 ml Viruspuffer je 50 g Ausgangsmaterial unter gelegentlichem Rühren gelöst. Je 2 ml hiervon wurden nach Zentrifugation für 10 min bei 1.200 × g und 4 °C (Rotor 12139, Sigma) auf einen 10-40 % Sucrose-Gradienten in Viruspuffer aufgetragen. Dieser wurde einen Tag zuvor aus 10, 20, 30 und 40%igen (w/v) Sucrose-Lösungen in Viruspuffer geschichtet und bei 4 °C gelagert. Es schloss sich eine 45 minütige Zentrifugation der Gradienten bei 70.000 × g und 4 °C an (Rotor SW28, Beckmann). Die Viruspartikel waren anschließend bei Beleuchtung im Auflicht (Kaltlicht-Schwanenhalslampe) als 2 opaleszente Banden im oberen Drittel der Gradienten sichtbar und wurden mit einer Kanüle abgesaugt. Diese Suspension wurde in 10 Volumen Viruspuffer verdünnt und die Virus-Partikel daraus durch erneute Zentrifugation für 45 min bei 70.000 × g und 4°C (Ti45) sedimentiert. Das Sediment wurde über Nacht bei 4 °C in 1 ml Viruspuffer gelöst. Nicht gelöste Bestandteile wurden durch eine abschließende Zentrifugation für 5 min bei 12.000 × g und 4 °C (Rotor 12145, Sigma) entfernt und die Protein-Konzentration im Überstand nach 2.2.6.2 bestimmt.

2.2.4.3 Reinigung von *Tospovirus*-Nukleoproteinkomplexen

100mM Tris-Puffer	100 mM	Tris-Cl pH 8,0
	5 mM	EDTA
	20 mM	Na ₂ SO ₃
	10 mM	DIECA
10mM Tris-Puffer	10 mM	Tris-Cl pH 7,9
	5 mM	EDTA
	20 mM	Na ₂ SO ₃
	10 mM	DIECA

Nukleoprotein-Puffer	200 mM	NaAcetat
	10 mM	EDTA
	pH 6,0	

Mit der Methode nach Roggero *et al.* (1998) wurden *Tospovirus*-Nukleoproteinkomplexe für N-Protein Mengenstandards gereinigt. Blattmaterial aus Pflanzen mit systemischen TSWV-Symptomen wurde in 5 Volumen 100mM Tris-Puffer im Messer-Homogenisator zerkleinert und durch 3 Lagen Mull filtriert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei $1.300 \times g$ (Rotor SLA1500, Sorvall) wurde der Überstand bei $125.000 \times g$ für 30 min erneut zentrifugiert (Rotor Ti45, Beckmann). Das Sediment wurde in 2 Volumen (bezogen auf die Menge eingesetzten Blattmaterials) 10mM Tris-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 2% (w/v) 3-Dimethylammonio-propansulfonat (zwitterionisches Detergenz) erfolgte die Lysis der Virus-Partikel-Membranen während einer 30 minütigen Inkubation auf einem Magnetprüher bei 4 °C. Ungelöste Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 10 min bei $12.000 \times g$ (Rotor SS34, Sorvall) sedimentiert. Je 30 ml Überstand wurden auf 4 ml eines 20 %igen (w/v) Sucrose-Kissens in 10 mM Tris-Puffer geschichtet und 90 min bei $100.000 \times g$ und 4 °C (Rotor SW28, Beckmann) zentrifugiert. Das Sediment wurde mit einem Glasstab zerstoßen und in Nukleoprotein-Puffer gelöst.

2.2.4.4 Inokulation von Pflanzen

Standardinokulationspuffer	0,1 M	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ pH 7,0
	2 % (w/v)	Polyvinylpyrolidon 15
	0,2 % (w/v)	Na ₂ SO ₃

Zur Inokulation von Tabak-Pflanzen mit *Tospoviren* wurden die zu inokulierenden Blattetagen mit Karborundum bestäubt. Von einer erkrankten Pflanze wurde ein Blatt mit deutlich ausgeprägten, jedoch noch nicht nekrotischen, systemischen *Tospovirus*-Symptomen geerntet und in 30 Volumen Standardinokulationspuffer gemörsert. Dieses Homogenat wurde mit dem Pistill unter leichtem Druck auf die Blätter gesunder Pflanzen gerieben. Nach einigen Minuten wurden die Pflanzen mit Leitungswasser abgespült.

2.2.4.5 Inokulation von Blattscheiben

Blattscheiben von Tabak-Pflanzen aus *in vitro*-Kultur (2.2.1.2) wurden mit am Vortag gereinigten *Tospovirus*-Partikeln (2.2.4.2) inokuliert. Diese wurden nach Proteingehaltsbestimmung (2.2.6.2) mit Virus-Puffer auf eine Protein-Konzentration von 0,8 µg/µl eingestellt. 50 µl hiervon (=40 µg Protein) wurden mit Hilfe eines, zuvor in 1 % (w/v) SDS gereinigten, Borstenpinsels (Gr. 10) auf je eine Inokulationsfläche von 1 cm² mit leichtem Druck eingerieben.

2.2.4.6 Inokulation von Protoplasten

PEG-Lösung	0,1 M	Ca(NO ₃) ₂
	0,4 M	Mannitol
	40 % (w/v)	PEG 4000
	pH 7,0 mit KCl	

Für die Inokulation von Protoplasten wurden je 170 µl (=0,5 × 10⁶ Zellen) Protoplasten in MaMg-Lösung aus 2.2.3 in 12ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Gereinigte TSWV-Partikel vom Vortag wurden in einer Protein-Konzentration von 15 µg in 50 µl Viruspuffer (2.2.4.2) den Protoplasten-Ansätzen langsam zugegeben. Nach 10 min wurden 170 µl PEG-Lösung unter leichtem Schwenken langsam zupipettiert und 20 min lang alle 5 min vorsichtig geschwenkt. Schließlich wurden die Ansätze in Petrischalen (35 mm Durchmesser) mit je 2 ml B5-Medium (Duchefa) mit 0,4 M Sucrose und pH 5,8 überführt. Die mit Parafilm (Roth) abgedichteten Petrischalen wurden bei 21°C und einem Hell/Dunkel-Zyklus von 16/8h inkubiert.

Durch Zugabe von 1/10 Volumen 0,1% (w/v) Fluoresceindiacetat (FDA) in Aceton und Betrachtung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wurde die Überlebensrate der Protoplasten in Stichproben bestimmt. Grün leuchtende, also lebende, Zellen machten bis zu 72 hpi einen Anteil von 50 - 80 % aller Zellen aus.

Zum Ernten wurden die Ansätze in 12ml-Zentrifugenröhrchen mit je 3 ml W5-Medium (2.2.3) überführt und 5 min bei 100 × g abzentrifugiert. Das Sediment wurde direkt in je 1 ml TriFast-Reagenz (peqLab) aufgenommen und die Protein-Fraktion nach 2.2.6.1 gereinigt.

2.2.5 Nukleinsäure-Techniken

2.2.5.1 Gesamt-RNA Extraktion aus Pflanzenmaterial

Gesamt-RNA wurde mit dem peqGOLD TriFast-Reagenz (peqLab) nach Angaben des Herstellers aus Pflanzenmaterial extrahiert. Es wurden 200 mg in N₂-gemörsertes Blattmaterial in 1 ml TriFast-Reagenz 20 sec intensiv gemixt, nach 5 min mit 100 µl CHCl₃ versetzt, erneut intensiv gemixt und 10 min bei Raumtemperatur belassen. Eine anschließende Zentrifugation für 5 min bei 18.000 × g führte zur Trennung der Phasen. Die RNA wurde mit 250 µl Isopropanol aus der wässrigen Phase ausgefällt. Hierzu wurde nach 15 min Inkubation 10 min bei 18.000 g und 4 °C zentrifugiert und das Sediment zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknung wurde das Sediment in 20 µl H₂O aufgenommen und die RNA-Menge und Reinheit photometrisch bei 260 und 280 nm gemessen.

2.2.5.2 Gesamt-DNA Extraktion aus Pflanzenmaterial

CTAB-Extraktionspuffer	140 mM	Sorbitol
	220 mM	Tris-Cl pH 8,0
	22 mM	EDTA
	800 mM	NaCl
	0,8 % (w/v)	Hexadecyltrimethyl-Ammoniumbromid (CTAB)
	1 % (w/v)	N-Laurylsarcosin
Proteinase K-Puffer (2×)	0,2 M	Tris-Cl pH 7,5
	25 mM	EDTA
	0,3 M	NaCl
	2 % (w/v)	SDS
TE 10/1	10 mM	Tris-Cl pH 7,0
	1 mM	EDTA

Gesamt-DNA für Southern-Blots (2.2.5.10) wurde nach Lassner *et al.* (1989) aus Pflanzenmaterial extrahiert. Unter flüssigem N₂ wurden 5 g Blattmaterial gemörsert und in 6 ml CTAB-Extraktionspuffer mit 1,2 ml CHCl₃ aufgenommen und 5 min bei 65 °C geschüttelt. Nach 25 min Zentrifugation bei 10.500 × g und 4 °C (Rotor 12139, Sigma) wurde die wässrige Phase abgenommen, wiederholt zentrifugiert und nochmals abgenommen. Es wurden 0,6 Volumen eiskaltes Isopropanol zugegeben, gründlich durchmischt und 20 min bei 10.500 × g und 4 °C zentrifugiert (Rotor 12139, Sigma). Das Sediment wurde mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen und zur Entfernung der RNA nach Trocknung in 2 ml TE 10/1 mit 0,1 % (w/v) RNase A aufgenommen. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden Proteine durch Inkubation mit 1 Volumen Proteinase K-Puffer und 1/10 Volumen Proteinase K (20 mg/ml) für 30 min bei 37 °C verdaut und durch anschließende Phenol-Extraktion entfernt. Dazu wurde 20 sec mit 1 Volumen Phenol (TE 10/1-gesättigt, pH 8,0, Roth) kräftig geschüttelt und 5 min bei 18.000 × g zentrifugiert. Die Oberphase wurde 20 sec mit 1 Volumen CHCl₃/Isoamylalkohol (24/1 Teile) geschüttelt und durch erneute Zentrifugation von restlichem Phenol befreit. Die wässrige Phase wurde zur Fällung der DNA mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 4,8) und 2,5 Volumen Ethanol versetzt. Nach 1 h bei -20 °C wurde die DNA 30 min bei 18.000 × g und 4 °C sedimentiert. Das Präzipitat wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 200 µl H₂O resuspendiert. Menge und Reinheit wurden photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt.

2.2.5.3 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Für den Restriktionsverdau von Gesamt-DNA (2.2.5.2) für die Southern Blot Analyse (2.2.5.10) wurden je 60 µg Gesamt-DNA mit 60 U *HindIII*-Restriktionsendonuklease in 50 µl des vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffers über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für andere Anwendungen

wurden je 5 U Restriktionsendonuklease für 0,5 µg DNA in 20 µl des empfohlenen Puffers 1 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.5.4 Reverse Transkription von RNA zu cDNA

Für die reverse Transkription von RNA-Vorlagen zu cDNA für die spätere Amplifizierung mittels PCR (2.2.5.5) wurden 0,05-0,5 µg Gesamt-RNA aus 2.2.5.1 in 10 µl H₂O mit je 1 µM Oligonukleotid-Primer TSWV-N-Ende und Aktin1 (2.1.4) 5 min bei 95 °C denaturiert und zur Bindung der Primer 5 min auf Eis abgekühlt. Zur Elongation der Oligonukleotid-Primer zur Synthese der mRNA-komplementären cDNA wurde folgender Mix zugegeben:

5 µl	5 × MMLV-Puffer (Promega)
2 µl	2mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
0,5 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µl)
0,1 µl	MMLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl)
7,4 µl	H ₂ O

Es wurde 1 h bei 42 °C inkubiert. Aus dieser Reaktion wurden jeweils 5 µl als Vorlage für die PCR (2.2.5.5) eingesetzt.

2.2.5.5 Amplifizierung von DNA-Sequenzen mittels PCR

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die cDNA-Vorlage aus 2.2.5.4 mit H₂O auf 5 µl aufgefüllt und folgender Mix zugegeben:

2,5 µl	10 × Puffer für thermophile Polymerase (Promega)
2 µl	25 mM MgCl ₂
2 µl	2mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
je 1 µl	10 µM Oligonukleotid-Primer (hin/rück)
0,5 µl	Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 20 µl	H ₂ O

Das Oligonukleotid-Primer Paar TSWV-N-ATG / TSWV-N-Ende wurde stets eingesetzt. Für die vergleichende Mengenbestimmung der N-Gen mRNA (3.1.3) wurde gleichzeitig das Oligonukleotid-Primer Paar Aktin1 / Aktin2 zur Standardisierung eingesetzt. Die PCR wurde nach folgendem Programm im Thermocycler (Personal Cycler, Biometra) durchgeführt:

30 Zyklen		5 min	95 °C
		1 min	95 °C
		1 min	63 °C
		1 min	72 °C
		5 min	72 °C

Je 5 µl PCR-Ansatz wurden zur Auswertung auf einem Agarose-Gel aufgetrennt (2.2.5.9.1).

2.2.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide für die Transformation in *E. coli* (2.2.5.7) wurden zunächst an DNA-Fragmenten und Klonierungsvektoren durch Restriktionsverdauung (2.2.5.3) kohäsive Enden geschaffen und Aliquots zur Mengenabschätzung auf einem Agarose-Gel aufgetrennt (2.2.5.9.1). Der Klonierungsvektor pBluescript SK- (Stratagene) wurde mit der fünffachen Menge DNA-Fragment und 1 U T4-DNA-Ligase (Boehringer) in 20 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (Boehringer) über Nacht bei Raumtemperatur ligiert.

2.2.5.7 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

SOB-Medium (je Liter)	20 g 5 g 0,5 g 0,2 g pH 7,5	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl
SOC-Medium	20 mM 20 mM in SOB-Medium	Glukose MgCl ₂
LB-Medium (je Liter)	10 g 5 g 10 g	Trypton Hefeextrakt NaCl
LB-Agar	15 g in LB-Medium	Micro-Agar (Duchefa)
AIX-Agar (je Liter)	150 mg 47 mg 40 mg in LB-Agar	Ampicillin Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid (IPTG) 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) gelöst in Dimethylformamid

Alle Medien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert. Glukose, MgCl₂, Ampicillin, IPTG und X-Gal wurden nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C zugegeben.

Die Transformation von Bakterien zur Vermehrung von DNA-Fragmenten in Klonierungsvektoren für die Herstellung von Größenstandards und Sonden wurde nach Sharma und Schimke (1996, verändert) durchgeführt.

Zunächst wurden elektrokompente Zellen vorbereitet. Dazu wurde eine Kolonie von *E. coli* Stamm NM522 über Nacht in 5 ml LB-Medium kultiviert. Anschließend wurden 500 ml LB-Medium mit 2,5 ml Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,5-0,6 bei 600nm inkubiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 min.

Die Zellen wurden 15 min bei $2.000 \times g$ und 4°C sedimentiert (Rotor SLA 1500, Sorvall), auf Eis in 125 ml eiskaltem H_2O resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Sedimente wurden in 10 ml 10 % (v/v) Glycerin (steril) aufgenommen und 15 min bei $4.000 \times g$ und 4°C (Rotor SS34, Sorvall) zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 0,5 ml 10 % (v/v) Glycerin (steril) aufgenommen und in 55 μl -Aliquots bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Für die Transformation wurde je ein Zell-Aliquot auf Eis aufgetaut und in Elektroporationsküvetten mit 5 μl Ligationsansatz aus 2.2.5.6 versetzt. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden die Zellen im Elektroporator (Modell 2510, Eppendorf) für ca. 3-5 ms einer Spannung von 1800 V ausgesetzt und sofort danach in 500 μl SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Hiervon wurden 10-200 μl Aliquots auf AIX-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Kolonien, deren Zellen den Klonierungsvektor mit ligiertem DNA-Fragment (2.2.5.6) tragen, erscheinen weiß, ist dagegen der Vektor ohne das Insert enthalten, zeigt die Kolonie eine bläuliche Färbung.

2.2.5.8 Plasmid-Präparationen aus Bakterienkulturen

Lösung A	50 mM 25 mM 10 mM	Glukose Tris-Cl pH 8,0 EDTA
Lösung B	200 mM 1 % (w/v)	NaOH SDS
Lösung C	3 M pH 4,8	Na-Acetat
Lösung D	100 mM 50 mM	Na-Acetat Tris-Cl pH 8,3

Zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurden Einzelkolonien nach der Transformation (2.2.5.7) in 3 ml LB-Medium (2.2.5.7) mit 150 mg Ampicillin pro Liter über Nacht bei 37°C geschüttelt und anschließend aus 2 ml durch Zentrifugation für 1 min bei $18.000 \times g$ geerntet. Nach Aufnahme der Zellen in 200 μl Lösung A und Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurden 400 μl Lösung B und 300 μl Lösung C zugegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde 10 min bei $18.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut 10 min bei $18.000 \times g$ zentrifugiert und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 600 μl Isopropanol gefällt. Durch Zentrifugation (10 min, $18.000 \times g$) wurde diese sedimentiert, in 200 μl Lösung D aufgenommen und durch Zugabe von 400 μl Ethanol erneut gefällt. Das nach anschließender Zentrifugation (10 min, $18.000 \times g$) erhaltene Sediment wurde nach Trocknung in je 50 μl H_2O mit 1 mg/ml RNase A aufgenommen.

2.2.5.9 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.2.5.9.1 Native DNA Gelelektrophorese

TAE-Puffer	0,04 M 1 mM	Tris-Acetat pH 8,3 EDTA
Auftragspuffer	50 % (v/v) 0,1 % (w/v)	Glycerin Bromphenolblau

Für die native DNA Gelelektrophorese wurden 1 oder 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer bis zum vollständigen Lösen gekocht und 0,2 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Nachdem die Gele in vorbereiteten Gelträgern ausgehärtet waren, wurden die Proben mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzt und in die Taschen der Gele pipettiert. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei 80-100 V unter TAE-Puffer.

2.2.5.9.2 Denaturierende RNA Gelelektrophorese

10 × MOPS Puffer	200 mM 50 mM 10 mM pH 7,0	MOPS NaAcetat EDTA
5 × RNA Ladebuffer	160 µl 80 µl 720 µl 2 ml 3 ml 3 ml ad 10 ml	gesättigte Bromphenolblau-Lösung 500 mM EDTA 37% (v/v) Formaldehyd Glycerin Formamid 10 × MOPS Puffer H ₂ O
Laufpuffer für RNA-Gele	100 ml 20 ml ad 1000 ml	10 × MOPS Puffer 37 % (v/v) Formaldehyd H ₂ O

Für die Gelelektrophorese von RNA unter denaturierenden Bedingungen für die Northern-Blot Analyse (2.2.5.10) wurde Formaldehyd als Denaturanz eingesetzt. Für 1,5 %ige (w/v) Agarose Gele wurden 750 mg Agarose in 45 ml H₂O bis zum vollständigen Lösen gekocht. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurden 5 ml 10 × MOPS Puffer und 900 µl 37 % (v/v) Formaldehyd zuge-mischt. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,2 µg/ml eingesetzt. Die Gele wurden in Gelträger gegossen, die zuvor durch mehrstündiges Einwirken von 0,1 % (w/v) SDS gereinigt wurden. Die RNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 5 × RNA Ladebuffer versetzt und Sekundärstrukturen 15 min bei 65 °C denaturiert. Die Proben wurden auf die Gele aufgetragen und unter Laufpuffer für RNA-Gele bei 50 V aufgetrennt.

2.2.5.10 Hybridisierung von Nukleinsäuren mit DIG-markierten Sonden (Southern- und Northern Blot)

Für die Hybridisierung von Nukleinsäuren mit DIG-markierten Sonden wurden RNA-Proben (Northern Blot) nach 2.2.5.9.2 bzw. DNA-Proben (Southern Blot) nach 2.2.5.9.1 gelelektrophoretisch aufgetrennt. DNA-Proben wurden zunächst im Agarose-Gel nach 2.2.5.10.1 denaturiert. Anschließend erfolgte der Kapillartransfer der Nukleinsäuren auf Nylon-Membranen (2.2.5.10.2). Die Detektion der gesuchten DNA oder RNA Sequenzen erfolgte mittels DIG-markierter Sonden (2.2.5.10.3) und einem DIG-spezifischen Antikörper, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, mit Hilfe eines Chemolumineszenz-Substrates (2.2.5.10.4).

2.2.5.10.1 Denaturierung von elektrophoretisch aufgetrennter DNA im Gel

Denaturierungslösung	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
Neutralisierungspuffer	0,5 M	Tris-Cl pH 7,5
	1,5 M	NaCl

Für die Denaturierung von DNA zu Einzelsträngen nach der Gelelektrophorese (2.2.5.9.1) wurde das betreffende Gel 2 × 15 min in Denaturierungslösung langsam geschüttelt. Anschließend wurde 2 × 15 min in Neutralisierungspuffer inkubiert. Das Gel wurde dann direkt für den Kapillartransfer eingesetzt (2.2.5.10.2)

2.2.5.10.2 Kapillartransfer von Nukleinsäuren auf Nylon-Membranen

20 × SSC	3 M	NaCl
	300 mM	NaCitrat
	pH 7,0	

Zum Transfer elektrophoretisch aufgetrennter RNA (2.2.5.9.2) oder DNA (2.2.5.9.1) auf Nylon-Membranen wurden die Agarose-Gele sowie die Nylon-Membranen zunächst 5 min in 10 × SSC äquilibriert. Unter Vermeidung von Luftblasen wurde die Transfer-Apparatur dann auf folgende Weise zusammengesetzt:

- (oben)
- Gewicht (ca. 200 g)
- Handtuchpapier, trocken, ca. 5 cm hoher Stapel
- Blotting Papier (Schleicher & Schuell), 3 Lagen
- Nylonmembran (Hybond+, Amersham)
- Agarose-Gel (enthält die aufgetrennten Nukleinsäuren)
- Blotting Papier, 2 Lagen
- überhängendes Blotting Papier
- Plastik-Klotz
- (unten)

Dieser Aufbau wurde so in eine Plastikschaale, gefüllt mit $20 \times \text{SSC}$, gestellt, dass nur die überhängenden Enden der untersten Lage des Blotting Papiers in die Lösung tauchten. Der Kapillartransfer der Nukleinsäuren wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Nukleinsäuren wurden dann durch UV-Bestrahlung mit 120 mJ (Stratalinker, Stratagene) auf den Nylonmembranen fixiert, die danach direkt für die Detektion der Nukleinsäuren (2.2.5.10.4) eingesetzt wurden.

2.2.5.10.3 Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden

DIG (Digoxigenin)-markierte DNA-Sonden zur spezifischen Detektion von DNA- oder RNA-Fragmenten wurden mit dem "DIG-High Prime"-Kit der Firma Roche nach Anleitung des Herstellers synthetisiert. Als Vorlage wurde das TSWV-L3 N-Gen eingesetzt, welches als Produkt einer PCR (2.2.5.5) mit den Oligonukleotid-Primern TSWV-N-ATG und TSWV-N-Ende (2.1.4) in das Plasmid pBluescript SK- (Stratagene) kloniert worden war (2.2.5.6). Das Plasmid mit dem N-Gen Fragment wurde in *E. coli* vermehrt, nach 2.2.5.8 aus den Zellen gewonnen, das Fragment daraus durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *HindIII* und *BamHI* ausgeschnitten, auf einem Agarose-Gel (2.2.5.9.1) aufgetrennt und das ausgeschnittene Fragment über eine E.Z.N.A. Plasmid-Miniprep Säule (peqLab) gereinigt. Es wurden 1 µg Vorlage in 16 µl H₂O durch 10 minütiges Kochen denaturiert, auf Eis heruntergekühlt und mit 4 µl DIG-High-Prime Reaktions-Mix versetzt. Die Reaktion wurde nach 20 h bei 37 °C durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt und die Markierungs-Intensität nach Herstellerangaben durch Vergleich mit fertig markierten Standards (Roche) ermittelt.

2.2.5.10.4 Detektion von DNA/RNA Sequenzen auf Nylon-Membranen

Waschpuffer 1	0,1 % (w/v) SDS in $2 \times \text{SSC}$ (2.2.5.10.2)
Waschpuffer 2	0,1 % (w/v) SDS in $0,5 \times \text{SSC}$ (2.2.5.10.2)
Maleinsäure-Puffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH 7,5 (NaOH)
Blockierungslösung	2 % (w/v) "Blocking Reagent" (Roche) in Maleinsäure-Puffer
Waschpuffer 3	0,3 % (v/v) Tween20 in Maleinsäure-Puffer
Detektions-Puffer	0,1 M Tris-Cl 0,1 M NaCl pH 9,5

Zur sequenzspezifischen Detektion von DNA oder RNA auf Nylonmembranen wurden diese nach dem Fixieren der Nukleinsäuren (2.2.5.10.2) in $2 \times \text{SSC}$ (2.2.5.10.2) angefeuchtet und in Hybridisierungsröhren 30 min bei 65 °C (für RNA Proben) oder 50 °C (für DNA-Proben) bei langsamer Drehung im Hybridisierungssofen (Compact Line OV4, Biometra) mit 8 ml "DIG Easy Hyb" Prähybridisierungspuffer (Roche) inkubiert. Für die Hybridisierung wurden 125 ng DIG-markierter DNA-Sonde (2.2.5.10.3) in 5 ml vorgeheizte "DIG Easy Hyb" Lösung gemischt und die Nylon-Membranen darin über Nacht bei 65 °C (RNA-Proben) bzw. 50 °C (DNA-Proben) inkubiert.

Zum Entfernen unspezifisch gebundener Sonde wurden die Nylon-Membranen im nächsten Schritt zweimal 5 min in Waschpuffer 1 und zweimal 15 min in Waschpuffer 2 bei der selben Temperatur, die auch für die Hybridisierung verwendet wurde, gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Für die immunochemische Detektion der DIG-markierten Sonden wurden die Nylon-Membranen anschließend zunächst 30 min in Blockierungslösung zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Ein anti-Digoxigenin Antikörper-Konjugat ("Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments", Roche) wurde 1:10.000 in Blockierungslösung verdünnt und die Nylon-Membranen hierin 30 min inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer 3 für je 15 min entfernt. Die Nylon-Membranen wurden daraufhin 5 min in Detektionspuffer äquilibriert und anschließend, flach auf einer Plastikfolie liegend, flächendeckend mit ca. 1 ml "CDP-Star Ready-to-use" Chemolumineszenz-Substrat in Detektions-Puffer (Roche) beträufelt. Eine zweite Plastikfolie wurde auf die Membran gelegt, wodurch die Substrat-Lösung gleichmäßig verteilt wurde. Nach 5 min Inkubation unter Lichtabschluss wurde die CDP-Star Lösung herausgedrückt und die noch feuchte Membran in die Plastiktüte eingeschweißt. Unter Rotlichtbedingungen wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) aufgelegt und nach 1-5 min Exposition entwickelt.

2.2.6 Protein-Techniken

2.2.6.1 Reinigung der Protein-Fraktion aus Pflanzenmaterial

Zur Reinigung der Protein-Fraktion aus Pflanzenmaterial wurde das peqGOLD TriFast-Reagenz (peqLab) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. 100 mg Blattmaterial oder 5×10^5 Protoplasten aus 2.2.4.6 wurden in 500 µl TriFast-Reagenz homogenisiert. Das Blattmaterial wurde zu diesem Zweck im Reagenzgefäß für einige Sekunden in flüssigen N_2 getaucht und mit einem Plastikstab zerstoßen. Das Pflanzenmaterial wurde mit dem TriFast-Reagenz 20 sec intensiv gemixt und nach 5 min mit 100 µl CHCl_3 versetzt, erneut intensiv gemixt und 10 min bei Raumtemperatur belassen. Eine anschließende Zentrifugation für 5 min bei $18.000 \times g$ führte zur Trennung der Phasen. Die wässrige Phase wurde entfernt oder für spätere RNA-Extraktion aufbewahrt (2.2.5.1). Aus der

organischen Phase sowie der Interphase wurde zunächst die DNA durch Zugabe von 150 µl Ethanol und Zentrifugation bei $2.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min ausgefällt. Zur Fällung der Proteine wurden anschließend 750 µl Isopropanol zugegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 10 min bei $18.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Die Protein-Sedimente wurden dreimal mit je 1 ml 0,3 M Guanidin-HCl in 95 % Ethanol und abschließend mit 95 % Ethanol ohne Zusätze gewaschen und getrocknet. Das Resuspendieren der Protein-Sedimente erfolgte über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in je 50 µl $2 \times$ Probenpuffer (2.2.6.3).

2.2.6.2 Messung von Protein-Konzentrationen

Protein-Konzentrationen in Lösungen wurden mit dem „BCA Protein Assay Kit“ von Pierce (USA) nach Herstellerangaben im Mikrotiterplatten-Maßstab bestimmt.

Es wurden jeweils 25 µl Probe mit 200 µl BCA-Arbeitsreagenz (50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B) in Mikrotiter-Kavernen gemischt. Nach 30 min Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Absorptionswerte von Proben und Standard (25 µg/ml bis 2000 µg/ml) bei 550 nm photometrisch gegen Arbeitsreagenz mit 25 µl Wasser gemessen.

2.2.6.3 Gelelektrophorese von Proteinen

Probenpuffer (2 ×)	20 mM 2 mM 2 % (w/v) 10 % (v/v) 20 % (v/v) 0,01 % (w/v)	Tris-Cl pH 8,0 EDTA SDS Mercaptoethanol Glycerin Bromphenolblau
Sammelgelpuffer (4 ×)	0,5 M 0,04 % (w/v)	Tris-Cl pH 6,8 SDS
Trenngelpuffer (4 ×)	1,5 M 0,04 % (w/v)	Tris-Cl pH 8,3 SDS
Laufpuffer	50 mM 38 mM 0,01 % (w/v)	Tris-Cl pH 8,3 Glycin SDS
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung	30 % (w/v) 2,7 % (w/v)	Acrylamid N,N-Methylenbisacrylamid

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte denaturierend nach der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Methode (SDS-PAGE) von Laemmli (1970). Zum Gießen der Trenngele (12,5 %) wurden 18,75 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung mit 11,25 ml Trenngelpuffer (4 ×) vermischt und auf 44 ml mit H_2O aufgefüllt. Zum Start der Polymerisation

wurden 300 μ l 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 30 μ l Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugegeben, die Mischung in eine "Mighty Small" Kammer (Hoefer Scientific) gegossen und mit H₂O überschichtet. Nach dem Aushärten wurden die Sammelgele (4 %) wie folgt präpariert: 650 μ l Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung wurden mit 1,25 ml Sammelgelpuffer (4 \times) gemischt und mit H₂O auf 5 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 50 μ l 10 % (w/v) APS und 5 μ l TEMED wurde diese Lösung zum Auspolymerisieren auf fertige Trenngele geschichtet. Durch einen aufgesetzten Kamm entstandene Taschen im Sammelgel dienten später zur Aufnahme der Proben, die zuvor zur Denaturierung mit 1 Volumen Probenpuffer versetzt und 5 min gekocht wurden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter Laufpuffer bei 120 V.

2.2.6.4 Western Blot

Der Western Blot zum serologischen Nachweis von Proteinen nach der Gelelektrophorese wurde nach Towbin *et al.* (1979) durchgeführt.

Die Proteine wurden zunächst nach 2.2.6.3 in SDS-Polyacrylamid-Gelen nach Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend nach 2.2.6.4.1 auf PVDF-Membranen übertragen.

2.2.6.4.1 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Blotting-Puffer:	25 mM	Tris-HCl, pH 8,3
	192 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol

Unter Blotting-Puffer erfolgte der Zusammenbau der Bestandteile in folgender Reihenfolge (PVDF-Membranen wurden zuvor 10 sec in 60 % (v/v) Methanol angefeuchtet):

(Kathode)
Kunststoffgitter
Schwamm
Blotting Papier (Schleicher & Schuell)
PVDF-Membran (0,45 μ m, Roth)
SDS-Polyacrylamid-Gel nach Elektrophorese (2.2.6.3)
Blotting Papier
Schwamm
Kunststoffgitter
(Anode)

Die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran wurde über Nacht bei 10 V unter Wasserkühlung in einer vertikalen Elektroblo-Kammer (Hoefer Scientific Instruments) in Blotting-Puffer durchgeführt

2.2.6.4.2 Serologische Detektion von Proteinen

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (PBS-T)	137,0 mM 2,7 mM 8,1 mM 1,5 mM 0,05 % (v/v)	NaCl KCL Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ Tween 20
Diaminobenzidin (DAB)-Färbelösung	50 mM 0,03 % (w/v) 0,035 % (v/v) 1,67 mM	Tris-Cl pH 7,5 NiCl ₂ H ₂ O ₂ 3,3-Diaminobenzidin 4HCl
Fast Red-Puffer	0,2 M 2 mM	Tris-Cl pH 8,0 MgCl ₂
Fast Red-Färbelösung 1	6 mg	Naphtol AS-MX-Phosphat-Dinatriumsalz in 15 ml H ₂ O
Fast Red-Färbelösung 2	90 mg	Fast Red TR Salz in 15 ml Fast Red Puffer

Unspezifische Bindungsstellen auf den Nitrocellulose- (2.2.6.5) oder PVDF-Membranen (2.2.6.4.1) wurden zunächst durch 30 minütige Inkubation in PBS-T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver blockiert. Die spezifische Markierung der gesuchten Proteine wurde durch Inkubation der Membran in PBS-T mit 1 % (w/v) Magermilchpulver sowie dem jeweils passenden Antikörper (2.1.5) für 1-2 h erreicht. Die genaue Inkubationszeit und Arbeitskonzentration wurde für jeden Antikörper in Vorversuchen individuell ermittelt. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in PBS-T wurden die Membranen für 1 h in PBS-T mit 1 % (w/v) Magermilchpulver sowie einem geeigneten anti-Immunglobulin Antikörper-Konjugat (anti-Kaninchen-Peroxidase bzw. anti-Maus-Alkalische Phosphatase, Sigma) in einer Konzentration nach Herstellerangaben inkubiert. Es wurde erneut dreimal in PBS-T gewaschen.

Bei Benutzung eines Peroxidase-Konjugates erfolgte das Anfärben der markierten Proteine durch Inkubation der Membran in Diaminobenzidin-Färbelösung.

Wurde anti-Maus-Alkalische Phosphatase als zweiter Antikörper eingesetzt, so wurden Fast Red-Färbelösung 1 und 2 getrennt angesetzt und nach vollständigem Lösen der Salze zu gleichen Teilen zusammengegeben. In dieser Lösung wurde die Membran bis zur Erkennbarkeit einer spezifischen Färbung inkubiert.

2.2.6.4.3 Unspezifische Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen

Coomassie-Färbelösung	0,2 % (w/v) 50 % (v/v) 40 % (v/v) 10 % (v/v)	Coomassie-Brillantblau R250 H ₂ O Methanol Eisessig
-----------------------	---	---

Coomassie-Entfärbelösung	50 % (v/v)	H ₂ O
	40 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Eisessig

Die Coomassie-Färbelösung wurde über einen Faltenfilter gegeben. PVDF-Membranen mit gebundenen Proteinen wurden nach Gelelektrophorese (2.2.6.3) und Elektrotransfer (2.2.6.4.1) 15 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Nicht an Protein gebundener Farbstoff wurde durch Waschen der Membran in Coomassie-Entfärbelösung für 15 min, unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung, entfernt (nach Weber und Osborn, 1969, verändert).

2.2.6.5 Spezifischer Nachweis von Proteinen in Gewebeabdrücken von Pflanzen (Tissue Print Immunoblot)

Für Nachweis und Lokalisierung von Proteinen in Pflanzen wurden die zu untersuchenden Gewebe quer oder längs mit einer frischen Rasierklinge geschnitten und die Schnittfläche leicht auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm, Roth) gedrückt (ca. 2 sec). Blätter wurden hierzu zunächst parallel zur Mittelrippe eingerollt, quer geschnitten und in gerollter Form auf die Membran gedrückt. Die Membranen konnten ohne Verlust der Detektierbarkeit trocken eingeschweißt für mehrere Tage bei 4 °C aufbewahrt werden. Die immunochemische Detektion der Proteine erfolgte nach 2.2.6.4.2.

2.2.6.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Beschichtungspuffer	15 mM	Na ₂ CO ₃
	35 mM	NaHCO ₃
	pH 9,6	
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung + Tween (PBS-T)	137,0 mM	NaCl
	2,7 mM	KCL
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	0,05 % (v/v)	Tween 20
Probenpuffer	2 % (w/v) in PBS-T	Polyvinylpyrolidon (PVP)
Konjugatpuffer	0,2 % (w/v) in Probenpuffer	Eialbumin
Substratpuffer	9,7 % (w/v) pH 9,8 mit HCl	Diethanolamin

Der Nachweis von Proteinen im nativen Zustand wurde mit Hilfe des "Triple Antibody-Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay" (TAS-ELISA) durchgeführt.

Die Beschichtung der Kavernen von Mikrotiterplatten ("Medium-Binding", Greiner) erfolgte über Nacht bei 4 °C mit einer 1:1000 Verdünnung der IgG-Fraktion eines Hühner-Antikörpers gegen TSWV N-Protein (2.1.5). Freie Bindungsstellen wurden durch eine 30 minütige Inkubation mit PBS-T + 2 % (w/v) Magermilchpulver abgesättigt. Die in Probenpuffer homogenisierten Pflanzenproben wurden in einem Volumen von je 100 µl in je zwei Parallel-Ansätzen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurde zunächst über Nacht bei 4 °C mit einer 1:500 Verdünnung von Antiserum AS-8349 (2.1.5) in Konjugatpuffer inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit dem Konjugat "Anti-Kaninchen-Alkalische Phosphatase" (Sigma) in einer Verdünnung von 1:5000 für 1,5 h bei 37 °C. Für die Farbreaktion wurde 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer bis zum Erreichen einer sichtbaren Gelbfärbung in den Kavernen bei 37 °C inkubiert. Die Absorptionen der einzelnen Kavernen wurden bei 405 nm gegen Blindproben (nur Puffer) und eine Referenzwellenlänge von 630 nm im MR5000 Mikrotiterplatten-Photometer (Dynatech) gemessen.

In allen Fällen wurden 100 µl Lösung pro Kaverne eingesetzt, Ausnahme war der Blockierungsschritt mit 200 µl pro Kaverne. Zwischen allen Schritten wurde jeweils dreimal 5 min mit PBS-T gewaschen.

2.2.6.7 Reinigung der IgG-Fraktion von Antiseren

0,5 × Phosphat-gepufferte	68,5 mM	NaCl
Kochsalzlösung	1,35 mM	KCL
(0,5 × PBS)	4,05 mM	Na ₂ HPO ₄
	0,75 mM	KH ₂ PO ₄

Zur Reinigung der IgG-Fraktion nach Clark und Adams (1977) wurden 0,5 ml Antiserum mit 4,5 ml H₂O verdünnt und anschließend 5 ml gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung tropfenweise zugegeben. Nach 1 h Präzipitation wurde die Lösung 10 min bei 1.100 × g zentrifugiert und das Sediment in 2 ml 0,5 × PBS resuspendiert. Diese Lösung wurde 2 × 30 min und 1 × über Nacht gegen 0,5 × PBS dialysiert.

Eine 4 cm hohe DEAE-Cellulose-Säule mit 1 cm Durchmesser wurde über der Ausflussöffnung mit einer Fritte versehen, mit 0,5 × PBS gespült, mit resuspendierter DEAE52-Cellulose (Servacell) 4 cm hoch gefüllt und mit 0,5 × PBS äquilibriert. Die dialysierte Antikörper-Lösung wurde über die Säule gegeben und in 0,7 ml-Fractionen gesammelt. Die Fraktion mit der höchsten photometrischen Absorption bei 280 nm wurde auf eine OD_{280nm} von 1,4 mit 0,5 × PBS eingestellt, was einem Proteingehalt von 1 mg/ml entspricht. Diese Lösung war die IgG-Fraktion des Serums und wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.7 Computergestützte Auswertung von Nukleinsäure- bzw. Proteinbanden nach Elektrophorese oder Western Blot

Für die Quantifizierung von Nukleinsäure oder Protein in Banden nach der Elektrophorese bzw. dem Western Blot (im Falle der Proteine), wurde das PC-Programm „ImageMaster 1D Prime Version. 3.00“ von NonLinear Dynamics Ltd. (USA) genutzt. Die Bahnen auf dem eingescannten Gel oder Blot wurden jeweils manuell definiert und der unspezifische Hintergrund mit der Methode „Rolling Disc“ (Durchmesser: 50) abgezogen. Das Programm gibt die Pixel-Dichten des Bildes über die Länge der jeweiligen Bahn als Profil aus, die dabei entstehenden Peaks wurden manuell den jeweiligen Banden zugeordnet und die zugehörige Fläche unter dem Profil vom Programm durch Integration errechnet. Diese Werte werden im Folgenden als „Banden-Intensitäten“ bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der transgenen Tabak-Linien XL 4.24, XL 7.1, XL 8.28, XL 14.1 und X 15.1

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenspezies handelt es sich um *Nicotiana tabacum* L., Kultivar Samsun NN. Diese wurden im Falle der Linien XL 4.24, XL 7.1, XL 8.28 und XL 14.1 mit einem Konstrukt bestehend aus dem vollständigen N-Protein Gen von TSWV-L3 (1.2) inklusive einer vorgeschalteten Leader-Sequenz transformiert, diese werden als XL-N Konstrukte bezeichnet. Die Linie X 15.1 beinhaltet hingegen lediglich das N-Protein Gen ohne einen Leader (N-Konstrukt). Die Transformation erfolgte nicht im Zuge dieser Arbeit.

Eine detailliertere Erläuterung der Konstrukte befindet sich in Abschnitt 2.1.1.

Die verschiedenen Tabak-Linien wurden zunächst hinsichtlich folgender Aspekte untersucht:

- Analyse der Nukleinsäuresequenzen der Konstrukte zur Bestimmung möglicher Start-Codons
- Integrationshäufigkeit des Transgens in das pflanzliche Genom
- Transkription transgener mRNA: Größenvergleich und Mengenbestimmung
- Expression des rekombinanten XL-N- bzw. N-Proteins: Bestimmung des tatsächlich genutzten Start-Codons, der Lage des XL-Leader-Peptids im Protein und Verteilung und Menge des Proteins im Blatt

3.1.1 Computergestützte Sequenz-Analysen der Konstrukte

Durch Analyse der Nukleinsäuresequenz des XL-N-Konstruktes mit dem Programm „DNAMAN Version 2.71“ (Lynnon-Biosoft) wurden drei mögliche Start-Codons (AUG) auf der transgenen mRNA lokalisiert und die Molekulargewichte der jeweiligen Translationsprodukte errechnet. Diese Informationen sind in **Tab. 1** angegeben. Neben dem Wildtyp-N-Protein (28,9 kDa) könnten demnach theoretisch zwei Fusionsprodukte aus Leader-Sequenz-Anteilen und dem TSWV N-Protein translatiert werden. Diese werden im folgenden als "große Fusion" (ab Pos. 36, Molekulargewicht 35,7 kDa) und "kleine Fusion" (ab Pos. 147, Molekulargewicht 31,4 kDa) bezeichnet.

Die Positionen der Start-Codons sowie die möglichen Translationsprodukte sind auch bereits in der grafischen Übersicht über das Konstrukt in **Abb. 2** in Abschnitt 2.1.1 enthalten.

Da die ersten beiden Start-Codons in der PPV-Leader-Sequenz liegen, fehlen sie im N-Konstrukt der Linie X 15.1, die demnach lediglich das Wildtyp-N-Protein mit einem Molekulargewicht von 28,9 kDa exprimieren kann.

Tab. 1: Sequenzanalyse des XL-N-Konstruktes zur Auffindung möglicher AUG-Sart-Codons. Eine Übersicht über die Konstrukte befindet sich in **Abb. 2** (Abschnitt 2.1.1).

Bezeichnung	Start-Codon	Position des Start-Codons innerhalb der Nukleinsäuresequenz des XL-N-Konstruktes ¹	Länge der Nukleinsäuresequenz [bp]	Molekulargewicht des resultierenden Proteins [kDa]
Große Fusion	1. AUG im PPV-Leader	36	957	35,7
Kleine Fusion	2. AUG im PPV-Leader	147	846	31,4
Wildtyp N-Prot.	AUG des TSWV N-Gens	216	777	28,9

¹Die Zählung beginnt hier mit dem 1. Nukleotid der PPV-Leader-Sequenz des XL-N-Konstruktes.

3.1.2 Bestimmung der Integrationshäufigkeit des Transgens in das pflanzliche Genom

Mit Hilfe des Southern Blot Verfahrens nach 2.2.5.10 wurde die Häufigkeit der Integration des Transgens in das Genom der verschiedenen Tabak-Linien bestimmt. Dazu wurde Gesamt-DNA nach 2.2.5.2 gewonnen und mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaut (2.2.5.3). *HindIII* besitzt keine Erkennungsstellen innerhalb der Sequenz des TSWV N-Gens und der Leader-Sequenz. Die genaue Größe der resultierenden Fragmente hängt folglich von den Positionen der jeweils benachbarten *HindIII*-Schnittstellen ab und ist daher vom Ort der Integration in das Genom abhängig. Eine Mehrfachintegration des Konstruktes sollte also im Southern-Blot-Verfahren nach 2.2.5.10 zu mehreren Banden führen.

Das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse ist in **Abb. 3** zu sehen. Aufgetragen wurden jeweils 60µg Gesamt-DNA nach *HindIII*-Verdau. Hybridisiert wurde mit einer DIG-markierten DNA-Sonde (2.2.5.10), bestehend aus der durch die Primer TSWV-N-ATG und TSWV-N-Ende eingegrenzten Sequenz des TSWV N-Gens (2.1.4). Der eingesetzte Größenstandard wurde durch *PvuII*- bzw. *BamHI/HindIII*-Verdau von Plasmid pBluescript SK- (Stratagene) mit dem TSWV N-Gen als Insert hergestellt. Alle detektierten Fragmente sind größer als ca. 1300 bp. Da das TSWV N-Gen mit vorgeschaltetem PPV-Leader 1017 bp lang ist, beinhalten all diese Fragmente jeweils ein mindestens 300 bp großes Stück ihrer Umgebung. Die Linien XL 4.24, XL 7.1, XL 8.28 und X 15.1 zeigten jeweils nur eine Bande, enthalten also jeweils nur eine Kopie des Konstruktes in ihrem Genom. Bei der Linie XL 14.1 wurden hingegen zwei Banden detektiert, hier ist das Konstrukt folglich an zwei Stellen in das Genom integriert.

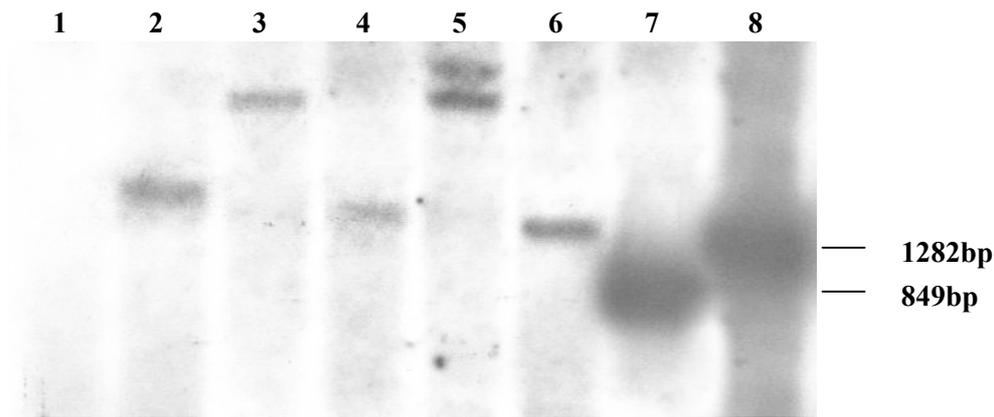


Abb. 3: Southern Blot von je 60µg Gesamt-DNA aus Pflanzen der transgenen Linien nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *HindIII*. Detektiert wurde mit einer DIG-markierten DNA-Sonde gegen das N Gen aus TSWV-L3.

1=nicht-transgene Kontrolle, 2=XL 4.24, 3=XL 7.1, 4=XL 8.28, 5=XL 14.1, 6=X 15.1, 7=Marker 1 (849bp), 8=Marker 2 (1282bp). Detektiert wurde mit einer DIG-markierten DNA-Sonde gegen das N Gen aus TSWV-L3.

3.1.3 Nachweis und Quantifizierung der transgenen mRNA

Um einen Nachweis sowie einen Mengen-Vergleich der transgenen mRNA in den unterschiedlichen Linien zu ermöglichen, wurde diese mit den Methoden der RT-PCR (2.2.5.5), gemeinsam mit Aktin-Gen-mRNA als internem Standard, amplifiziert und die Intensitäten der resultierenden Banden nach der Gelelektrophorese (2.2.5.9) mit dem Computer ausgewertet (2.2.6.7). Es erfolgte je eine Probennahme von je zwei Pflanzen aller transgenen Linien im 3- und 7-Blatt Stadium. Im 3-Blatt Stadium wurden die Pflanzen als Ganzes aufgearbeitet, wohingegen im 7-Blatt Stadium jeweils das 1. und das 5. Blatt von oben getrennt untersucht wurden. Von jeder dieser Proben wurden je einmal 500 und einmal 100 ng Gesamt-RNA nach 2.2.5.1 für die Herstellung von cDNA (2.2.5.4) verwendet. Von jeder dieser cDNA-Proben wurden anschließend zwei parallele PCR-Ansätze hergestellt (2.2.5.5).

Um die Werte vergleichen zu können, wurden alle Proben gleichzeitig in die RT-PCR eingesetzt. Dazu wurde jeweils ein Reaktionsmix vorbereitet, aus dem alle Einzelreaktionen angesetzt wurden. Alle PCR-Reaktionsschritte wurden gleichzeitig in demselben Thermocycler durchgeführt. Für die Gelelektrophorese (2.2.5.9.1) wurden die Agarose-Gele parallel aus einem gemeinsamen Ansatz gegossen, um auch hier Unterschiede zu vermeiden.

Die Banden-Intensitäten wurden nach der Elektrophorese mit der unter 2.2.7 beschriebenen Software bestimmt. Die Intensitäten der N-Gen mRNA-Banden wurden auf die Intensitäten der Aktin-Gen mRNA-Banden der selben Probe bezogen. Die so erhaltenen relativen N-Gen mRNA-Mengen sind in **Abb. 4** durch die Längen der Blätter der schematisch dargestellten Pflanzen dargestellt.

Während die Linien XL 4.24, XL 7.1 und XL 8.28 kaum Unterschiede zwischen der N-Gen mRNA Konzentration im 3-Blatt Stadium und dem obersten Blatt des 7-Blatt Stadiums aufweisen, wurden für die Linien XL 14.1 und X 15.1 eine sehr deutliche Abnahme der mRNA-Konzentration vom 3- zum 7-Blatt Stadium festgestellt. Weisen diese beiden Linien im 3-Blatt Stadium noch ca. 5fach höhere mRNA Gehalte auf als die übrigen Linien, so ist im 7-Blatt Stadium nur noch die ca. 1,5fache Menge mRNA in den Pflanzen der Linie XL 14.1 im obersten Blatt im Vergleich zu den übrigen Linien zu finden. In den älteren Blättern (5. Blatt von oben) wurde in diesem Stadium stets eine geringere Konzentration transgener mRNA gefunden als in den jungen, obersten Blättern.

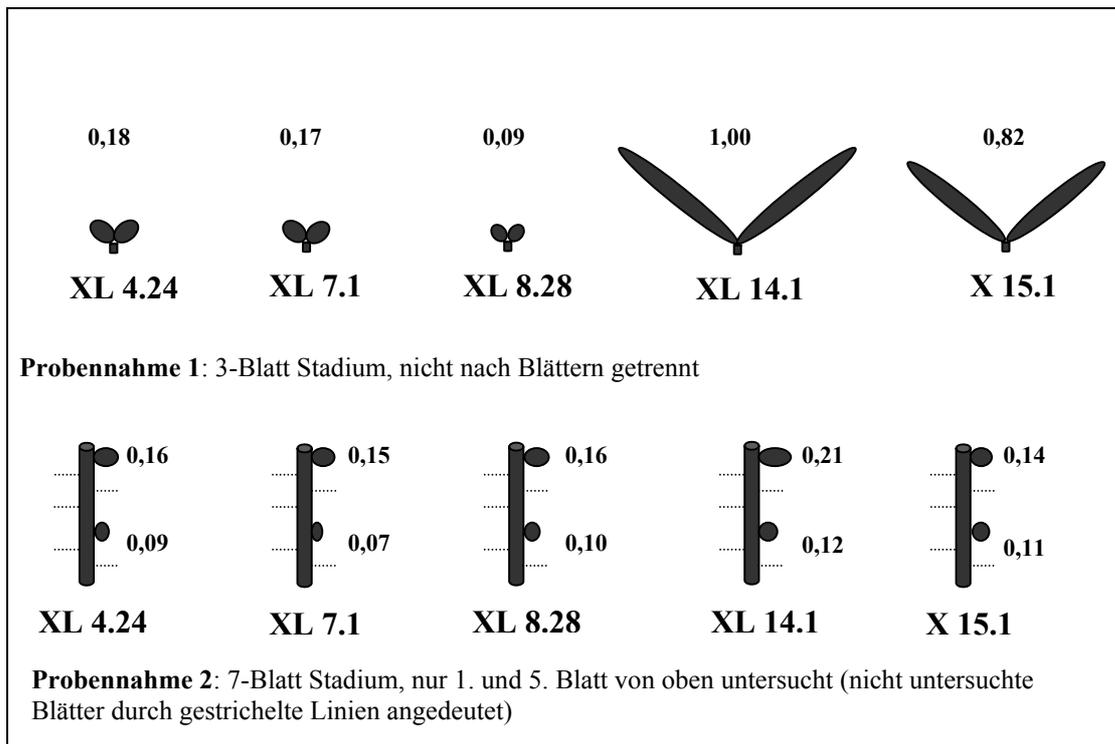


Abb. 4: Schematische Darstellung der Mengen transgener mRNA (N- bzw. XL-N-Gen) in verschiedenen Stadien der transgenen Linien XL 4.24, XL 7.1, XL 8.28, XL 14.1 und X 15.1. Das Verhältnis von transgener mRNA zu Aktin mRNA, bezogen auf den Wert für XL 14.1 (=1) bei Probennahme 1, ist durch die Längen der schematisch dargestellten Blätter der Pflanzen repräsentiert und als Zahlenwert angegeben. Alle Werte wurden durch RT-PCR und computergestützte Bild-Auswertung gewonnen. Gestrichelte Linien deuten Blätter an, die nicht getestet wurden. Angegeben sind die Mittelwerte aus je zwei Messungen.

3.1.4 Nachweis des Größenunterschiedes zwischen XL-N- und Wildtyp-N-mRNA

Es wurde geprüft, ob die Konstrukte mit und ohne Leader-Sequenz auch zur Transkription unterschiedlich großer mRNAs führen. Hierfür wurden die Linien XL 8.28, und XL 14.1 (beide beinhalten die Leader-Sequenz) sowie die Linie X 15.1 (ohne Leader-Sequenz) ausgewählt. RNA der nicht-transgenen Kontroll-Pflanzen wurde zusätzlich als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Je 8 µg Gesamt-RNA (2.2.5.1) aus 4 Wochen alten Pflanzen wurden durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (2.2.5.9) aufgetrennt. Die Detektion der transgenen mRNA im Northern Blot erfolgte nach 2.2.5.10. Als Sonde wurde DIG-markierte DNA (2.2.5.10), bestehend aus der durch die Primer TSWV-N-ATG und TSWV-N-Ende eingegrenzten Sequenz des TSWV N-Gens (2.1.4) verwendet.

Abb. 6 zeigt das Ergebnis der Detektion. Die Pflanzen der Linie X 15.1 (Konstrukt ohne Leader-Sequenz) transkribieren erwartungsgemäß eine kürzere rekombinante mRNA als die Pflanzen der Linien XL 8.28 und XL 14.1, die das Konstrukt mit Leader beinhalten. In den RNA-Extrakten aus Pflanzen der nicht-transgenen Kontrolle konnte keine rekombinante mRNA nachgewiesen werden.

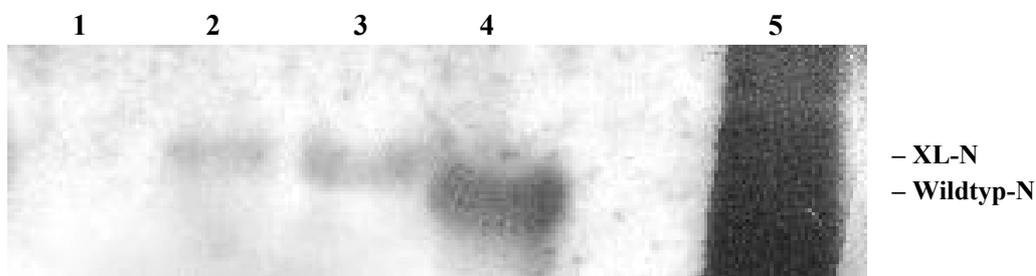


Abb. 6: Northern Blot von je 8 µg Gesamt-RNA. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten DNA-Sonde gegen das N-Gen aus TSWV-L3. Der Größenunterschied zwischen XL-N- und Wildtyp-N-mRNA (siehe Beschriftung rechts) ist deutlich erkennbar.

1=nicht-transgene Kontrolle, 2=XL 8.28, 3=XL 14.1, 4=X 15.1, 5=Positiv-Kontrolle (TSWV aus systemisch erkranktem Tabak)

3.1.5 Untersuchungen des rekombinanten Proteins

Die Expression des rekombinanten Proteins in den transgenen Linien wurde nach folgenden Gesichtspunkten untersucht:

- Verwendung der drei möglichen Start-Codons *in vivo* in den Linien XL 4.24, XL 7.1, XL 8.28 und XL 14.1
- Expression der Leader-Sequenz des XL-Konstruktes (Leader-Peptid) und dessen Lage innerhalb des rekombinanten Proteins im nativen Zustand
- Verteilung von rekombinatem Protein im Blatt
- Mengenbestimmung des rekombinanten Proteins in Pflanzen in Abhängigkeit von Blattetage und Pflanzenalter

3.1.5.1 Verwendung der Start-Codons für die Expression des rekombinanten Proteins in Pflanzen der verschiedenen Tabak-Linien

Die XL-N-Konstrukte verfügen nach **Tab. 1** in Abschnitt 3.1.1 über drei mögliche Start-Codons zur Initiierung der Translation, wodurch drei verschieden große rekombinante Proteine exprimiert werden könnten. Hierbei handelt es sich um die beiden Start-Codons im Bereich der Leader-Sequenz, die zur Expression von 35,7 kDa (große Fusion) bzw. 31,4 kDa (kleine Fusion) großen Proteinen führen würden sowie das Start-Codon des N-Gens, das die Expression eines 28,9 kDa großen Proteins bewirken würde. Letzteres wäre identisch mit dem nativen TSWV N-Protein.

Um festzustellen, welches dieser drei möglichen Start-Codons jeweils von den Pflanzen genutzt wird, wurden Proteinextrakte (2.2.6.1) gemeinsam mit einem Protein-Größenstandard auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen (2.2.6.3 und 2.2.6.4.1). Die rekombinanten N-Proteine wurden mit dem Antiserum AS-0580 (2.1.5) detektiert. Die Banden des Größenstandards wurden mit einer Coomassie-Brillantblau-Färbung sichtbar gemacht (2.2.6.4.3). Das Ergebnis zeigt **Abb. 6**.

Die Laufstrecken aller Größenstandards sowie der spezifisch detektierten XL-N- und Wildtyp-N-Protein Banden wurden ausgemessen und eine logarithmische Regressionskurve der Laufstrecken der Größenstandard-Banden mit den Molekulargewichten 45,0, 31,0, 21,5 und 14,4 kDa erstellt. Aus der Gleichung der sich ergebenden Regressionskurve und den Laufstrecken der Banden von XL-N- und Wildtyp-N-Protein konnten deren Molekulargewichte errechnet werden, sie sind in **Tab. 2** aufgeführt.

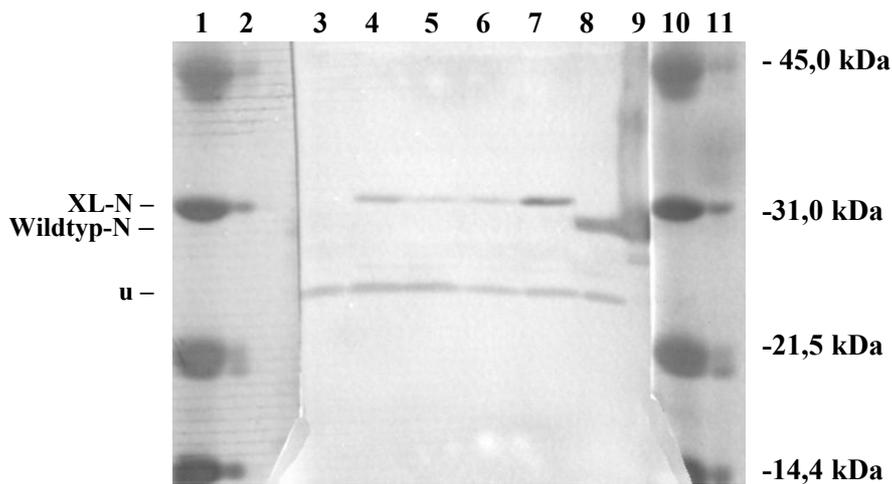


Abb. 6: Western Blot und Coomassie-Brillantblau-Färbung zur Größenbestimmung der rekombinanten N-Proteine in den transgenen Tabak-Linien. 1 und 2=Marker, 3=nicht-transgene Kontrolle, 4=XL 4.24, 5=XL 7.1, 6=XL 8.28, 7=XL 14.1, 8=X 15.1, 9=TSWV-L3 aus Tabak-Pflanze, 10 und 11=Marker. Die XL-N und Wildtyp-N Banden sind markiert. Die mit „u“ markierten Banden sind auf eine unspezifische Reaktion des Serums mit Pflanzensaft zurückzuführen und treten auch bei gesunden, nicht-transgenen Pflanzen auf (Bahn 3)

Tab. 2: Molekulargewichtsbestimmung von Fusionsprotein und Wildtyp-N-Protein nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Probe	Gemessenes Molekulargewicht der N-Protein Bande [kDa]	Demzufolge verwendetes Start-Codon
Linien XL 4.24, XL 7.1, XL 8.28 und XL 14.1	31,0	2. AUG im PPV-Leader (Pos. 147) ³
Linie X 15.1	28,8	AUG des TSWV N-Gens
Virales TSWV N-Protein ¹	28,8 ²	AUG des TSWV N-Gens

¹ Aus systemisch mit TSWV-L3 infizierter *N. tabacum* cv. Nevrokop Pflanze

² Theoretisch zu erwartendes Molekulargewicht von TSWV N-Protein: 28,9 kDa (Isolat L3, nach Maiss *et al.*, 1991)

³ Aus Aminosäuresequenz errechnetes Molekulargewicht: 31,4 kDa

Es zeigte sich, dass alle Linien mit dem XL-Konstrukt ein rekombinantes N-Protein mit einem Molekulargewicht von 31,0 kDa exprimieren. In diesen Linien wird folglich die „kleine Fusion“, beginnend mit dem 2. AUG-Codon der PPV-Leader-Sequenz, exprimiert. Dieses Protein wird im Folgenden als „XL-N-Protein“ bezeichnet. Das errechnete Molekulargewicht dieses Fusionsproteins beträgt 31,4 kDa. Das rekombinante N-Protein der Linie X 15.1, die keine Leader-Sequenz beinhaltet, unterscheidet sich in seiner Größe nicht von viralem N-Protein, hierfür wurde ein Molekulargewicht von 28,8 kDa bestimmt. Das aus der Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht des Proteins beträgt 28,9 kDa (Maiss *et al.*, 1991).

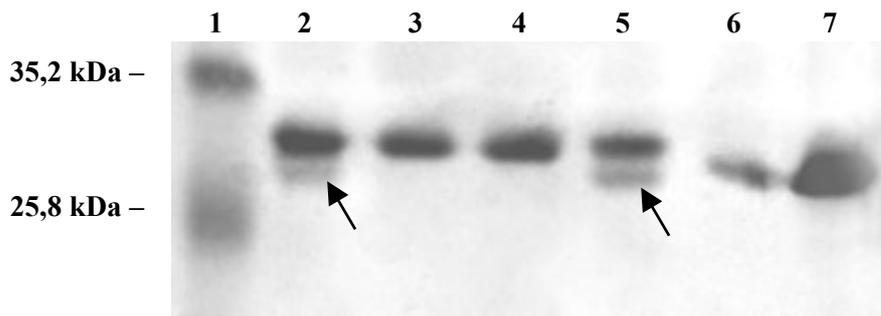


Abb. 7: Western Blot mit Proben aller transgenen Tabak-Linien, detektiert wurde mit Antiserum AS-0580 gegen TSWV N-Protein.

1=Marker, 2=XL 4.24, 3=XL 7.1, 4=XL 8.28, 5=XL 14.1, 6=X 15.1, 7=TSWV-L3 aus Tabak-Pflanze.

In den Bahnen 2 und 5 zeigen sich deutliche Doppelbanden. Die untere Bande (Pfeile) läuft dabei auf der Höhe der Wildtyp-N Bande in den Bahnen 6 und 7.

In einem Fall konnten bei den Tabak-Linien XL 4.24 und XL 14.1 auch Fusionsprodukt (XL-N) und Wildtyp-N-Protein in der gleichen Probe gefunden werden (**Abb. 7**). Doppelbanden aus Fusionsprodukt und Wildtyp N-Protein sind hier nur bei den Extrakten aus Pflanzen der Linien XL 4.24 und XL 14.1 erkennbar. Mit der unter 2.2.6.7 beschriebenen Computer Software wurden die ungefähren Anteile von XL-N- und Wildtyp-N-Protein an der Gesamtmenge detektierten N-Proteins errechnet und in **Tab. 3** aufgeführt. Das Wildtyp-N-Protein machte bei der Linie XL 4.24 20% und bei XL 14.1 30% der insgesamt gemessenen Menge rekombinanten Proteins aus. In den Pflanzen der Linie XL 7.1 und XL 8.28 wurde kein Wildtyp-N-Protein gefunden.

Tab. 3: Anteile von XL-N-Fusionsprotein und Wildtyp-N-Protein an der Gesamt N-Protein Menge in Blattmaterial der transgenen Linien. Die Anteile wurden aus dem Western Blot in **Abb. 7** mit der unter 2.2.7 beschriebenen Methode errechnet.

Tabak-Linie	rekombinantes Protein	Anteil [%]*
XL 4.24	XL-N	80
	Wildtyp-N	20
XL 7.1	XL-N	100
	Wildtyp-N	0
XL 8.28	XL-N	100
	Wildtyp-N	0
XL 14.1	XL-N	70
	Wildtyp-N	30
X 15.1	XL-N	0
	Wildtyp-N	100

* Anteil an Gesamt N-Protein (Summe aus XL-N und Wildtyp-N)

3.1.5.2 Nachweis des Leader-Peptids im nativen Zustand

Nachdem die Translation des Leader-Peptids bereits durch denaturierende Techniken im Western Blot gezeigt worden war (3.1.5.1), sollte nun auch die Detektierbarkeit dieses Peptids im nativen Zustand überprüft werden. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob das Leader-Peptid im Fusionsprotein nach außen zugänglich oder im Innern versteckt vorliegt.

Zu diesem Zweck wurde ein TAS-ELISA nach 2.2.6.6 durchgeführt. Blätter von Pflanzen aller Linien im 3-Blatt Stadium wurden in 20 Volumen Probenpuffer homogenisiert. N-Protein wurde in den Kavernen mit Hilfe eines Anti-TSWV-N Hühner-Serums gebunden und mit dem Antiserum AS-8349 detektiert, welches das Leader-Peptid erkennt (2.1.5). Die relativen XL-N-Protein Mengen sind in **Abb. 8** gezeigt.

Durch die in allen Proben von XL-Linien mögliche Detektion des Leaders im nativen Zustand wurde bewiesen, dass das resultierende Leader-Peptid aus dem rekombinanten XL-N-Protein herausragt, da nur so eine Detektion im nicht-denaturierten Zustand möglich ist. Zudem wurde auf diese Weise eine zweite, unabhängige, Bestätigung erbracht, dass der Leader-Anteil des XL-N-Konstruktes tatsächlich translatiert wird.

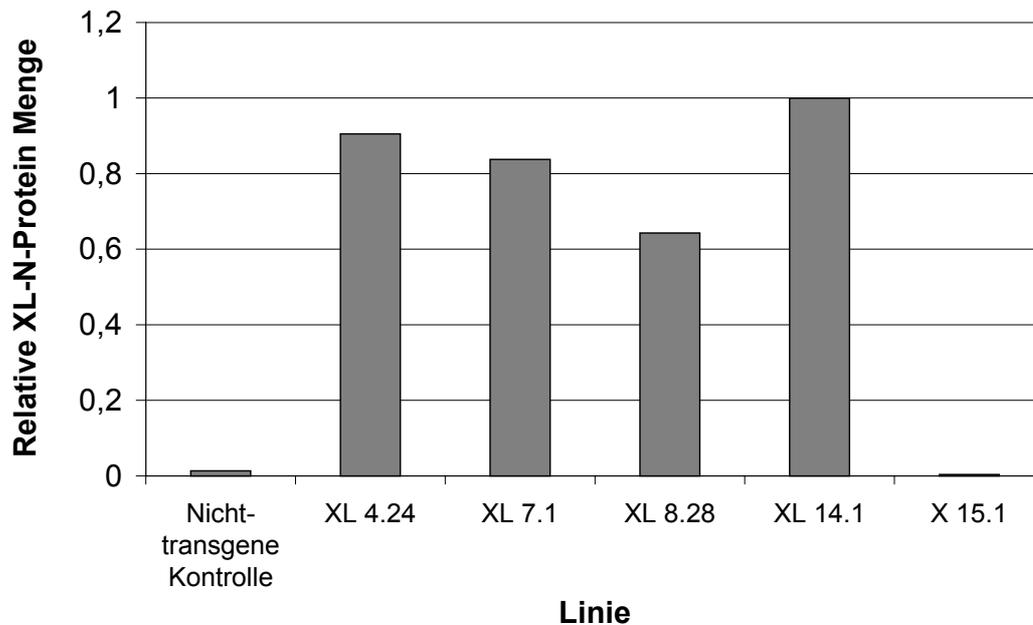


Abb. 8: Detektion des Leader-Peptid im nativen Zustand des rekombinanten XL-N-Proteins. Angegeben sind die relativen TAS-ELISA Werte, erhalten mit dem Antiserum 8349 gegen das Leader-Peptid, in Proben aus Pflanzen im 3-Blatt Stadium..

3.1.5.3 Verteilung von rekombinantem XL-N-Protein im Blatt

Es wurde untersucht, ob ein bestimmtes Verteilungsmuster von rekombinantem XL-N-Protein im Blattgewebe der Linien XL 4.24, XL 7.1, XL 8.28 und XL 14.1 vorliegt, oder ob dieses im gesamten Blattbereich in einheitlicher Menge zu finden ist. Würde das rekombinante Protein, möglicherweise durch einen Einfluss der Leader-Sequenz, nur in bestimmten Zelltypen und Geweben exprimiert werden, so hätte dies entscheidenden Einfluss auf die Möglichkeiten zur Interaktion des Proteins mit den replizierenden Viren und damit auf den Resistenzmechanismus.

Nach 2.2.6.5 wurden Gewebe-Abdrücke von Blattmaterial angefertigt. Hierzu wurden junge Pflanzen im 4-Blatt-Stadium ausgewählt, da in diesem Stadium rekombinantes Protein noch in allen Linien in gut detektierbarer Menge enthalten ist (vergl. 3.1.5.4).

Transgenes Fusionsprotein wurde mit Hilfe des Antiserum AS-8349 detektiert, welches das Leader-Peptid erkennt (2.1.5). Durch Inkubation mit dem Konjugat "anti-Kaninchen-Alkalische Phosphatase" (Sigma) und Färbung mit FastRed-Lösung (2.2.6.5) wurden die XL-N-Proteine auf den Gewebe-Abdrücken sichtbar gemacht. Sie sind als rötliche Färbung auf den Membranen in **Abb. 9** erkennbar.

In der nicht-transgenen Kontrolle sowie im Blatt der Linie X 15.1, die nur Wildtyp N-Protein exprimiert, zeigt das Serum AS-8349 erwartungsgemäß keine Reaktion. In den Linien XL 4.24, XL 7.1 und XL 8.28 zeigt sich eine einheitliche Rotfärbung im gesamten Blattgewebe. Das rekombinante Protein ist also in allen XL-Linien im gesamten Blattgewebe in einheitlichen Mengen vorhanden und zeigt keine Gewebespezifität.

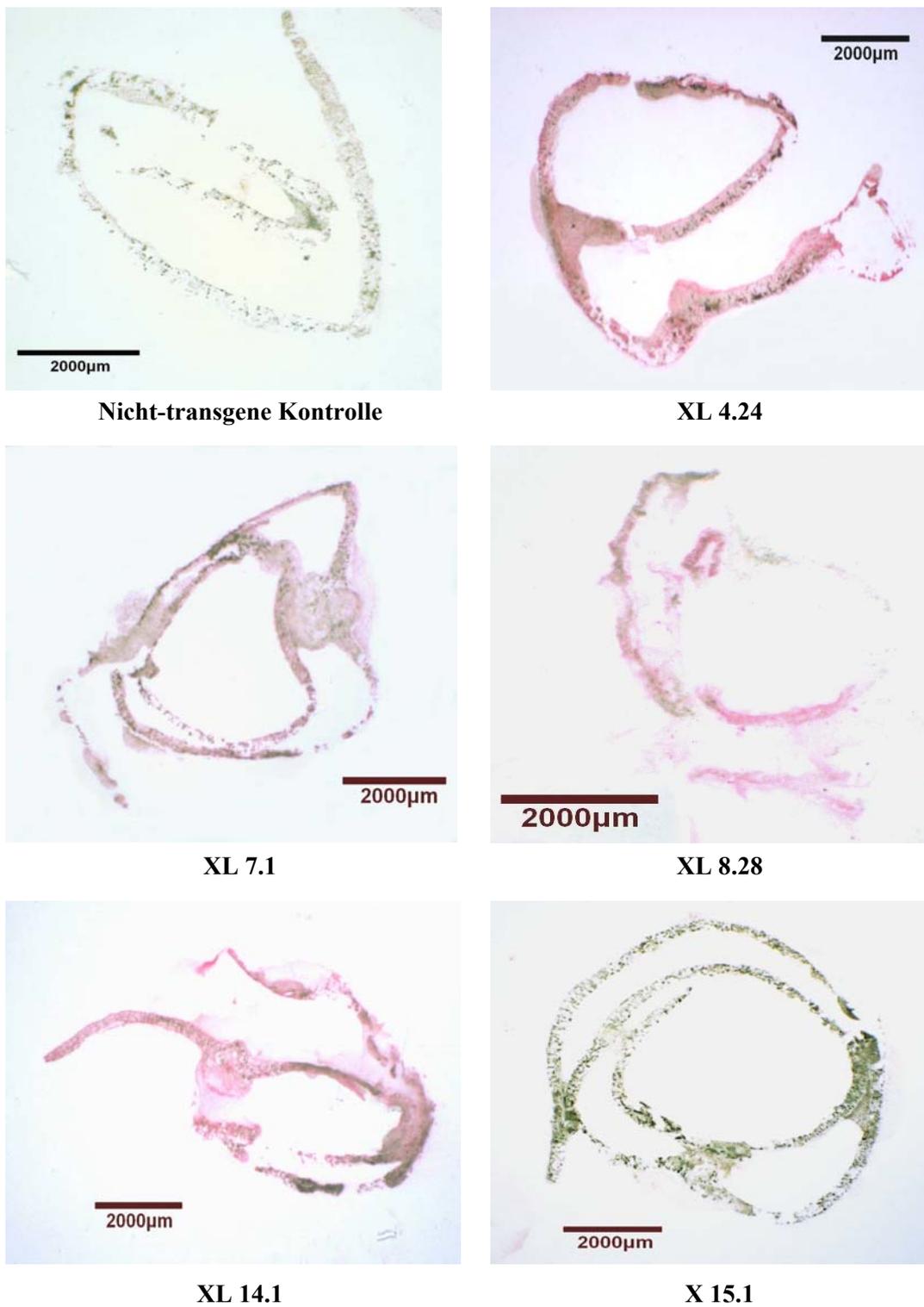


Abb. 9: Verteilung von XL-N-Protein in den Geweben der transgenen Linien. Gezeigt sind Querschnitte von Blättern der transgenen Tabak-Linien sowie der nicht-transgenen Kontrolle im 4-Blatt-Stadium, die auf Nitrocellulose-Membranen übertragen und mit Antiserum 8349 gegen XL-N Protein detektiert wurden (rote Flächen).

3.1.5.4 Mengenbestimmung des rekombinanten N-Proteins in Pflanzen in Abhängigkeit von Blattetage und Pflanzenalter

Die Konzentration von rekombinatem N-Protein (XL-N bzw. Wildtyp-N) im Blatt in Abhängigkeit von Blattetage und Alter der Pflanze sollte mit dem Ziel untersucht werden, eine mögliche Korrelation zwischen der Menge rekombinanten Proteins und der Qualität der Resistenz der verschiedenen Linien herauszufinden.

Hierzu wurden Pflanzen aller Linien im Gewächshaus kultiviert. Probennahmen von je zwei Individuen erfolgten im 2, 4, 7, 10 und 12 bis 14-Blatt-Stadium. Gewebeproben aus allen Blatttagen wurden in je 5 Volumen Probenpuffer (2.2.6.1) homogenisiert und der Proteingehalt nach 2.2.6.2 bestimmt. Je 20 µg Gesamt-Protein wurden nach 2.2.6.3 für die SDS-Gelelektrophorese vorbereitet und auf 12,5%igen PAA-Gelen, zusammen mit jeweils drei Verdünnungsstufen (0,34 µg, 0,25 µg und 0,17 µg Protein) einer N-Protein Reinigung (2.2.4.3) als Mengen-Standard, aufgetrennt (2.2.6.3).

Die Proteine wurden anschließend auf PVDF-Membranen transferiert und die N-Proteine mit Hilfe des Antiserums AS-0580 (2.1.5) nach 2.2.6.4 detektiert. Die Messungen der Signal-Intensitäten und die daraus folgende Berechnung der Proteinmengen wurde mit der unter 2.2.6.7 beschriebenen Computer-Software durchgeführt.

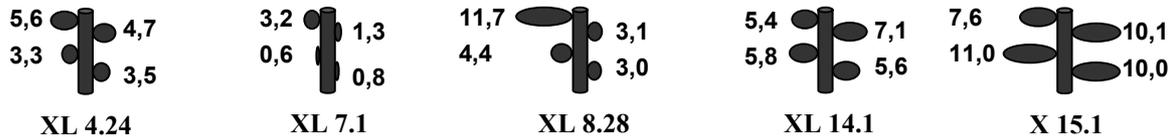
Die Ergebnisse sind in **Abb. 10** schematisch dargestellt. Die Konzentration des rekombinanten N-Proteins, bezogen auf den Gesamt-Protein Gehalt, ist dabei jeweils durch die Längen der schematisch dargestellten Blätter der jeweiligen Blattetage repräsentiert. Es handelt sich dabei um Mittelwerte aus je zwei Pflanzen. Die Abweichungen der einzelnen Messwerte von den Mittelwerten lag im Mittel bei 30 %.

Ein Vergleich der 5 transgenen Tabak-Linien ergibt folgendes Bild: Die Linie X 15.1, die das Konstrukt ohne Leader-Sequenz beinhaltet, weist zu allen Zeitpunkten die höchsten Konzentrationen an rekombinatem N-Protein auf. Zum Zeitpunkt der ersten Probennahme sind die Unterschiede zwischen den Pflanzenlinien noch nicht so ausgeprägt wie in späteren Messungen. Die Linien XL 4.24 und XL 7.1 zeigen eine besonders rasche Abnahme der Gehalte an rekombinatem Protein, während die Messwerte für die Linie XL 8.28 vom 2- zum 4-Blatt Stadium noch ansteigen und erst im späteren Verlauf wieder abnehmen.

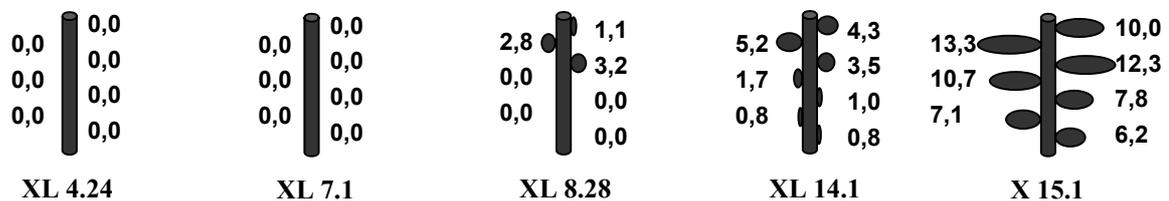
Bei der Betrachtung der verschiedenen Blatttagen jeweils einer Probennahme zeigt sich ebenfalls die abnehmende Konzentration des rekombinanten Proteins von jungen (oberen) zu alten (unteren) Blättern, wobei das Maximum allerdings meist nicht in der obersten Blattetage, sondern in der 2. oder 3. Etage von oben zu finden ist.



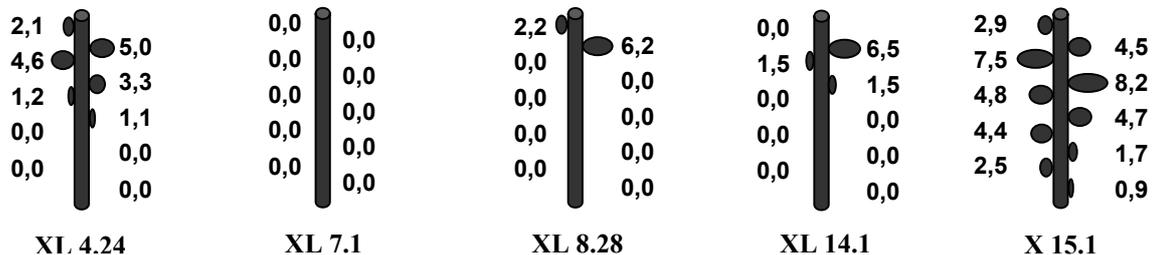
Probennahme 1: 2-Blatt Stadium, Pflanzen ca. 0,5 cm hoch. Für diese erste Probennahme wurde noch nicht nach Blättern differenziert, sondern jeweils die ganze Pflanze als eine Probe behandelt.



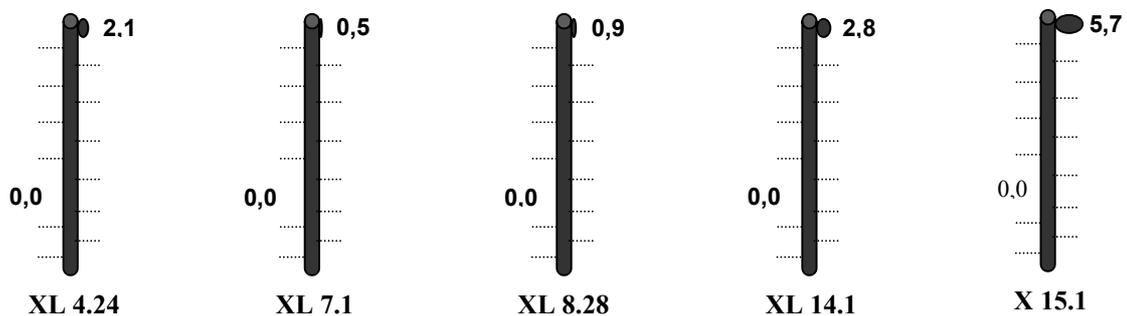
Probennahme 2: 4-Blatt Stadium, Pflanzen ca. 0,75 cm hoch.



Probennahme 3: 7-Blatt Stadium, Pflanzen ca. 3 cm hoch.



Probennahme 4: 10-Blatt Stadium, Pflanzen ca. 5-7 cm hoch.



Probennahme 5: 12- bis 14-Blatt Stadium, Pflanzen ca. 16-20 cm hoch. Nur das 1. und 10. Blatt jeder Pflanze wurde aufgearbeitet. Nicht beprobte Blätter durch Strichlinien angedeutet.

Abb. 10: Schematische Darstellung der Konzentration von rekombinantem Protein (N bzw. XL-N) in den Blättern der transgenen Tabak-Linien in verschiedenen Stadien. Die Länge der Blätter der schematisch dargestellten Pflanzen repräsentiert die Konzentration rekombinanten Proteins (Mittelwert zweier Probennahmen von zwei verschiedenen Pflanzen). Die Messwerte (in μg N-Protein pro mg Gesamtprotein) sind zusätzlich angegeben. Alle Werte wurden durch Western Blot Analysen und computergestützter Bild-Auswertung erhalten.

3.2 Bildung von Nukleoproteinkomplexen aus rekombinantem Protein und viraler RNA

Es wurde untersucht, ob rekombinantes XL-N-Protein mit viraler RNA Komplexe (Nukleoproteinkomplexe, vergl. 1.2) bilden kann. Nur durch Bildung solcher heterologen Komplexe könnte das rekombinante Protein Einfluss nehmen auf die Interaktion der viralen RNA mit anderen Proteinen, etwa der viralen Replikase oder dem Transportprotein NSm.

Um genug Material für diese Untersuchungen zur Verfügung zu haben, wurden die transgenen Pflanzen mit dem als besonders virulent bekannten TSWV-Isolat DH37 (2.1.2) inokuliert, das auf Pflanzen der transgenen Linien häufiger zu systemischen Symptomen führte als das Isolat TSWV-L3 (3.3.2.1). Systemische Symptome zeigende Blätter von Pflanzen der Linien XL 4.24, XL 8.28, XL 14.1 und X 15.1 wurden geerntet und Nukleoproteinkomplexe hieraus nach 2.2.4.3 gereinigt. Pflanzen der Linie XL 7.1 wurden nicht verwendet, da hier keine Symptome auftraten. Mit dem Material der Linie XL 14.1 wurde zudem eine Virus-Partikel Reinigung durchgeführt (2.2.4.1), um aufklären zu können, ob das transgene N-Protein auch in Virus-Partikel von TSWV verpackt wird.

Die Nukleoprotein bzw. Partikel Fraktionen wurden nach 2.2.6.4 im Western Blot analysiert. Zur Detektion der N-Proteine wurde das polyklonale Antiserum AS-0580 (2.1.5) eingesetzt. Das Ergebnis zeigt **Abb. 11**. Deutlich ist in allen Bahnen das virale N-Protein zu erkennen (28,9 kDa). Das Fusionsprotein XL-N (31,4 kDa) ist in den Nukleoprotein-Reinigungen aus den Linien XL 4.24 und XL 8.28 schwach, in der Nukleoprotein-Reinigung aus XL 14.1 sowie der Virus-Partikel-Reinigung aus dieser Linie deutlich als zweite Bande über der Bande des viralen N-Proteins erkennbar. Die Linie X 15.1 zeigt diese zusätzliche Bande erwartungsgemäß nicht, da diese nur das Wildtyp-N-Protein exprimiert.

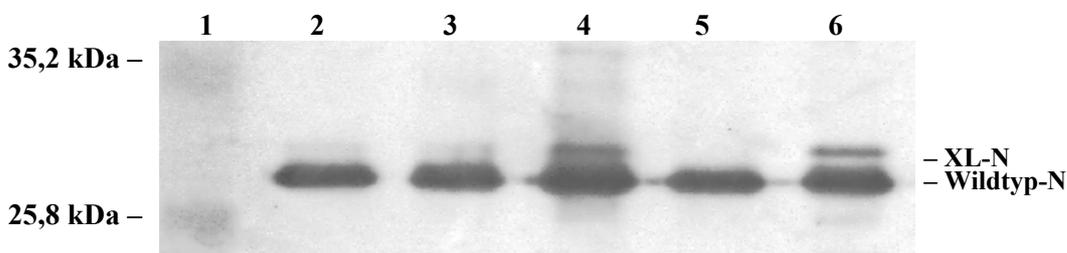


Abb. 11: Bildung heterologer Nukleoproteinkomplexe in transgenen Tabak-Linien bei Inokulation mit TSWV-DH37. Western Blot mit Nukleoprotein- bzw. Partikel-Reinigungen, detektiert mit Serum AS-0580 gegen TSWV N-Protein. 1=Marker, 2 bis 5=Nukleoproteinreinigungen (2=XL 4.24, 3=XL 8.28, 4=XL 14.1, 5=X 15.1), 6=Partikel Reinigung aus XL 14.1. Die XL-N und Wildtyp-N Banden sind gekennzeichnet.

Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass rekombinantes N-Protein virale RNA binden kann und mit dieser in den transgenen Tabak-Linien auch in Virus-Partikel verpackt wird.

Mit der unter 2.2.6.7 beschriebenen Computer-Software wurden die Intensitäten der Banden quantifiziert und so der Anteil von XL-N-Protein an Gesamt N-Protein in Nukleoproteinkomplexen und Virus-Partikeln errechnet. Diese Daten sind in **Tab. 4** aufgeführt.

Tab. 4: Anteil von rekombinantem XL-N-Protein an der Gesamt N-Protein Menge in Nukleoprotein- und Viruspartikel-Reinigungen aus den transgenen Linien

Probe	Anteil von XL-N an der Gesamt-N-Protein[†] Menge
XL 4.24 Nukleoprotein	9 %
XL 8.28 Nukleoprotein	10 %
XL 14.1 Nukleoprotein	21 %
X 15.1 Nukleoprotein	0 %
XL 14.1 Virus-Partikel	21 %

[†]Gemeint ist die Summe aus Wildtyp-N- und XL-N-Protein

Der Anteil des XL-N-Fusionsproteins an der Gesamt-N-Protein Menge in Nukleoproteinkomplexen und Virus-Partikeln liegt zwischen 9% und 21% und zeigt damit eine Korrelation zu den XL-N-Protein Konzentrationen in den Blättern der verschiedenen Linien (3.1.5.4). Am Beispiel der Linie XL 14.1 konnte auch gezeigt werden, dass dieser Anteil in Partikeln und Nukleoproteinkomplexen gleich ist.

Zum Vergleich wurden die XL-N- und Wildtyp-N-Protein Mengen im Blatt systemisch infizierter transgener Pflanzen ebenfalls durch Western Blot und Computerauswertung (wie oben) bestimmt und in **Tab. 5** aufgeführt.

Tab. 5: Vergleich von XL-N- und Wildtyp-N-Protein Mengen in systemisch infizierten transgenen Pflanzen

Linie	Anteil XL-N-Protein an Gesamt N-Protein Menge im erkrankten transgenen Blatt[*]
XL. 4.24	2,3 %
XL 14.1	6,2 %

^{*}Die XL-N-Protein Menge wurde auf die Summe aus XL-N- und N-Protein bezogen.

Im systemisch erkrankten Blatt einer transgenen Pflanze hat das rekombinante N-Protein also einen Anteil am Gesamt-N-Protein zwischen etwa 2 % und 6 % in den Linien XL 4.24 bzw. XL 14.1. Dies ist geringer als der Anteil des rekombinanten Proteins in den aus den Pflanzen dieser Linien gereinigten Nukleoproteinkomplexen (*Tab. 4*). Auf die Bedeutung dieser Messwerte wird in der Diskussion (Abschnitt 4) näher eingegangen.

3.3 Replikation und Ausbreitung von Tospoviren in transgenen und nicht-transgenen Pflanzenlinien

Die Replikation von Tospoviren sowie deren Ausbreitung in Pflanzen der transgenen Linien wurde untersucht. Diese Experimente, die in den folgenden Abschnitten vorgestellt werden, gliederten sich in zwei Teilbereiche mit je zwei Schwerpunkten:

- frühe Phasen von viraler Replikation und Zell-zu-Zell-Transport in:
 - isolierten Zellen
 - Gewebeverbänden
- Etablierung von Infektionen mit Tospoviren in Pflanzen der transgenen Linien:
 - Infizierbarkeit mit verschiedenen Tospoviren und in verschiedenen Stadien
 - Ferntransport durch das Leitgefäßsystem

3.3.1 Untersuchung früher Replikationsphasen in isolierten Zellen (Protoplasten) und isolierten Gewebeverbänden (Blattscheiben bzw. -streifen)

Mit der Untersuchung früher Replikationsphasen (0-72 hpi), sollte geklärt werden, ob in Pflanzen einiger oder aller transgenen Linien eine Verzögerung der Replikation von Tospoviren im Vergleich zur nicht-transgenen Kontrolle auftritt. Dies wurde sowohl mit Hilfe von isolierten Einzelzellen (Protoplasten), als auch in Gewebeverbänden untersucht.

3.3.1.1 Frühe Replikationsphasen in Protoplasten

Protoplasten bieten die Möglichkeit viele Zellen zeitgleich zu inokulieren, um so den Verlauf der viralen Replikation zu verfolgen. Da keine Verbindungen zwischen den zellwandlosen Zellen bestehen, haben Transportvorgängen in diesem System keine Bedeutung.

Für die Experimente wurde die transgene Linie XL 7.1 ausgewählt, da diese eine besonders stark ausgeprägte Resistenz gegen Inokulation mit TSWV zeigte (3.3.2.1).

Protoplasten dieser Linie sowie der nicht-transgenen Kontrolle wurden nach 2.2.3 gewonnen und Aliquots von je 5×10^5 Zellen nach 2.2.3 mit einer Menge von 15 μg Gesamt-Protein (2.2.6.2) einer Virus-Partikel Reinigung von TSWV-L3 (2.1.2) inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 21°C und

einem Hell/Dunkel-Zyklus von 16/8h über 3 Tage. Von jeder Linie (XL 7.1 bzw. nicht-transgene Kontrolle) wurden je zwei Ansätze sofort nach der Inokulation, und je zwei Ansätze nach 24, 48 und 72 h Inkubation entnommen. Das Ernten der Zellen erfolgte durch Zentrifugation in Fällungsmedium nach 2.2.4.6. Die sedimentierten Zellen wurden direkt in je 1ml TriFast-Reagenz aufgenommen, homogenisiert und die Proteinfraction ausgefällt (2.2.6.1). Die ausgefällten Proteine wurden in je 50µl 2×Probenpuffer für die SDS-PAGE (2.2.6.3) gelöst, wovon jeweils 15µl auf 12,5 %igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt wurden. Dies entsprach einer Menge von ca. $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Auftrag.

Die aufgetrennten Proteine wurden nach 2.2.6.4.1 auf PVDF-Membranen übertragen. Es schloss sich die unter 2.2.6.4 beschriebene Western Blot-Analyse an. Detektiert wurde nach 2.2.6.4.2 mit dem Antiserum AS-338 (2.1.5), das das Nicht-Struktur-Protein NSs erkennt. Das Ergebnis eines Protoplasten-Versuches mit der Linie XL 7.1 und der nicht-transgenen Kontrolle ist in **Abb. 12** gezeigt. Die von Antiserum AS-338 detektierten deutlichen Doppelbanden treten 24 h nach Inokulation mit TSWV erstmalig auf. Da diese Banden bei entsprechender Inkubation von nicht-inokulierten Protoplasten nie beobachtet wurden, ist ihr Auftreten mit der Replikation von TSWV in den Zellen korreliert. Diesen Banden konnten Molekulargewichte von 42,8 kDa für die obere, und 40,0 kDa für die untere Bande zugeordnet werden. Das theoretisch zu erwartende Molekulargewicht des NSs-Proteins liegt bei 52,4 kDa. Eine schwache Bande bei 51,6 kDa, die ebenfalls erst ab 24 hpi auftritt, könnte diesem entsprechen. Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Molekulargewichte wird in Abschnitt 4 diskutiert.

Die Banden auf den Western Blots in **Abb. 12** wurden mit der unter 2.2.7 beschriebenen Computer-Software quantifiziert. Dabei wurden jeweils die Intensitäten der beiden Banden bei 42,8 kDa und 40 kDa summiert. Aus den beiden Parallelproben eines jeden Probenahme-Zeitpunktes wurden die Mittelwerte errechnet. Die Standardabweichungen lagen zwischen 2 und 19 % vom Mittelwert, in einem Falle aber bei 41 %. Um die Zunahme der Intensitäten vergleichen zu können, wurden diese auf den jeweiligen Messwert bei 72 hpi bezogen.

Die so standardisierten Ergebnisse sind in **Abb. 13** gezeigt. Es ergab sich eine langsamere Zunahme der NSs-Mengen, und demnach eine verlangsamte Replikation, in den Protoplasten der transgenen Linie XL 7.1 im Vergleich zur nicht-transgenen Kontrolle.

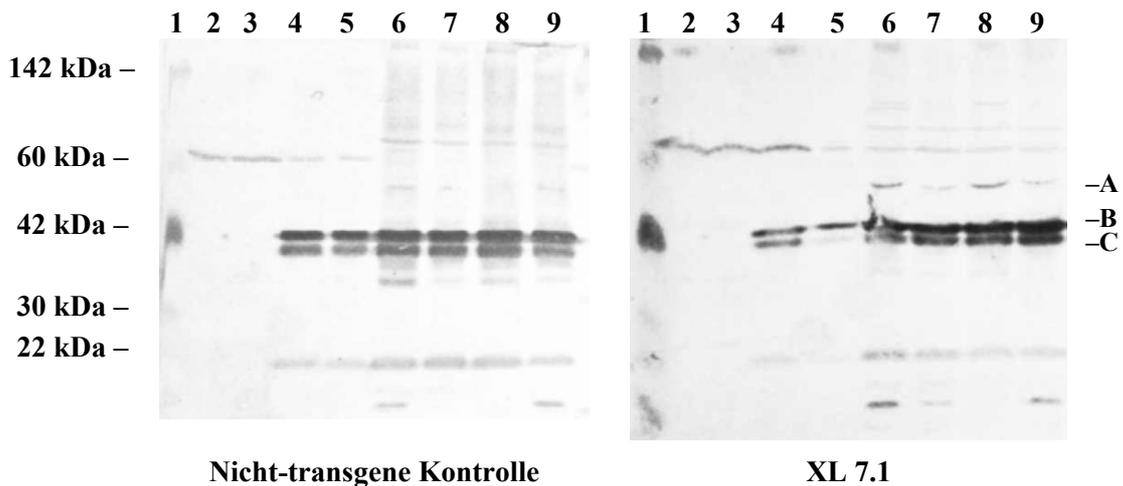


Abb. 12: Inokulation von Protoplasten mit TSWV-L3. Zellen aus nicht-transgener Kontrolle und XL 7.1 wurden gleichzeitig mit frischer Virus-Partikel Reinigung inokuliert und über einen Zeitraum von 72 hpi inkubiert. Je zwei parallele Ansätze wurden zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 hpi entnommen. Proteinextrakte aus diesen Zellen wurden im Western Blot mit dem Serum AS-338 gegen TSWV NSs-Protein detektiert. Die deutlich sichtbaren Doppelbanden (Markierungen B=42,8 kDa und C=40,0 kDa) treten erst ab 24 hpi auf und werden daher auf NSs und damit auf eine erfolgreiche Replikation der Viren zurückgeführt. Die erwartete Größe des NSs-Proteins liegt allerdings bei 52,4 kDa, dies stimmt mit den schwachen Banden überein, auf die die Markierung A zeigt (errechnetes Molekulargewicht: 51,6 kDa). 1=Marker, 2/3=Nullwert (0 hpi), 4/5=24 hpi, 6/7=48 hpi, 8/9=72 hpi.

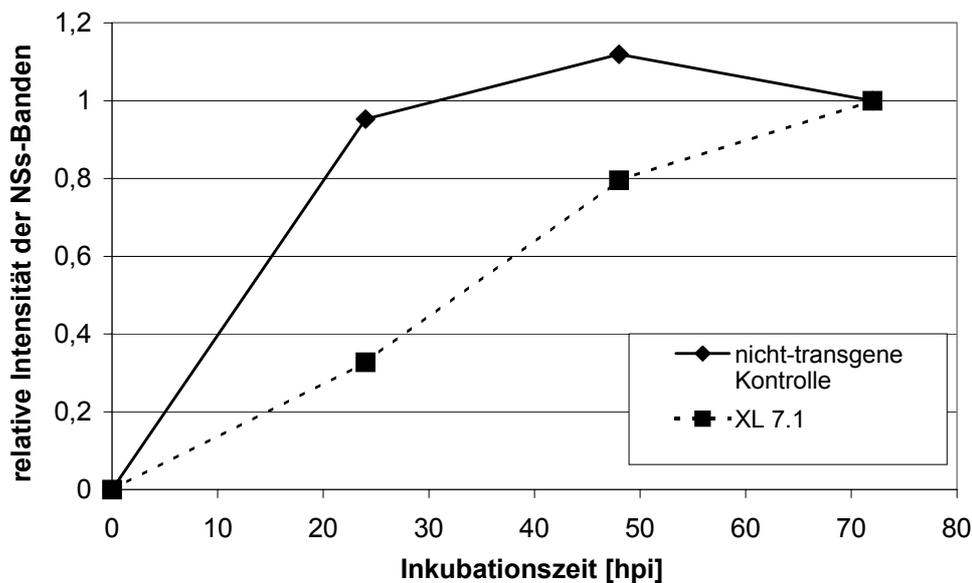


Abb. 13: Quantifizierung der NSs-Banden aus den Western Blot Analysen der Protoplasten-Versuche mit nicht-transgener Kontrolle und Linie XL 7.1 in **Abb. 12**. Die Intensitäten der Doppelbanden bei 42,8 und 40,0 kDa wurden am Computer errechnet, die Mittelwerte aus je zwei Parallelmessungen bestimmt und diese auf den Wert bei 72 hpi bezogen, um die Zunahmen der Messwerte beider Reihen vergleichen zu können.

3.3.1.2 Frühe Replikationsphasen in 1 cm² großen Blattscheiben

Protoplasten bieten zwar die Möglichkeit, isolierte Zellen synchron zu inokulieren, stellen aber zugleich ein hochgradig artifizielles System dar, aus dem nicht unbedingt Rückschlüsse auf die Verhältnisse in Zellen im intakten Gewebeverband gezogen werden können. Die frühen Phasen der Replikation wurden daher auch in Zellen untersucht, die im natürlichen Gewebeverband belassen wurden.

Für diese Versuche wurden Pflanzen aus *in vitro*-Kultur verwendet. Von allen Linien wurden 1x1cm große Blattscheiben ausgeschnitten und nach 2.2.4.5 mit TSWV-L3 inokuliert. Durch die flächendeckende Art der Inokulation mit hoch konzentrierter Virus-Partikel Reinigung wurde eine gleichmäßige Inokulation des gesamten Blattgewebes erreicht. Dies konnte durch Tissue Print Immunoblots (2.2.6.5) überprüft werden (nicht gezeigt). Daher geben die mit diesem System gewonnenen Ergebnisse ebenso wie die Versuche mit Protoplasten vor allem Aufschluss über Replikationsereignisse in direkt inokulierten Zellen.

Zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 hpi wurden jeweils 2 Blattscheiben jeder Linie entnommen. Jeweils 2 nicht-inokulierte, jedoch ebenfalls oberflächlich verletzte, Blattscheiben wurden als Kontrollen eingesetzt und getrennt von den inokulierten Blattscheiben inkubiert, sie wurden zu den Zeitpunkten 0 h und 72 h entnommen.

Die Proteinfraction aus allen Blattscheiben wurde nach 2.2.6.1 gereinigt und im Western-Blot-Verfahren analysiert (2.2.6.4). Zur Detektion wurde, wie bei den Versuchen mit Protoplasten, das Serum AS-338 gegen NSs-Protein eingesetzt.

Abb. 14 zeigt beispielhaft zwei dieser Western Blots. Es handelt sich dabei um eine nicht-transgene Kontrolle und die transgene Linie X 15.1, die das Wildtyp-N Protein exprimiert. Hier ergaben sich besonders deutlich sichtbare Unterschiede.

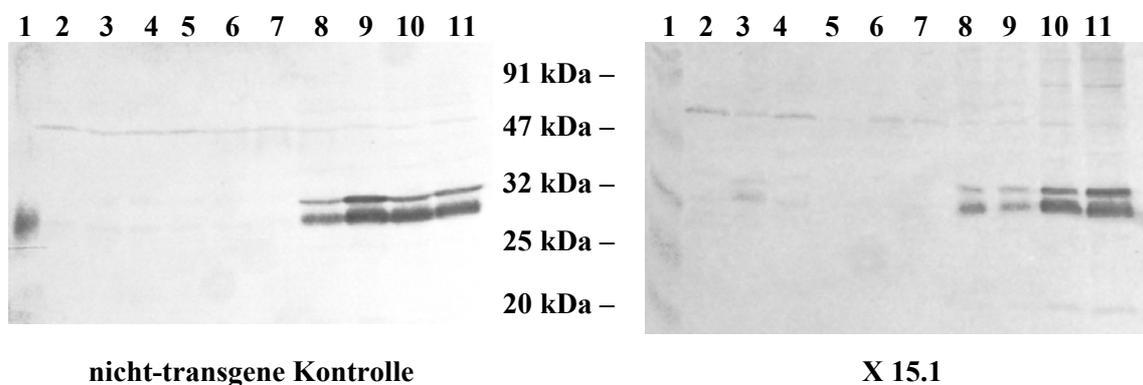


Abb. 14: Western Blots eines Versuches zur Inokulation von 1 cm² großen Blattscheiben mit TSWV-L3. Die Detektion erfolgte mit Antiserum AS-338. Gezeigt sind die nicht-transgene Kontrolle und die transgene Linie X 15.1, die hier eine besonders deutliche Verzögerung bei 24 hpi in beiden Parallelen zeigt.

1=Marker, 2 und 3=nicht inokuliert (2=0 h, 3=72 h), alle anderen sind inokuliert:

4/5=0 hpi, 6/7=24 hpi, 8/9=48 hpi, 10/11=72 hpi

Ab 48 hpi tritt auf den Western Blots in **Abb. 14** bei beiden Pflanzen-Linien die bereits unter 3.3.1.2 beschriebene Doppelbande des NSs-Proteins auf. Die Intensitäten aller Banden wurden, wie bereits bei der Auswertung der Protoplasten-Experimente beschrieben, mit der unter 2.2.7 erläuterten Computer-Software bestimmt. Berechnung und Standardisierung der Intensitäten der NSs-Banden erfolgte wie unter 3.3.1.1. Das Ergebnis eines Experiments mit allen Linien ist in **Abb. 15** gezeigt. Die Zunahme der NSs-Mengen in den Blattscheiben der Linie XL 14.1 wies keinen Unterschied zur nicht-transgenen Kontrolle auf. In den Blattscheiben der Linien XL 4.24, XL 7.1 und XL 8.28 nahm die NSs-Menge geringfügig langsamer zu als in der nicht-transgenen Kontrolle. Eine gegenüber der nicht-transgenen Kontrolle deutlich langsamere Zunahme an NSs-Protein zeigten hingegen die Blattscheiben der Linie X 15.1.

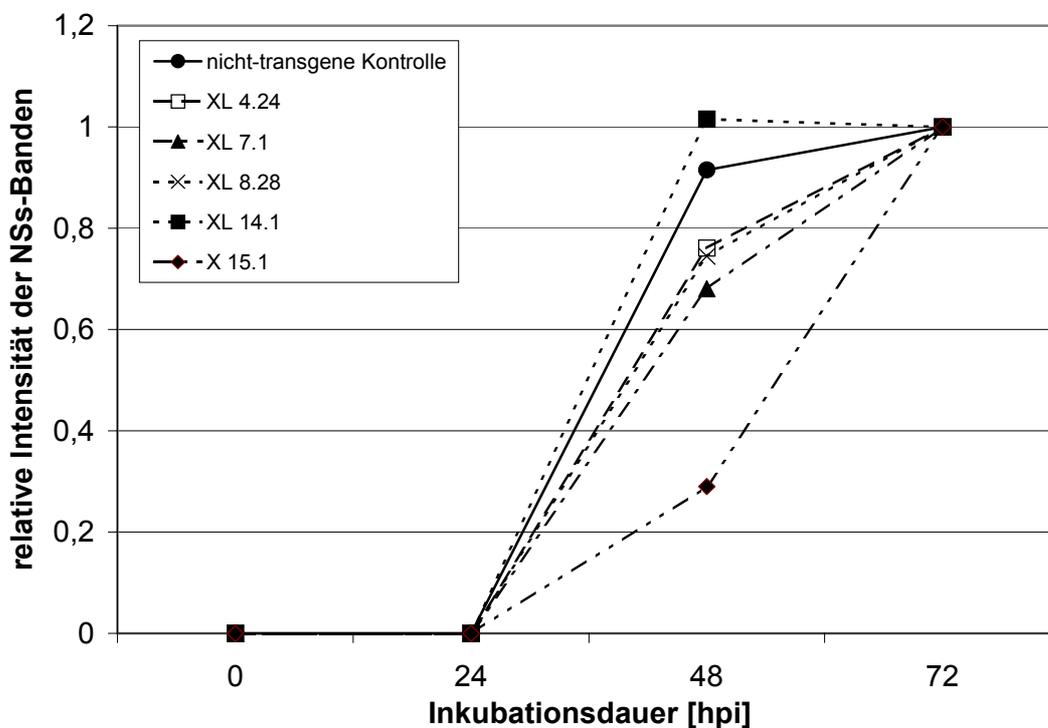


Abb. 15: Quantifizierung der NSs-Banden aus den Western Blot Analysen zur Inokulation von 1 cm² großen Blattscheiben von Pflanzen aller Linien. Die Intensitäten der Doppelbanden bei 42,8 und 40,0 kDa wurden am Computer errechnet und summiert. Es wurden die Mittelwerte aus je zwei Parallelmessungen bestimmt und auf den Wert bei 72 hpi bezogen, um die Zunahmen der Intensitäten vergleichen zu können.

3.3.1.3 Frühe Replikationsphasen in 4 × 1 cm großen Blattstreifen (Untersuchung der Ausbreitung im Blatt)

Nachdem in den vorhergehenden Experimenten die virale Aktivität (Replikation bzw. Translation) in direkt inokulierten Zellen und Zellverbänden im Mittelpunkt der Betrachtungen gestanden hatte, sollte nun die Ausbreitung von TSWV im Blatt, also die Bewegung von Zelle zu Zelle untersucht werden.

Für die Untersuchungen wurden die Linien XL 7.1, X 15.1 sowie die nicht-transgene Kontrolle ausgewählt. Die Durchführung der Experimente ist, im Hinblick auf das Pflanzenmaterial, das Inokulum sowie die Art der Inokulation, identisch mit der unter 3.3.1.2 beschriebenen Vorgehensweise. Der einzige Unterschied lag in der Größe der Blattstreifen sowie der inokulierten Fläche. Es wurden diesmal rechteckige Blattstreifen parallel zur Mittelrippe mit 4 cm Länge und 1 cm Breite ausgeschnitten, die Mittelrippe selbst wurde dabei stets entfernt. Mit Hilfe einer Schablone wurden diese Blattstreifen so verdeckt, dass nur eine Fläche von 1 cm² an einem Ende des Rechteckes frei lag. Diese wurde nach 2.2.4.5 flächendeckend mit TSWV-L3 inokuliert. Es wurden je zwei Parallelproben nach 0, 24, 48 und 72 hpi entnommen und in je 4 Abschnitte zu je 1 cm² zerlegt (*Abb. 16*).

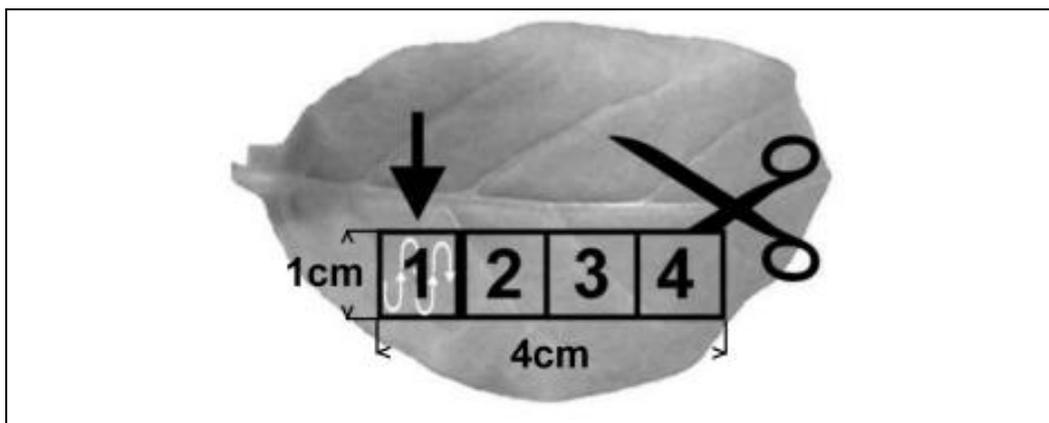


Abb. 16: Maßstabsgetreue Darstellung der Gewinnung und Bezeichnung des Blattmaterials für die Untersuchungen zur viralen Migration durch 4 x 1 cm große Blattstreifen. Gezeigt sind die Dimensionen des gesamten Blattstreifens sowie die Aufteilung in 4 Abschnitte zum Zeitpunkt der Probennahme. Inokuliert wurde jeweils nur der Abschnitt 1 (Pfeil). Die restlichen Abschnitte wurden durch eine Schablone verdeckt.

Nicht-inokulierte, aber ebenfalls oberflächlich verletzte, Kontrollen wurden nach 0 und 72 h entnommen. Nach Reinigung der Protein-Fractionen (2.2.6.1) aller Proben und Western-Blot-Analyse (2.2.6.4) mit dem Antiserum AS-338 (2.1.5) wurden die Intensitäten der resultierenden Banden, wie bei den Experimenten mit Protoplasten und 1 cm² großen Blattscheiben, mit der unter 2.2.7 beschriebenen Computer Software ausgewertet und standardisiert. Als Standard wurde hier die Intensität der NSs-Banden der jeweiligen Linie im inokulierten Segment zum Zeitpunkt 72 hpi verwendet. Auf diesen wurden alle anderen Messwerte bezogen, um die Ergebnisse der verschiedenen Experimente vergleichen zu können. Von zwei Experimenten, bei denen jeweils die nicht-transgene Kontrolle mit einer der beiden ausgewählten transgenen Linien (XL 7.1 oder X 15.1) gemeinsam inokuliert wurde, sind die Western-Blot-Analysen in **Abb. 17** und die Computer-Auswertungen in **Abb. 18** gezeigt.

Wie bereits bei den Versuchen mit 1 cm² großen Blattscheiben (3.3.1.2) zeigt sich auch hier wieder eine langsamere Zunahme der NSs-Protein-Menge im inokulierten Abschnitt 1 der Blattstreifen von Linie X 15.1 im Vergleich mit der nicht-transgenen Kontrolle, wenngleich diese hier nicht so ausgeprägt war wie unter 3.3.1.2. Demgegenüber ergab sich kein signifikanter Unterschied im inokulierten Abschnitt zwischen Pflanzen der Linie XL 7.1 und der nicht-transgenen Kontrolle. In den Blattstreifen der Linie XL 7.1 nahm jedoch die Menge an NSs-Protein in den nicht-inokulierten Abschnitten 2 bis 4, in die die Viren nur durch Zell-zu-Zell Bewegung gelangen konnten, deutlich langsamer zu als in den Blattscheiben der nicht-transgenen Kontrolle. Dies deutet auf eine verlangsamte Ausbreitung der Viren im Blatt der Linie XL 7.1 hin. Bei dem Vergleich der Linie X 15.1 mit der nicht-transgenen Kontrolle ergaben sich in diesen Abschnitten dagegen keine Unterschiede.

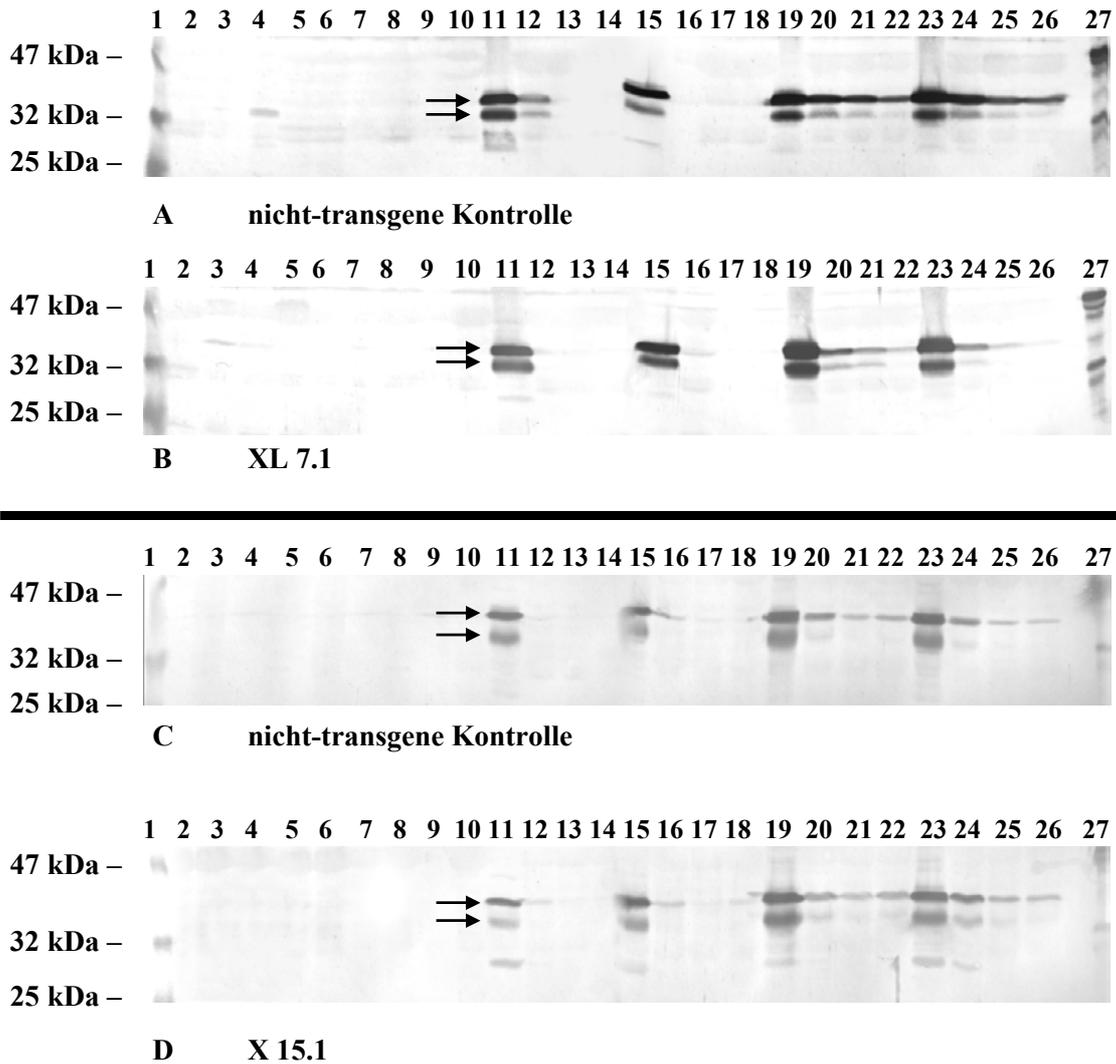
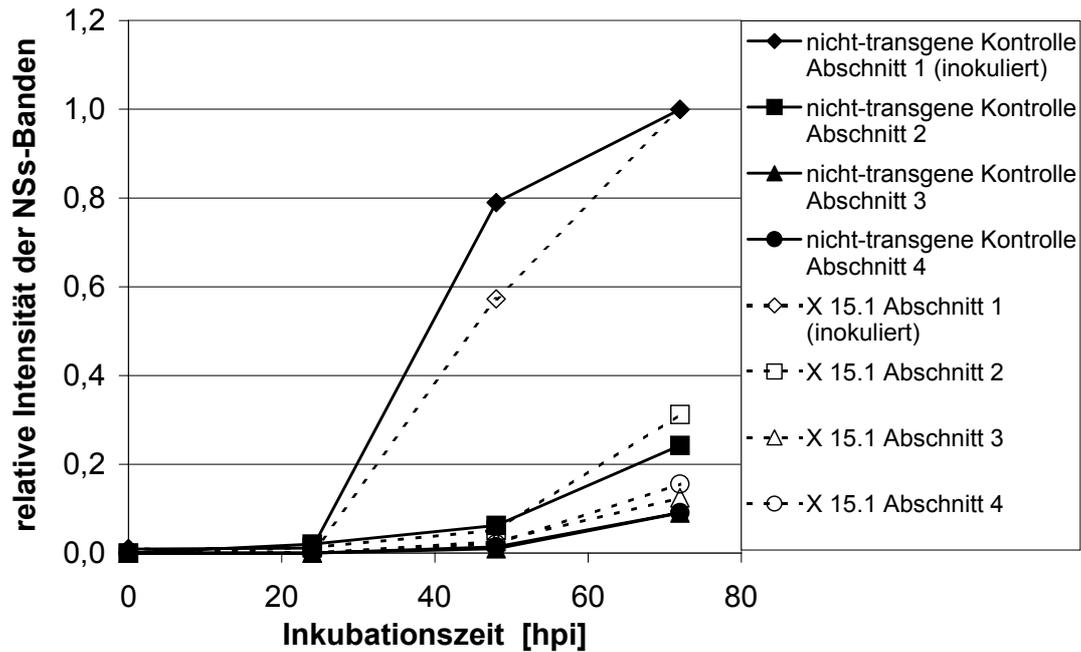


Abb. 17: Untersuchung der Ausbreitung von TSWV-L3 in 4 x 1 cm langen Blattstreifen. Die Western-Blots wurden detektiert mit Antiserum AS-338 gegen TSWV NSs-Protein (mit Pfeilen markierte Doppelbanden im Bereich 40,0 – 42,8 kDa).

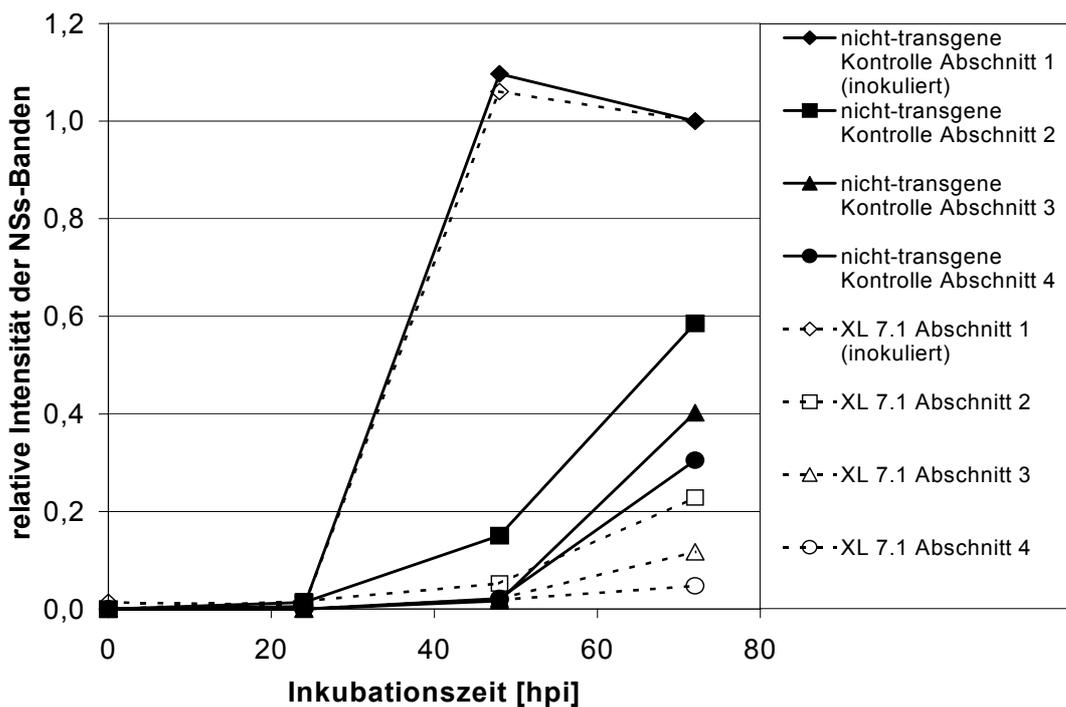
A und B zeigen ein Experiment, bei dem die nicht-transgene Kontrolle (A) und XL 7.1 (B) zur gleichen Zeit inokuliert wurden. C und D stammen aus einem Experiment mit nicht-transgener Kontrolle (C) und X 15.1 (D).

1=Marker, 2 bis 4 sind nicht-inokulierte Kontrollen (2=0h, 3/4=72h), alle anderen Proben sind inokuliert: 5/6=0 hpi Abschnitt 1, 7/9=24 hpi Abschnitt 1, 8/10=24 hpi Abschnitt 2, 11/15=48 hpi Abschnitt 1, 12/16=48 hpi Abschnitt 2, 13/17=48 hpi Abschnitt 3, 14/18=48 hpi Abschnitt 4, 19/23=72 hpi Abschnitt 1, 20/24=72 hpi Abschnitt 2, 21/25=72 hpi Abschnitt 3, 22/26=72 hpi Abschnitt 4, 27=TSWV-L3 aus systemisch erkrankter Tabak-Pflanze.

Eine Übersicht über die Aufteilung der Proben in die Abschnitte 1-4 ist in **Abb. 16** gezeigt.



Vergleich nicht-transgene Kontrolle mit XL 15.1



Vergleich nicht-transgene Kontrolle mit XL 7.1

Abb. 18: Quantifizierung der NSs-Banden aus den Western-Blot Analysen zur Inokulation von 4 x 1 cm großen Blattstreifen (**Abb. 17**). Es wurden jeweils die Linien XL 7.1 bzw. X 15.1 mit der nicht-transgenen Kontrolle verglichen. Die Intensitäten der Doppelbanden bei 42,8 und 40,0 kDa wurden am Computer errechnet, die Mittelwerte aus je zwei Parallelmessungen bestimmt und diese auf den Wert des jeweiligen inokulierten Abschnittes 1 bei 72 hpi bezogen.

3.3.2 Untersuchungen zur Etablierung von Infektionen mit Tospoviren in Pflanzen der transgenen Linien

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden mit vollständigen Pflanzen durchgeführt, die im Gewächshaus kultiviert wurden (2.2.1.1). Zunächst wurde die Infizierbarkeit der transgenen Linien mit verschiedenen Tospoviren und in verschiedenen Stadien der Pflanze untersucht, danach stand die Ausbreitung der Viren durch die Pflanze im Mittelpunkt.

3.3.2.1 Inokulation mit verschiedenen *Tospovirus*-Isolaten

Zunächst sollte die Resistenz der Pflanzen gegenüber verschiedenen *Tospovirus*-Isolaten getestet werden. Die Pflanzen wurden zu diesem Zweck im 4-Blatt Stadium nach 2.2.4.4 mit einem der folgenden *Tospovirus*-Isolate inokuliert: TSWV-L3, TSWV-DH37 oder GRSV-SA05 (2.1.2). Da das N-Gen der transgenen Linien aus dem Isolat TSWV-L3 stammte, wird dieses im Folgenden als das homologe Isolat bezeichnet. Die Homologien dieses N-Gens zu den N-Genen der anderen Isolate können aus **Tab. 6** entnommen werden. Die dort angegebenen prozentualen Homologien wurden durch Sequenzvergleiche mit dem Computer-Programm „DNAMAN 2.71“ (Lynnon Biosoft) mit den Parametern „K-Tuple=4“ und „Gap-Penalty=7“ (Wilbur und Lipman, 1983) erhalten.

Eine grafische Gegenüberstellung der Ergebnisse von Infektionsversuchen mit den genannten *Tospovirus*-Isolaten ist in **Abb. 19** gezeigt. Dargestellt sind die prozentualen Anteile systemisch erkrankter Pflanzen, die die typischen *Tospovirus*-Symptome wie netzartige Adernaufhellung (teilweise nekrotisch) und Blattdeformationen nach einem Zeitraum von 20 Tagen nach Inokulation zeigten (**Abb. 20 A**).

Tab. 6: Sequenzvergleiche zwischen den Nukleinsäure-Sequenzen des N-Gens der transgenen Linien und den verwendeten *Tospovirus*-Isolaten.

<i>Tospovirus</i> Spezies und Isolat	Homologie der N-Gen Sequenz zum N-Gen der transgenen Tabak-Linien XL 4.24, XL 7.1, XL 8.28, XL 14.1 und X 15.1
TSWV-L3	100%
TSWV-DH37	98%
GRSV-SA05	78%

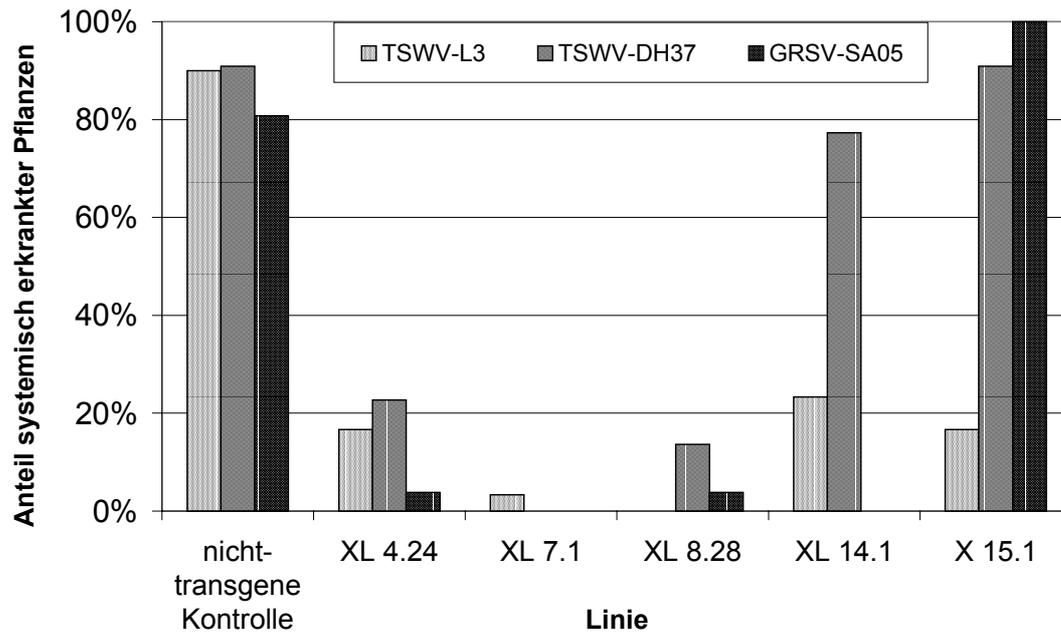


Abb. 19: Inokulation aller Linien mit den Tospovirus-Isolaten TSWV-L3 (30 Pflanzen), TSWV-DH37 (22 Pflanzen) oder GRSV-SA05 (26 Pflanzen). Angegeben ist der Anteil systemisch erkrankter Pflanzen 20 Tage nach Inokulation.

Bei Inokulation mit dem homologen Isolat TSWV-L3 zeigten die Linien XL 7.1 (1 von 30 Pflanzen) und XL 8.28 (0 von 20 Pflanzen) besonders selten bzw. niemals systemische Symptome. Auch die Pflanzen der Linie XL 4.24 erkrankten nur in 5 von 30 Fällen mit systemischen Symptomen, diese waren allerdings nur schwach ausgeprägt und betrafen im Gegensatz zur nicht-transgenen Kontrolle meist nur wenige Blattadern (**Abb. 20 B**). Die Pflanzen der Linien XL 14.1 und X 15.1 zeigten in 7 bzw. 5 von 30 Fällen systemische Symptome, die sich in ihrer Ausprägung kaum von denen der nicht-transgenen Pflanzen unterschieden. Die nicht-transgene Kontrolle ergab in 27 von 30 Fällen systemisch mit TSWV-L3 infizierte Pflanzen. Bei Inokulation mit dem als besonders virulent bekannten Isolat TSWV-DH37 (2.1.2) zeigten die Linien XL 14.1 und X 15.1 kaum noch einen Unterschied zur nicht-transgenen Kontrolle. 17 von 22 Pflanzen der Linie XL 14.1 und 20 von 22 Pflanzen der Linie X 15.1 zeigten systemische Symptome, die sich nicht von denen der nicht-transgenen Kontrolle unterschieden, die ebenfalls in 20 von 22 Fällen systemische Symptome mit diesem Isolat ausprägte. Auch die Pflanzen der Linien XL 4.24 und XL 8.28 zeigten mit TSWV-DH37 häufiger Krankheitssymptome als bei Inokulation mit TSWV-L3 (5 von 22 Pflanzen der Linie XL 4.24 und 3 von 22 Pflanzen der Linie XL 8.28). Keine systemischen Symptome bei Inokulation mit TSWV-DH37 wurden nur bei der Linie XL 7.1 gefunden.

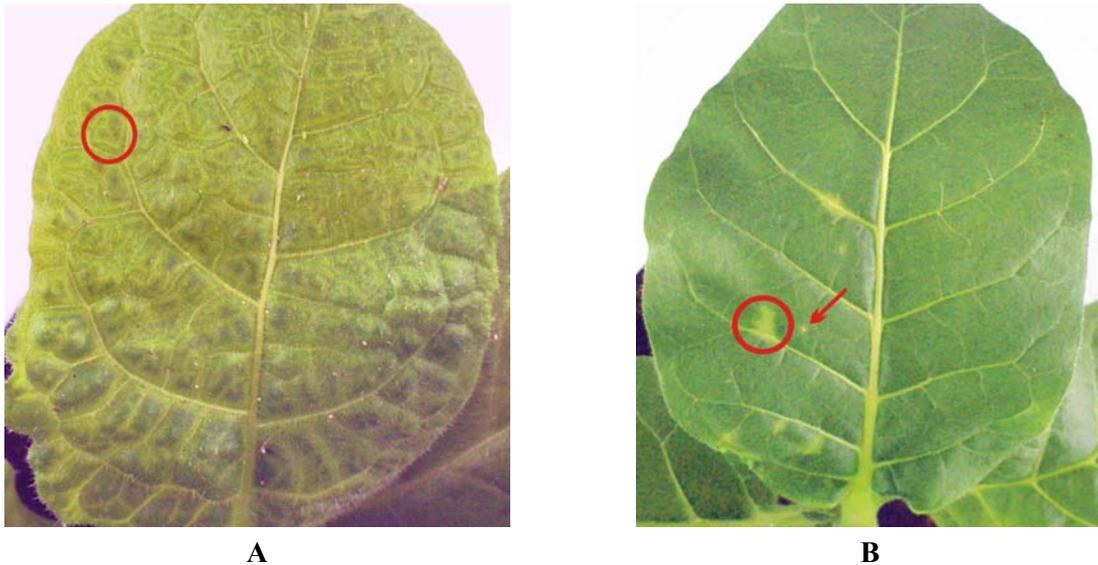


Abb. 20: Typische Symptomausprägungen von TSWV-L3 auf nicht-transgenen und transgenen Pflanzen. Gezeigt sind Blätter, die nicht direkt mit Virus inokuliert worden waren, es handelt sich also um systemische Symptome.

A: nicht-transgene Kontrolle, Blatt mit netzartigen Aderaufhellungen (Chlorosen), verteilt über die gesamte Blattspreite. Der rote Kreis deutet lediglich eine besonders gut erkennbare Stelle an. Im basalen Bereich sind auch deutliche Aufwölbungen der Spreite zwischen den Adern sichtbar, die auf Virus-induzierte Wachstumsstörungen zurückzuführen sind.

B: transgene Linie XL 4.24 mit lokal begrenzten Aderaufhellungen (Kreis) und punktförmigen Chlorosen (Pfeil). Diese Art der Symptomausprägung ist auch typisch für die Linien XL 7.1 und XL 8.28.

Das Isolat SA05 der Spezies GRSV führte bei den Linien XL 7.1 und XL 14.1 zu keinen systemischen Erkrankungen. Nur jeweils 1 von 26 inokulierten Pflanzen der Linien XL 4.24 und XL 8.28 erkrankte systemisch. Die Pflanze der Linie XL 8.28 zeigte Symptome, die ebenfalls im späteren Verlauf zu schweren Nekrosen führten, die jedoch vollständig auf die Blattadern beschränkt blieben, dies ist in **Abb. 21** gezeigt. Die Blätter welkten schließlich 30 Tage nach Inokulation, da die Blattadern zerstört waren. Eine Ausweitung der Infektion auf die Blattspreiten wurde jedoch in diesem Fall nicht beobachtet. Auf der Pflanze der Linie XL 4.24 waren die Symptome etwas großflächiger ausgeweitet. Die Linie X 15.1 zeigte bei Inokulation mit diesem Isolat in 26 von 26 inokulierten Pflanzen systemische Erkrankungen. Die Symptome waren auf diesen Pflanzen deutlich heftiger und entwickelten sich um etwa 2-4 Tage schneller als auf den nicht-transgenen Kontrollpflanzen (**Abb. 22**). Die nicht-transgenen Kontroll-Pflanzen erkrankten mit GRSV in 21 von 26 Fällen. In beiden Linien, X 15.1 und nicht-transgene Kontrolle, führte die fortschreitende Infektion schließlich zu stark nekrotischen Symptomen und zum Absterben der Blätter.



Abb. 21: Drei Blättetagen einer Pflanze der Linie XL 8.28, 30 Tage nach Inokulation mit GRSV-SA05. Nur diese eine von 12 parallel inokulierten Pflanzen zeigte systemische Symptome, die als Aderaufhellungen begannen und in den hier gezeigten Nekrosen gipfelten, aber auf die Blattadern oder deren unmittelbare Umgebung beschränkt blieben (Pfeile). Bei allen Blättern handelt es sich um systemische Symptome. Das älteste Blatt (ganz links) ist bereits abgestorben, das jüngste (ganz rechts) schon stark welk.

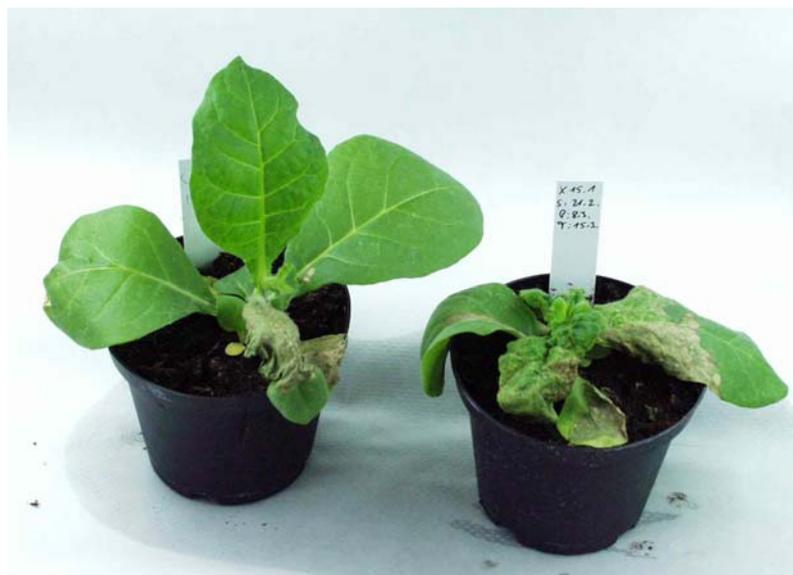


Abb. 22: Nicht-transgene Kontrolle (links) und Pflanze der Linie X 15.1 (rechts) 14 Tage nach Inokulation mit GRSV-SA05. So wie hier verlief in fast allen Fällen die Symptomausprägung bei den Pflanzen der Linie X 15.1 nach Inokulation mit GRSV-SA05 deutlich heftiger und schneller als bei der nicht-transgenen Kontrolle.

3.3.2.2 Inokulation in verschiedenen Stadien der Pflanze

Die Konzentration des rekombinanten Proteins in den Blättern der verschiedenen Linien hatte eine deutliche Altersabhängigkeit ergeben (3.1.5.4). Es sollte nun überprüft werden, ob dieser Sachverhalt Einfluss auf das Resistenzverhalten der Pflanzen bei Inokulation in verschiedenen Stadien, also verschiedenen Altersstufen, der Pflanze hat. Dazu wurden jeweils zwei Pflanzen jeder transgenen Linie sowie der nicht-transgenen Kontrolle in verschiedenen Stadien auf jeweils allen voll entwickelten Blättern nach 2.2.4.4 mit TSWV-L3 inokuliert. Die Pflanzen wurden 23 Tage im Gewächshaus kultiviert und abschließend bonitiert.

In Vorversuchen wurde beobachtet, dass auch die nicht-transgene Kontrolle maximal bis zum Erreichen des 7-Blatt-Stadiums auf diese Weise systemisch mit TSWV infizierbar ist. Aus diesem Grunde wurden die Inokulationen nur bis zum 7-Blatt-Stadium durchgeführt und ausgewertet.

Die Ausprägungen primärer Symptome (inokulierte Blätter) und systemischer Symptome (nicht inokulierte Blätter) wurden in **Tab. 7** zusammengetragen. Dargestellt ist jeweils der Grad der Symptomausprägung in beiden parallel inokulierten Pflanzen in einer dreistufigen Einteilung.

In dieser Versuchsreihe konnten die nicht-transgenen Kontrollpflanzen bis zur Inokulation im 6-Blatt-Stadium ohne Ausnahme systemisch mit TSWV-L3 infiziert werden. Primäre Symptome, also Lokalläsionen und Ringflecken auf direkt inokulierten Blättern, zeigten sich auf allen transgenen und nicht-transgenen Pflanzen bis zur Inokulation im 5-Blatt-Stadium. Ab der Inokulation im 6-Blatt-Stadium wurden diese Symptome allerdings nur noch auf den nicht-transgenen Kontrollpflanzen sowie je einer Parallele der transgenen Linien XL 4.24 und X 15.1 gefunden. Die transgenen Pflanzen aller Linien zeigten bei Inokulation im 7-Blatt-Stadium keinerlei Symptomausprägung mehr.

Systemische Symptome wurden bei den transgenen Pflanzen nur vereinzelt auf Pflanzen der Linien XL 4.24 (1 von 2 Pflanzen im 3-, 4- und 6-Blatt Stadium), XL 7.1 (1 von 2 Pflanzen im 3-Blatt Stadium) sowie X 15.1 (1 von 2 Pflanzen im 3-Blatt Stadium) beobachtet.

Tab. 7: Inokulation von Pflanzen aller Linien mit TSWV-L3 in verschiedenen Alters-Stadien der Pflanzen. Das angegebene Pflanzen-Stadium bezieht sich auf den Zeitpunkt der Inokulation. Angegeben sind die Symptomausprägungen 23 Tage nach Inokulation in einem dreistufigen Schema für die jeweils zwei Individuen, die parallel inokuliert worden waren. Symptome auf den inokulierten Blättern sind als „primäre“ Symptome aufgeführt. Systemische Symptome sind solche, die auf nicht-inokulierten Blättern gefunden wurden.

Linie	Symptome	Stadium der Pflanze zum Zeitpunkt der Inokulation (Anzahl der Blätter ohne Keimblätter)				
		3 Blätter	4 Blätter	5 Blätter	6 Blätter	7 Blätter
nicht-transgene Kontrolle	primär	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+ / +
	systemisch	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / -
XL 4.24	primär	+ / +	+ / +	+ / +	+ / -	- / -
	systemisch	++ / -	++ / -	- / -	++ / -	- / -
XL 7.1	primär	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	- / -
	systemisch	+ / -	- / -	- / -	- / -	- / -
XL 8.28	primär	+ / +	+ / -	+ / +	- / -	- / -
	systemisch	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
XL 14.1	primär	+ / +	+ / -	+ / -	- / -	- / -
	systemisch	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
X 15.1	primär	+ / +	+ / +	+ / +	+ / -	- / -
	systemisch	+++ / -	- / -	- / -	- / -	- / -

Es wurden jeweils alle Blätter inokuliert. Letzte Bonitur nach 23 Tagen. Je 2 Pflanzen pro Ansatz (Ergebnisse durch Schrägstrich getrennt)

Bedeutung der Symbole:

- +++ großflächige Symptomausprägung
- ++ Aderaufhellungen (begrenzte Flächen)
- + lokale Läsionen und Ringflecken
- keine Symptome

3.3.2.3 Ausbreitung von Tosspoviren in Pflanzen der transgenen Linien

Zur Untersuchung der Ausbreitung der Viren in inokulierten Pflanzen der transgenen Linien wurden Gewächshaus-Pflanzen jeweils auf dem zweiten Laubblatt von unten nach 2.2.4.4 mit TSWV-L3 inokuliert. Das inokulierte Blatt wurde zur späteren Unterscheidung durch seitliche Einkerbung markiert.

Die Pflanzen wurden über einen Zeitraum von 16 Tagen im Gewächshaus kultiviert. Jeweils eine Pflanze jeder transgenen Linie sowie der nicht-transgenen Kontrolle wurde zu den Zeitpunkten 0, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 dpi entnommen. Es wurden Tissue Print Immunoblots mit dem Pflanzenmaterial nach 2.2.6.5 durchgeführt. Die Wurzeln wurden hierzu von Substrat befreit, alle Blätter abgetrennt, und von jedem Blatt Abdrücke von zwei Transversal-Schnitten (je einer im apikalen

und einer im basalen Drittel des Blattes) auf Nitrocellulose-Membranen angefertigt. Die Sprossachse wurde longitudinal geschnitten und Abdrücke inklusive der Wurzel auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Detektiert wurde mit dem Antikörper AS-0116/1 (2.1.5), der das virale G1-Protein erkennt.

Vier Ergebnisse solcher Tissue Print Immunoblots sind in **Abb. 23** gezeigt. Es handelt sich dabei um drei Stadien der Ausbreitung von TSWV-L3 in nicht-transgenen Kontroll-Pflanzen zu den Zeitpunkten 6, 8 und 14 dpi sowie um ein Beispiel einer transgenen Pflanze (Linie XL 4.24) zum Zeitpunkt 10 dpi.

Deutlich sind auf diesen Immunoblots die Abdrücke der Sprossachsen, Wurzeln und Blätter zu erkennen. Die rote Färbung zeigt das Vorhandensein von TSWV G-Proteinen an. Die vollständige Auswertung der durch die Tissue Print Immunoblots gewonnenen Daten zu allen Linien wurde in **Abb. 24** schematisch dargestellt. Verteilung und Intensität der roten Färbung auf den Immunoblots sind durch unterschiedliche Füllmuster der betreffenden Pflanzenteile in der Grafik angezeigt. Es wurde dabei nur zwischen dem inokulierten Blatt, den nicht inokulierten Blättern (systemische Ausbreitung) und der Wurzel unterschieden.

In den nicht-transgenen Pflanzen zeigte sich folgender Ablauf der Ausbreitung von TSWV durch die Pflanze: 6 Tage nach Inokulation konnten die viralen Proteine flächendeckend im inokulierten Blatt nachgewiesen werden, welches dann auch äußerlich Symptome (Lokalläsionen) zeigte. Nach 8 Tagen konnte bei den nicht-transgenen Pflanzen der Übertritt der Infektion auf die Wurzeln beobachtet werden. Nach weiteren 2 Tagen war bereits die gesamte Pflanze systemisch erkrankt. Dies zeigte sich zu diesem Zeitpunkt auch in äußerlich erkennbaren Symptomen wie netzartigen Aderaufhellungen, nekrotischen Stellen und Wachstumsstörungen der jungen Blätter (**Abb. 20 A**).

Pflanzen der transgenen Linie XL 14.1 zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die der nicht-transgenen Kontrolle. Die oben aufgezählten Stadien traten jedoch hier gegenüber der nicht-transgenen Kontrolle um 2-4 Tage verzögert auf: Nach 10 Tagen konnten virale Proteine erst im inokulierten Blatt und in der Wurzel detektiert werden, nach 12 Tagen (schwach) bzw. 14 Tagen (deutlich) wurden diese in der gesamten Pflanze gefunden, die dann auch äußerlich die gleichen systemischen Symptome zeigte, die bereits für die nicht-transgene Kontrolle beschrieben wurden. In den Pflanzen der Linie X 15.1 konnte nur in dem Individuum, das nach 12 Tagen entnommen wurde, eine systemische Infektion festgestellt werden (Symptome identisch mit denen der nicht-transgenen Kontrolle), die zu den anderen Zeitpunkten entnommenen Pflanzen zeigten weder äußerliche Symptome noch eine Verbreitung viraler Proteine im Immunoblot. Eine Ausbreitung viraler Proteine im inokulierten Blatt konnte in den transgenen Pflanzen ab 8 dpi (also 5 Probenahmen) in folgenden Häufigkeiten beobachtet werden: 4 Pflanzen XL 4.24, 3 Pflanzen XL 7.1, 2 Pflanzen XL 8.28, 4 Pflanzen XL 14.1 und 1 Pflanze X 15.1. Eine Infektion der Wurzelsysteme wurde in diesen 5 Probenahmen in folgenden Fällen detektiert: 4 Pflanzen XL 4.24, 2 Pflanzen XL 7.1, 1 Pflanze XL 8.28, 4 Pflanzen XL 14.1 und 1 Pflanze X 15.1.

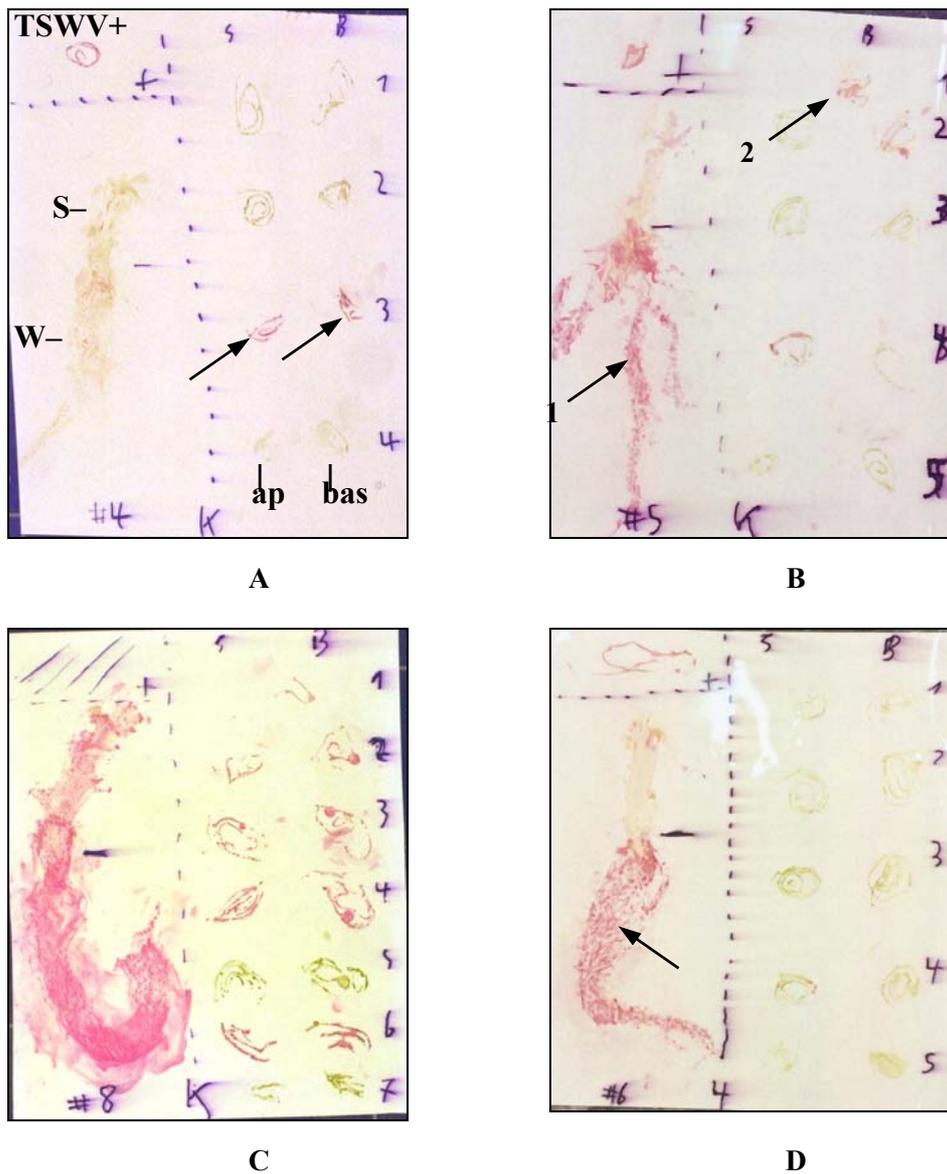


Abb. 23: Beispiele für Tissue Print Immunoblots, die die Ausbreitung von TSWV in Tabak-Pflanzen sichtbar machen (rote Färbung, detektiert mit Antikörper AS-0116/1 gegen TSWV G1-Protein). Links der gestrichelten Linie ist jeweils der Abdruck von Sprossachse (S) und Wurzel (W) zu sehen (Übergang durch kurzen horizontalen Strich markiert). Rechts der Linie wurden alle Blätter nach ihrer Reihenfolge an der Pflanze von oben nach unten abgedrückt, links jeweils der apikale (ap), rechts der basale (bas) Querschnitt, bei A, B und D befindet sich links oben ein systemisch an TSWV-L3 erkranktes Blatt als Positivkontrolle (TSWV+).

A-C zeigen die fortschreitende Infektion einer nicht-transgenen Kontrollpflanze 6, 8 und 14 Tage nach Inokulation von Blatt Nr. 3. Dieses Blatt ist zum Zeitpunkt 6 dpi bereits vollständig infiziert (A, Pfeile). Die weitere Ausbreitung des Virus in der Pflanze erfolgt über die Wurzel (B, Pfeil 1), dann die jüngsten Blätter (B, Pfeil 2) und schließlich wird die gesamte Pflanze befallen (C).

Immunoblot D kennzeichnet eine für die transgenen XL-Linien typische Situation (hier: XL 4.24, 10 dpi): die Wurzel (und damit das Leitgefäßsystem) ist infiziert (Pfeil), es findet jedoch kein Übergreif auf die Blattspreiten statt.

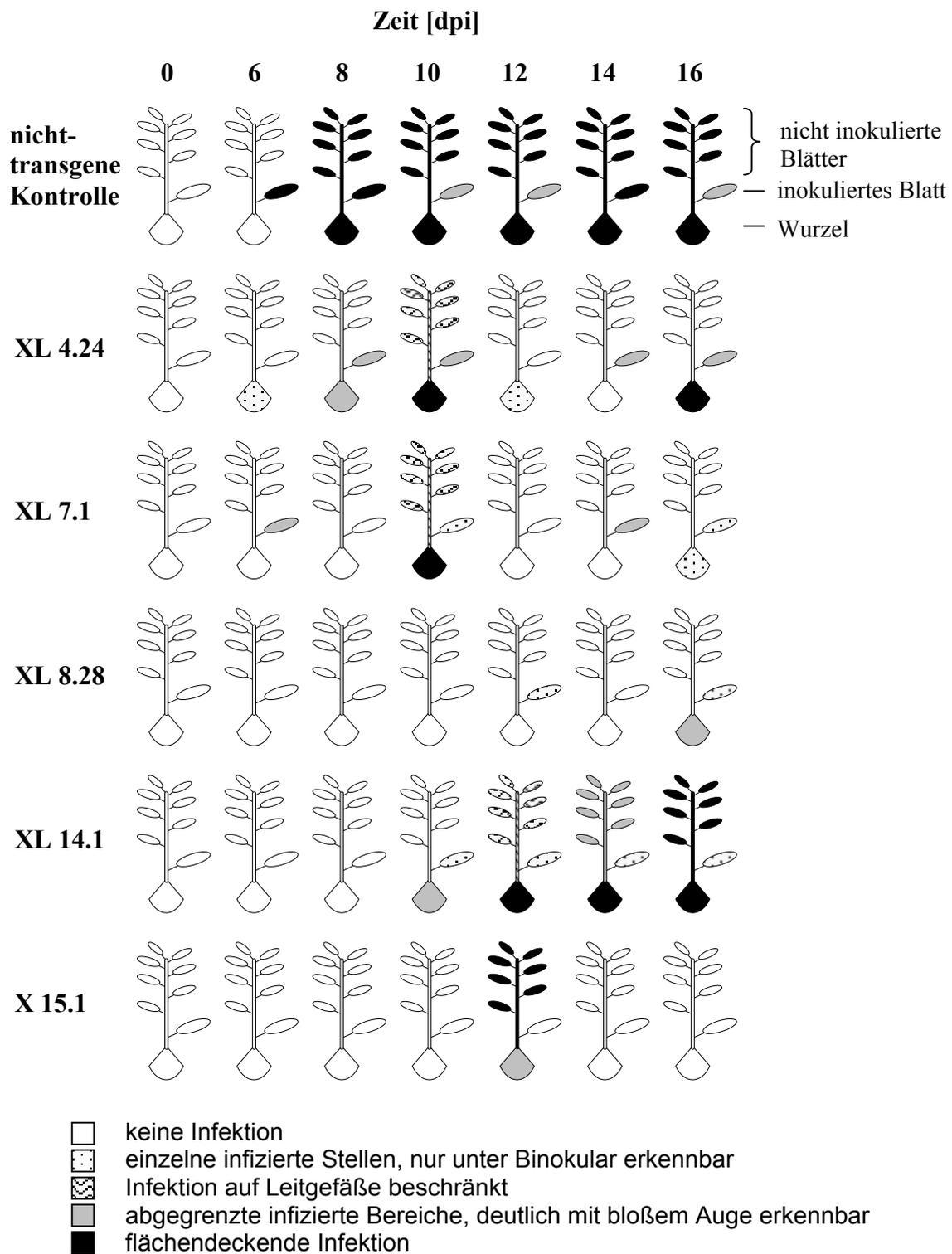


Abb. 24: Pflanzen aller Linien wurden auf jeweils einem Blatt (in der Grafik angegeben) mit TSWV-L3 inokuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils eine Pflanze entnommen, Abdrücke von allen Blättern sowie Spross und Wurzel auf Nitrocellulose übertragen und mit Antikörper AS-0116/1 gegen TSWV G-Proteine detektiert. Die Verteilung von viralen Proteinen in den drei Bereichen nicht-inokulierte Blätter (einzelne Blattetagen nicht unterschieden), inokuliertes Blatt und Wurzel/Leitgefäßsystem ist in der Grafik wiedergegeben (s. Legende).

Die Ausbreitung der Viren im mechanisch inokulierten Blatt ist also auch bei den transgenen Linien ein durchaus häufiger Fall (siehe auch 3.3.2.2). Obwohl es in den transgenen Pflanzen der Linien XL 4.24, XL 7.1 und XL 8.28 in diesem Versuch nicht zu systemischen Symptomen einer Viruserkrankung kam, konnte doch häufig ein Übertritt viraler Proteine in die Wurzel, also in das Leitgefäßsystem, beobachtet werden. Um sicherzustellen, dass dies auch wirklich auf ein Vorhandensein infektiöser Viren schließen lässt, wurden Biotests mit diesem Material durchgeführt. Hierzu wurde Wurzel-Homogenat aus solchen transgenen Pflanzen, bei denen virale Proteine in den Wurzeln nachgewiesen werden konnten, auf gesunde nicht-transgene Pflanzen im 4-Blatt Stadium nach 2.2.4.4 abgerieben. Alle so inokulierten Pflanzen erkrankten systemisch mit den typischen TSWV-Symptomen, wodurch bewiesen wurde, dass sich im Leitgefäßsystem der transgenen Pflanzen durchaus infektiöses Virus-Material befinden kann, ohne dass dies zu systemischen Erkrankungen der Blätter führt.

In den Pflanzen der Linien XL 4.24, XL 7.1 und XL 8.28 wurde eine systemische Verbreitung der Viren nur in jeweils einem Fall gefunden. In diesen Fällen konnten die viralen Proteine nur in den Blattadern, nicht aber im Mesophyll-Gewebe der Blätter, detektiert werden. Zur Verdeutlichung sind in **Abb. 25** Detail-Aufnahmen von Immunoblots solcher Situationen wiedergegeben. Die Viren sind in diesen Abbildungen allerdings nicht nur auf das Phloem beschränkt, in dem sie transportiert werden, gelangten jedoch nie weit über dessen Grenzen hinaus. Äußerlich zeigten diese Pflanzen keine (XL 8.28) bzw. nur sehr milde systemische Symptome (XL 4.24 und XL 7.1). Dabei handelte es sich um lokal sehr begrenzte Aderaufhellungen, wie sie in **Abb. 20 B** gezeigt sind.

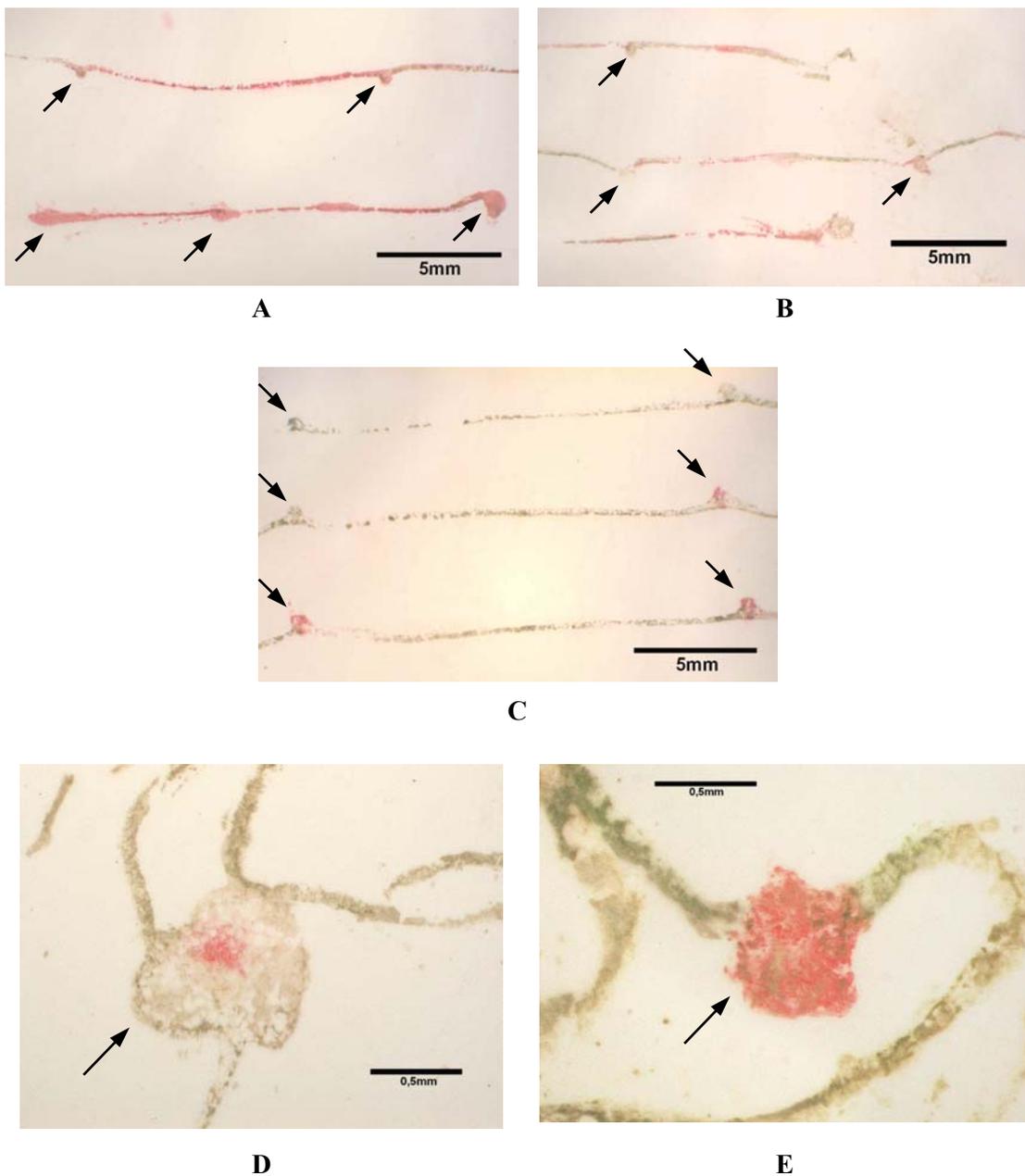


Abb. 25: Detailaufnahmen von Tissue Print Immunoblots TSWV-L3 inokulierter Pflanzen verschiedener Linien. Detektiert wurde mit Antikörper AS-0116/1 gegen TSWV G-Proteine. Gezeigt sind Blattquerschnitte von solchen Pflanzen, bei denen virale Proteine 10-12 Tage nach Inokulation im nicht-inokulierten Bereich detektiert werden konnten (systemische Ausbreitung).

A bis C: Blattspreiten mit querschnittenen Adern 2. Ordnung (Pfeile).

A=nicht-transgene Kontrolle, Ausbreitung im gesamten Bereich.

B=X 15.1, ebenfalls großflächige Ausbreitung in Adern und Spreite

C=XL 7.1, virale Proteine fast ausschließlich in den Adern, nicht in der Spreite

D und E: Blattspreiten mit querschnittenen Mittelrippen (Pfeile).

D=XL 4.24, virale Proteine auf Leitgewebe in Mittelrippe beschränkt.

E=XL 7.1, keine Ausbreitung in der Blattspreite, Mittelrippe jedoch vollständig infiziert

Das Experiment wurde auch mit dem Isolat SA05 der Spezies GRSV durchgeführt um zu untersuchen, ob sich diese heterologe Spezies im Langstreckentransport durch transgene Pflanzen von dem homologen Isolat TSWV-L3 unterscheidet. Inokulation, Kultivierung, Probennahme und Auswertung stimmen mit der oben beschriebenen Vorgehensweise überein, die Probennahmen erfolgten diesmal jedoch zu den Zeitpunkten 0, 5, 7, 9, 11, 13, 15 und 17 dpi. Das Ergebnis ist in **Abb. 26** wiedergegeben.

Der wichtigste Unterschied zu dem Experiment mit dem homologen Isolat TSWV-L3 ist die Reaktion der Pflanzen der Linien XL 14.1 und X 15.1. Bei Inokulation mit GRSV-SA05 wurde keine systemische Ausbreitung von Virus in den Pflanzen der Linie XL 14.1 beobachtet. Die Pflanzen der Linie X 15.1 zeigten mit TSWV-L3 nur in einem Fall eine systemische Ausbreitung, mit GRSV-SA05 hingegen konnten virale Proteine ab 7 dpi in der gesamten Pflanze detektiert werden. Ab 9 dpi zeigten sich auch äußerlich systemische Symptome.

Eine Ausbreitung der Viren im inokulierten Blatt konnte in diesem Experiment ab 9 dpi in allen Pflanzen aller Linien, mit Ausnahme einer Probe von XL 14.1, beobachtet werden. Es wurde auch häufiger Virus in den Wurzelsystemen transgener Pflanzen detektiert als bei Inokulation mit TSWV-L3. Ab 9 dpi (5 Probennahmen) zeigten: 4 Pflanzen von XL 4.24, 4 Pflanzen von XL 7.1, 2 Pflanzen von XL 8.28 und 5 Pflanzen von X 15.1 eine Infektion der Wurzeln. Keine Pflanze der Linie XL 14.1 zeigte in diesem Versuch ein Übergriff der Infektion auf die Wurzeln.

Eine systemische Ausbreitung der Viren in den Blattadern konnte bei Inokulation mit GRSV-SA05 in dieser Versuchsreihe bei keiner Pflanze der Linien XL 4.24, XL 7.1, XL 8.28 und XL 14.1 festgestellt werden.

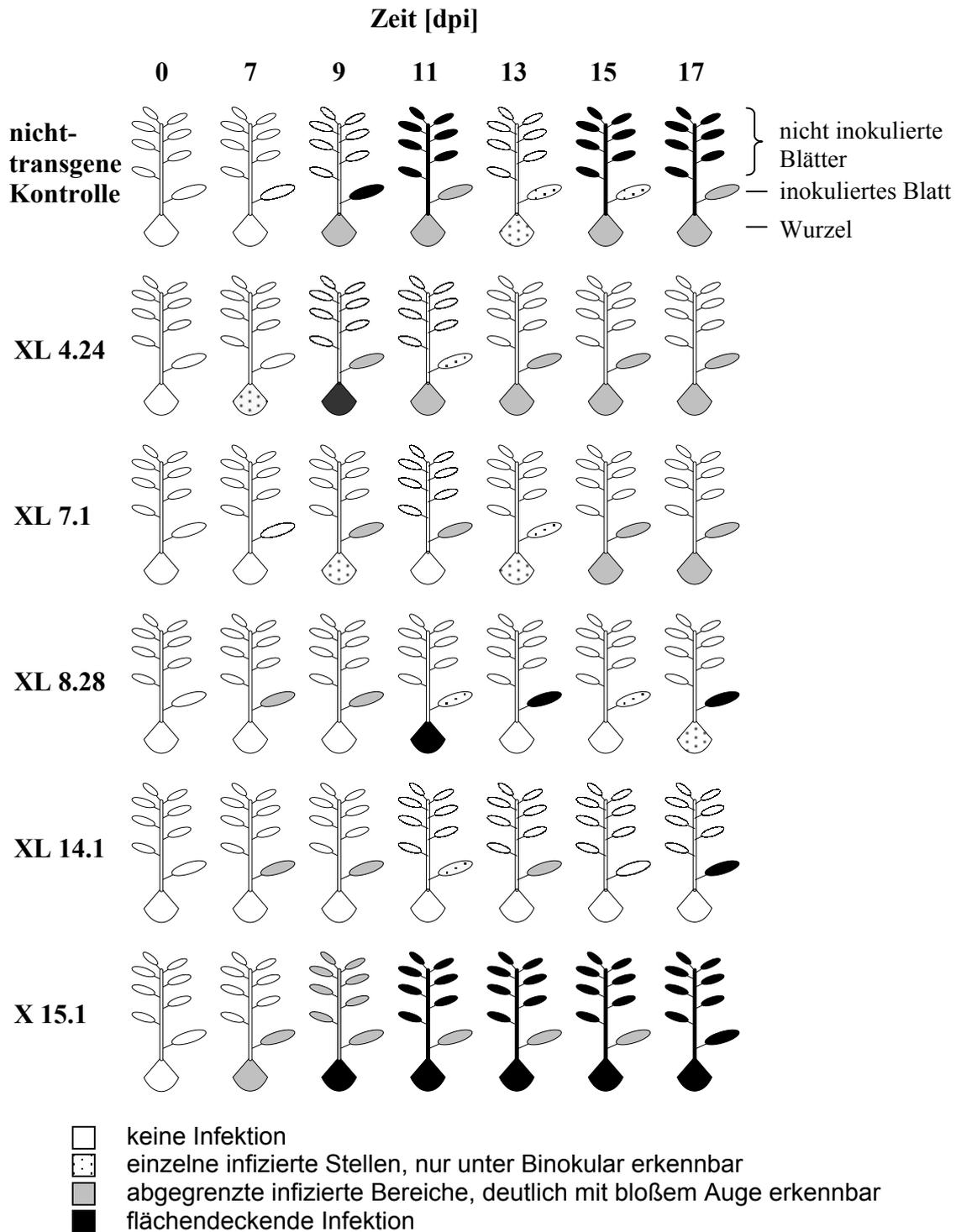


Abb. 26: Pflanzen aller Linien wurden auf jeweils einem Blatt (in der Grafik angegeben) mit **GRSV-SA05** inokuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils eine Pflanze entnommen, Abdrücke von allen Blättern sowie Spross und Wurzel auf Nitrocellulose übertragen und mit Antikörper AS-0116/1 gegen TSWV G-Proteine detektiert. Die Verteilung von viralen Proteinen in den drei Bereichen nicht-inokulierte Blätter (einzelne Blattetagen nicht unterschieden), inokuliertes Blatt und Wurzel/Leitgefäßsystem ist in der Grafik wiedergegeben (s. Legende).

3.3.2.4 Übertragungsversuche mit gepfropften Pflanzen

Es sollte geprüft werden, ob die Infizierbarkeit der transgenen Tabak-Linien steigt, wenn die Inokulation direkt ins Leitgewebesystem erfolgt. Hierzu wurden unterschiedliche Kombinationen von transgenen und nicht-transgenen Pflanzen durch Pfropfung nach 2.2.2 miteinander verbunden. Als Unterlagen wurden dabei stets inokulierte Pflanzen verwendet, im Falle der nicht-transgenen Kontrollpflanzen wurden Pflanzen ausgewählt, die bereits voll entwickelte systemische Symptome einer TSWV-Infektion zeigten, wohingegen die verwendeten transgenen Unterlagen inokuliert aber symptomfrei waren. Eine abschließende Bonitur der Pflanzen erfolgte 20-40 Tage nach der Pfropfung. Die Ergebnisse sind in **Tab. 8** zusammengefasst. Es wurden nur diejenigen Pflanzen aufgeführt, bei denen die Reiser erfolgreich auf den Unterlagen angewachsen waren und von denen keine eigene Wurzeln bis in das Substrat reichten, da in diesem Falle eine direkte Verbindung der Leitgefäßsysteme nicht gesichert ist.

Tab. 8: Pfropfversuche mit inokulierten Unterlagen und nicht-inokulierten Reisern der verschiedenen Linien. Bonitur der auftretenden TSWV-Symptome 20-40 Tage nach Inokulation.

Unterlage (inokuliert)	Reiser (nicht- inokuliert)	Anzahl der Reiser mit TSWV- Symptomen	Gesamtzahl der ausgewer- teten Pflanzen	Ausprägung der Sympto- me
Nicht-transgene Kontrolle	XL 14.1	0	2	-
Nicht-transgene Kontrolle	X 15.1	3	4	großflächig
Nicht-transgene Kontrolle	XL 4.24	1	4	großflächig
Nicht-transgene Kontrolle	XL 7.1	0	11	-
Nicht-transgene Kontrolle	XL 8.28	3	3	wenige lokale Symptome wie in Abb. 20 B
Nicht-transgene Kontrolle	Nicht-transgene Kontrolle	3	5	großflächig
X 15.1	Nicht-transgene Kontrolle	0	3	-
XL 4.24	Nicht-transgene Kontrolle	0	2	-
XL 7.1	Nicht-transgene Kontrolle	0	17	-

Die Ausprägung der Symptome in den Reisern nach Pfropfung auf inokulierte Unterlagen war stets deutlich schwächer als bei direkter Inokulation nach 2.2.4.4. Wie die Ergebnisse der Pfropfungen von gesunden nicht-transgenen Kontrollen auf TSWV-erkrankte nicht-transgene Kontrollen in **Tab. 8** zeigen, war auch die Effektivität der Übertragung nur sehr gering, von 5 Versuchen gelang nur bei 3 die systemische Infektion der nicht-transgenen Reiser. Mit 3 systemisch großflächig erkrankten Reisern bei 4 Versuchen zeigten die Pflanzen der Linie X 15.1 demnach eine deutlich gesteigerte Anfälligkeit gegenüber TSWV im Vergleich mit der Inokulation durch Abreibung mit diesem Isolat (17% erkrankt, siehe 3.3.2.1). Ebenfalls auffällig ist das Ergebnis mit der Linie XL 8.28. Durch Pfropfung auf systemisch erkrankte nicht-transgene Kontrollpflanzen konnte bei 3 von 3 Pflanzen dieser Linie eine systemische Ausbreitung von TSWV beobachtet werden. Die Symptome waren hier allerdings ausschließlich lokal begrenzte Aderaufhellungen und punktförmige Chlorosen, ähnlich wie in **Abb. 20 B** für eine mechanisch inokulierte Pflanze der Linie XL 4.24 gezeigt.

Trotz einer großen Anzahl von erfolgreich angewachsenen Pflanzen, konnte in keinem Fall eine Ausbreitung von Virus aus inokulierten transgenen auf nicht-inokulierte nicht-transgene Kontrollpflanzen beobachtet werden. Die Infektiosität von Virusmaterial aus transgenen Pflanzen war allerdings bereits in einem früheren Versuch bestätigt worden (3.3.2.3), für die mangelnde Übertragbarkeit durch Pfropfung müssen also andere Gründe vorliegen.

4 Diskussion

Über gentechnisch erzeugte Resistenz gegen Pflanzenviren durch Expression modifizierter Hüllproteine in transgenen Pflanzen ist wenig in der Literatur bekannt. In der vorliegenden Arbeit werden erstmalig mögliche Mechanismen einer Resistenz gegen Tosspoviren durch Expression von modifiziertem N-Protein beschrieben.

Fünf TSWV-N-transgene Tabak-Linien wurden untersucht. Vier davon enthielten das XL-N-Konstrukt, das aus dem TSWV N-Gen mit einer vorgeschalteten Leader-Sequenz besteht, und eine Linie enthielt das N-Konstrukt, dem dieser Leader fehlte. Bei allen Linien konnte die Expression eines rekombinanten TSWV N-Proteins nachgewiesen werden. Für die vier Linien mit dem XL-N-Konstrukt wurde zudem bewiesen, dass das exprimierte N-Protein ein Fusionsprodukt ist, dessen N-terminales Leader-Peptid auf eine Initiation der Translation am zweiten AUG Start-Codon der PPV-Leader-Sequenz zurückgeführt werden konnte. Diese Sequenz entspricht dem 5'-Terminus der RNA des Plum Pox Potyvirus und war ursprünglich als Translationsverstärker in das Konstrukt eingefügt worden. Dass 5'-Leadersequenzen von Potyviren solche Verstärker-Effekte ausüben können, wurde von Carrington und Freed (1990) nachgewiesen.

Warum initiiert aber die Translation nicht am ersten Start-Codon der Leader-Sequenz? Die optimale Umgebung für ein AUG-Initiator-Codon eukaryotischer mRNA wird von Kozak (1989) mit der Sequenz GCCGCCA/GCCAUGG angegeben. Wichtig ist hier vor allem das Purin (vorzugsweise Adenin) in Pos. -3 sowie das Guanin in Pos. +4, das allerdings nur bei fehlendem Purin in Pos. -3 zwingend notwendig ist. Die Sequenz AUUAAUGU erwies sich ebenfalls noch als effizienter Initiator (Kozak, 1986). Letztere entspricht, mit Ausnahme der Pos. -1, der Sequenz AUCAAUGU, die das Start-Codon des TSWV N-Gens umgibt. Die Umgebung des zweiten AUG innerhalb der PPV-Leader Sequenz des XL-N-Konstruktes, GUCAAGAAUGU, teilt mit dieser das Uracil an Pos. +4 und entspricht der optimalen Kozak-Umgebung in Pos. -6 und -3. Diese beiden AUG-Triplets kommen also als mögliche Start-Codons in Frage. Das erste AUG-Codon im PPV-Leader liegt dagegen mit der Sequenz AAAAUUUUAUGC in einem extrem ungünstigen Kontext. Es wird daher, und wegen der ebenfalls unvorteilhaften Nähe zum 5'-Terminus der RNA (Van den Heuvel *et al.*, 1989), auch im Plum Pox Virus nicht zur Initiation verwendet (Maiss *et al.*, 1989; Riechmann *et al.*, 1991). Die Beobachtung, dass die Translation der XL-N mRNA am zweiten AUG des PPV-Leaders initiiert wird, deckt sich also mit der theoretischen Erwartung.

Dieses zweite Start-Codon liegt nur 3 Nukleotide vor dem 3'-Ende des PPV-Leaders, der mit der TSWV N-Gen Sequenz über einen Linker verbunden ist (**Abb. 2** in der Einleitung). Daher werden 13 von 23 Aminosäuren des exprimierten Leader-Peptids von dieser Linker-Sequenz translatiert, die der "Multiple Cloning Site" des Plasmids pT7T3 19U (Pharmacia) entstammt, wohingegen nur zwei Aminosäuren von der PPV-Leader-Sequenz selbst kodiert werden. Die restlichen 8 Aminosäuren werden von der Leader-Sequenz der TSWV S-RNA abgelesen, die *in vivo* ebenfalls nicht translatiert wird.

Da also der größte Teil des Leader-Peptids von vollkommen künstlichen Sequenzen (Linker) bzw. normalerweise *in vivo* nicht translatierten Bereichen (Leader der TSWV S-RNA) abgelesen wird, ist es sehr unwahrscheinlich, dass dieses Peptid in der Zelle eine Funktion übernehmen kann. Denkbar ist jedoch eine sterische Behinderung von Interaktionen des rekombinanten N-Proteins, das dieses Leader-Peptid am N-Terminus trägt, mit viraler RNA oder anderen Proteinen. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist, dass das Leader-Peptid auf der Oberfläche des rekombinanten Proteins exponiert vorliegt. Dies konnte durch die Detektion mit einem Leader-Peptid-spezifischen Antiserum im nativen Zustand bestätigt werden (3.1.5.2).

Sehr wichtig für den möglichen Einfluss des rekombinanten Proteins auf Replikation oder Transport von Tospoviren in den transgenen Pflanzen ist auch die Frage, ob dieses in Nukleoproteinkomplexe replizierender Viren eingebaut werden kann. Dies konnte durch Reinigung von Nukleoproteinkomplexen und Virionen bestätigt werden (3.2). Dabei verhielten sich die im viralen Material gemessenen XL-N-Protein Anteile proportional zu den Konzentrationen dieses Proteins in der jeweiligen transgenen Tabak-Linie. Dass hierbei nicht Verunreinigungen durch frei im Cytoplasma gelöstes XL-N-Protein gemessen wurden, konnte durch den exakt gleichen Messwert aus den zwei unterschiedlichen Reinigungs-Methoden für Nukleoproteinkomplexe und Virionen bestätigt werden. Letzteres beweist auch, dass die Verpackung von Nukleoproteinkomplexen in Virionen, und damit die Interaktion mit den TSWV G-Proteinen, durch das rekombinante N-Protein nicht gestört wird.

Der Anteil von XL-N- an Gesamt-N-Protein lag in den gereinigten Nukleoproteinkomplexen etwa 3-4 mal höher als in systemisch infizierten Blättern der transgenen Linien (3.2). Daher könnte zunächst angenommen werden, dass das rekombinante Protein sogar noch effizienter in Nukleoproteinkomplexe replizierender Tospoviren eingebaut wird als das virale N-Protein. Es muss jedoch dabei bedacht werden, dass das rekombinante N-Protein bereits bei Eintritt der Viren in jede neu infizierte Zelle in hohen Konzentrationen im Cytoplasma vorliegt und folglich vor allem in den frühen Replikationsrunden in besonders hohen Anteilen in sich neu formierende Nukleoproteinkomplexe eingebaut werden dürfte. Das Leader-Peptid hat also offenbar keinen signifikanten Einfluss auf den Einbau des XL-N-Proteins in Nukleoproteinkomplexe und Virionen.

Wie viele Kopien des XL-N Proteins pro RNA-Segment vorhanden sind kann nur geschätzt werden, da es in der Literatur bislang keine Angaben über die Verhältnisse bei TSWV gibt. Bei verwandten Bunyaviren wurde jedoch ein Verhältnis von ca. 2000 N-Protein-Einheiten pro Virion festgestellt (Obijeski *et al.*, 1976). Da die Gesamtlänge aller RNA-Segmente bei *Bunyavirus*- und *Tospovirus*-Spezies ähnlich ist, gilt diese Zahl vermutlich auch für *Tospoviren*. Damit wären bei Replikation von TSWV in den Linien XL 4.24 oder XL 8.28 ca. 40 Kopien des rekombinanten XL-N-Proteins pro S-RNA Segment vertreten und ca. 100 pro L-RNA Segment. Es kann also angenommen werden, dass auch bei einer statistischen Variabilität dieser Zahl stets viele Kopien

des rekombinanten Proteins mit jedem RNA-Segment assoziiert sind. Nukleoproteinkomplexe, die kein rekombinantes N-Protein enthalten, dürften also nicht oder nur extrem selten vorkommen.

Durch den Nachweis des Einbaus von XL-N Protein in Nukleoproteinkomplexe ist auch bereits belegt, dass dieses Protein, zumindest hauptsächlich, im Cytoplasma lokalisiert ist und nicht etwa durch einen Einfluss des Leader-Peptids in ein anderes Kompartiment verlagert wird. Nur so ist eine Interaktion mit den im Cytoplasma replizierenden Viren möglich.

Eine mögliche Gewebespezifität der Expression oder Lokalisierung des XL-N-Proteins durch den verwendeten CaMV 35S-Promotor oder das Leader-Peptid wurde ebenfalls untersucht. Nach Benfey *et al.* (1990 a+b) enthält der CaMV 35S-Promotor verschiedene regulatorische Elemente, die für die Transkription in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Gewebetypen verantwortlich sind, und könnte daher eine Gewebespezifität bedingen. Es zeigte sich jedoch eine homogene Verteilung von XL-N-Protein im gesamten Blatt.

Zwischen den transgenen Linien ergaben sich deutliche Unterschiede bezüglich der im Blatt nachweisbaren Mengen rekombinanten N-Proteins und deren Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Blattes und der Pflanze. Dies galt selbst bei einem Vergleich der Linien XL 4.24, XL 7.1 und XL 8.28, die alle nur je eine Kopie des gleichen Konstruktes beinhalten. In den Pflanzen der Linien XL 4.24 und XL 14.1 konnte in einigen Entwicklungsstadien zusätzlich auch Wildtyp-N-Protein gefunden werden, das etwa 20 bzw. 30 % der Menge rekombinanten N-Proteins ausmachte. Cheng und Yeh (2000) erhielten ähnliche Ergebnisse mit Papaya Ringspot Potyvirus-Hüllprotein Konstrukten, die ebenfalls einen künstlichen Leader enthielten und diesen auch exprimierten, wobei jedoch das Wildtyp-Hüllprotein als Nebenprodukt ebenfalls nachweisbar war.

Die Konzentration des rekombinanten Proteins in den Blättern nahm bei allen Pflanzen mit zunehmendem Alter deutlich ab. Der Verlauf dieser Abnahme war in den verschiedenen Linien unterschiedlich. In den Pflanzen der Linien XL 4.24 und XL 7.1 gingen die N-Protein Konzentrationen am schnellsten zurück, in der Linie X 15.1 am langsamsten.

Pang *et al.* (1996) führten mit ihren TSWV-N-transgenen Salat-Pflanzen ebenfalls Messungen des N-Protein Gehaltes über einen längeren Zeitraum und in verschiedenen Blattetagen durch. Das Transgen stand auch in diesen Konstrukten unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors. Die N-Protein Menge zeigte dabei zumeist ebenfalls eine starke Abhängigkeit vom Pflanzenalter, wobei verschiedene Muster festgestellt wurden. Einige Pflanzen wiesen hohe N-Protein Konzentrationen auf, die nur langsam im Laufe der Zeit abnahmen, in anderen Pflanzen stieg die zunächst sehr niedrige N-Protein Konzentration über einige Tage deutlich an, bevor sie dann nach etwa 30 Tagen schnell bis unter die Detektionsgrenze fiel. Ein drittes Muster war durch konstant sehr geringe Messwerte gekennzeichnet. Die letzten beiden Muster zeigten zudem eine sehr starke Abhängigkeit von der Jahreszeit und gingen zum Teil sogar in ganz andere Muster über.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Linien X 15.1 und XL 14.1 entsprechen damit etwa dem ersten Muster der von Pang *et al.* beschriebenen transgenen Salat-Pflanzen. Dagegen entspricht die Linie XL 8.28 eher dem zweiten, XL 4.24 und XL 7.1 dem dritten Muster.

Pang *et al.* (1996) untersuchten auch die Verteilung von N-Protein auf die verschiedenen Blattetagen der transgenen Pflanzen. Bemerkenswerterweise nahmen die von ihnen gemessenen Werte von den unteren (alten) zu den oberen (jungen) Blattetagen hin ab. Dies verhält sich bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten X- und XL-Linien gerade anders herum: in den verschiedenen Blattetagen zeigte sich jeweils eine Reduktion der N-Protein Konzentrationen von den jungen (oberen) zu den alten (unteren) Blättern einer Pflanze.

Van Leeuwen *et al.* (2001) stellten bei Untersuchungen zur räumlichen und zeitlichen Verteilung der Aktivität von CaMV 35S-Promotoren in transgenen Petunien zumeist ebenfalls eine Abnahme der Promotor-Aktivität von jungen zu alten Blättern fest, wobei es jedoch auch Transformanden gab, bei denen sich eine unregelmäßige Verteilung über die Blattetagen ergab, während in einigen Fällen nur eine sehr schwache Abhängigkeit der Aktivität von der Blattetage beobachtet werden konnte. Diese Beobachtungen führten Van Leeuwen *et al.* auf unterschiedliche Integrationsorte des Transgens in das pflanzliche Genom zurück („Positions-Effekt“). Dies beruht auf dem Vorhandensein mehrerer Domänen im CaMV 35S-Promotor, die für die zeitliche und räumliche Regulierung zuständig sind (Benfey *et al.*, 1990 a+b) und von umgebenden Genomabschnitten vermutlich unterschiedlich stark beeinflusst werden können.

Die im Blattmaterial der X- und XL-transgenen Linien zu verschiedenen Zeitpunkten gefundenen Konzentrationen des rekombinanten N-Proteins (3.1.5.4) korrelieren nur mäßig mit den unter 3.1.3 bestimmten relativen Mengen transgener mRNA. Letztere unterschieden sich zwischen den Linien XL 4.24, XL 7.1 und XL 8.28 kaum und zeigten auch nicht die für das N-Protein gefundene deutliche Abnahme in älteren Pflanzen. Allerdings wurde im 7-Blatt Stadium in Übereinstimmung zu den Protein-Messungen eine stets geringere Menge transgener mRNA in den unteren, älteren Blattetagen nachgewiesen. Die Pflanzen der Linien XL 14.1 und X 15.1, die die höchsten N-Protein Konzentrationen zeigten, wiesen im 3-Blatt Stadium auch besonders hohe Mengen transgener mRNA auf, unterschieden sich aber im 7-Blatt Stadium nur noch im Falle der Linie XL 14.1 deutlich von den anderen. Dies könnte einerseits auf die Verwendung des Aktin-Gens als internen Standard, andererseits auf generelle Probleme mit der verwendeten Methode der RT-PCR zur Quantifizierung einer mRNA zurückzuführen sein. Idealerweise sollte diese mit radioaktiver Markierung durchgeführt werden, da Ethidium-Bromid quantitative Aussagen über die detektierte DNA nur in recht begrenztem Maße gestattet. Die Möglichkeiten, eine radioaktive RT-PCR durchzuführen, standen jedoch nicht zur Verfügung. Die nicht-radioaktive Detektion der mRNA im Northern Blot erwies sich für spätere Entwicklungsstadien (sowie für die Linie XL 7.1 zu allen Zeiten) als nicht sensitiv genug, und konnte daher für diesen Zweck nicht eingesetzt werden.

Nach der Charakterisierung der Expression und des Verhaltens von rekombinantem N-Protein in den Pflanzen der verschiedenen Linien wurde die Replikation in Protoplasten und Blattscheiben bzw. -streifen untersucht. Hierfür wurde das Polypeptid-Antiserum AS-338 (2.1.5) verwendet, da das hiermit detektierte NSs-Protein, anders als das N-Protein, nicht in Virionen, also auch nicht im Inokulum, enthalten ist. Sein Vorhandensein im Blatt lässt folglich auf erfolgreiche Replikationsereignisse rückschließen (de Haan *et al.*, 1990; Kormelink *et al.*, 1991). Zudem erwies sich dieses Antiserum in Vorversuchen als sehr viel sensitiver als das N-Protein spezifische Antiserum AS-0580. In den Pflanzen der Linie X 15.1, die das Wildtyp-N-Protein exprimieren, wäre außerdem eine Unterscheidung zwischen pflanzlichem und viralem Genprodukt bei Verwendung eines N-Protein spezifischen Antiserums im Western-Blot-Verfahren nicht möglich gewesen.

Das durch Western-Blot Analysen detektierte NSs-Protein zeigte ein unerwartetes Laufverhalten bei der denaturierenden Gelelektrophorese. Das theoretisch vorhergesagte und *in planta* verifizierte Molekulargewicht des TSWV NSs-Proteins beträgt 52,4 kDa (de Haan *et al.*, 1990; Kormelink *et al.*, 1991). Auf den Western-Blots zu den Versuchen mit Protoplasten und Blattscheiben bzw. -streifen (3.3.1.1, 3.3.1.2 und 3.3.1.3) wurde jedoch stets eine deutliche Doppelbande bei 42,8 und 40 kDa gefunden, die zum Zeitpunkt der Inokulation nicht präsent war. Eine schwache Bande auf der korrekten Höhe wurde nur auf den Western Blots aus den Versuchen zur Inokulation von Protoplasten (3.3.1.1) beobachtet. Wurde Pflanzensaft von systemisch mit TSWV-infizierten Pflanzen als Positivkontrolle eingesetzt (3.3.1.3), so führte dies zur Ausprägung mehrerer Banden, von denen keine in nicht inokulierten Kontrollen gefunden wurde (nicht gezeigt). Die deutlichste Bande lief hierbei auf der Höhe von ca. 50-55 kDa und entsprach damit der erwarteten Größe von 52,4 kDa. Kikkert *et al.* (1997) erhielten bei ihren Versuchen zur Inokulation von Tabak- und Petunien-Protoplasten mit TSWV ebenfalls stets nur eine Bande bei etwa 42 kDa im Western Blot, wenn mit einem NSs-spezifischen Serum detektiert wurde, gehen auf dieses Phänomen jedoch in ihrer Diskussion nicht ein.

Durch Analyse der Aminosäuresequenz des TSWV NSs-Proteins mit Hilfe des Programms „PeptideCutter“ (<http://www.expasy.ch>, Swiss Institute of Bioinformatics) wurde eine Asparaginsäure-Glycin Abfolge (Position 108) gefunden, die durch Hydroxylamin gespalten werden kann (Bornstein und Balian, 1977). Hierdurch würde das Protein in einen 11,8 kDa großen N-terminalen und einen 40,6 kDa großen C-terminalen Teil zerfallen. Da das verwendete Antiserum AS-338 gegen ein Polypeptid am C-terminalen Ende des Proteins gerichtet ist, würde also lediglich das 40,6 kDa große Fragment detektiert werden. Hydroxylamin kommt im zellulären Stoffwechsel vor allem als Intermediat bei der Oxidation von Ammoniak vor, das beim Abbau von Proteinen und anderen Zell-Bestandteilen anfällt (Gross, 1985). Es ist daher denkbar, dass eine Verletzung der Zelle aufgrund solcher Abbauvorgänge zu einer erhöhten Hydroxylamin-Konzentration führt. Dies wäre sowohl in Protoplasten als auch in ausgeschnittenen und oberflächlich intensiv verletzten Blattscheiben der Fall und könnte die beobachteten Größenabweichungen der NSs-Banden

erklären. Es ist in diesem Zusammenhang wichtig zu erwähnen, dass die Aminosäuresequenz des XL-N-Proteins keine Asparaginsäure-Glycin Abfolge aufweist, weshalb dieses Protein von Hydroxylamin nicht gespalten werden kann. Die Annahme einer Hydroxylamin-Spaltung des NS-Proteins kann allerdings nicht mit weitergehenden Daten belegt werden. Es handelt sich also lediglich um eine Hypothese, die das beobachtete Laufverhalten bei der Gelelektrophorese erklären könnte.

Bevor nun eine Hypothese zur Wirkungsweise des modifizierten N-Proteins bei der Resistenz gegen Tosspoviren aufgestellt werden kann, sollen die entscheidenden Ergebnisse zur Replikation und Ausbreitung der Viren in Zellen, Gewebeverbänden und Pflanzen (3.3.1 und 3.3.2) zunächst noch einmal zusammengefasst werden. Eine Übersicht hierzu ist in **Tab. 9** gegeben.

In Pflanzen der Linien XL 4.24, XL 7.1 und XL 8.28 läuft also die virale Replikation im Vergleich zur nicht-transgenen Kontrolle leicht verlangsamt ab, wohingegen bei der Wildtyp-N-exprimierenden Linie X 15.1 eine deutlich stärkere Verlangsamung gemessen wurde. Keine Abweichung gegenüber der nicht-transgenen Kontrolle zeigte die Linie XL 14.1.

Tab. 9: Zusammenfassung der Ergebnisse zu Konzentration rekombinanten Proteins, Replikation, Transport und Resistenz gegenüber verschiedenen Isolaten bei den transgenen Linien.

Linie	Konzentr. rekomb. N-Protein ²	Verhalten bei Inokulation mit TSWV-L3:			Bewertung der Resistenz ¹ bei Inokulation der Pflanzen mit:		
		Replikation ³	Zell-zu-Zell Bewegung ³	Langstrecken transport ³	TSWV L3	TSWV DH37	GRSV SA05
XL 4.24	++	leicht verlangsamt	n.b. ⁴	beeinträchtigt	+	+	++
XL 7.1	+	leicht verlangsamt	verlangsamt	stark beeinträchtigt	++	++	++
XL 8.28	++	leicht verlangsamt	n.b.	stark beeinträchtigt	++	+	++
XL 14.1	+++	normal	n.b.	geringfügig beeinträchtigt	+	+/-	++
X 15.1	+++ (Wildtyp)	stark verlangsamt	normal	normal	+	-	-

¹Bewertung der Resistenz: ++ fast alle Pflanzen ohne Symptome
+ min. noch ca. 80 % der Pflanzen ohne Symptome
+/- nur etwa 20 % der Pflanzen ohne Symptome
- nicht resistent

²Konzentration des rekombinanten N-Proteins über alle Entwicklungsphasen gemittelt und eingeteilt in: +++ hoch
++ mittel
+ gering

³Jeweils im Vergleich zur nicht-transgenen Kontroll-Pflanze

⁴n.b. = nicht bestimmt

Die Migration von TSWV durch 4×1 cm große Blattstreifen lief in Blattmaterial der Linie XL 7.1 gegenüber der nicht-transgenen Kontrolle verlangsamt ab. Bei der Linie X 15.1 ergab sich dieser Effekt nicht. Auch bei der Untersuchung der Ausbreitung von TSWV-L3 in der kompletten Pflanze (3.3.2.3) wurde ein deutlicher Unterschied zwischen der Wildtyp-N-Protein exprimierenden Linie X 15.1 und den Linien XL 4.24, XL 7.1 und XL 8.28, die das Fusionsprotein synthetisieren, festgestellt. In den XL-Linien konnte häufig eine Infektion in den Wurzeln, und damit im Leitgefäßsystem, detektiert werden, die nicht zu einer systemischen Infektion der Blätter führte. Dieser Fall wurde in den Pflanzen der Linie X 15.1 sowie der nicht-transgenen Kontrolle nie beobachtet. Die Pflanzen der Linie XL 14.1 hingegen wiesen gegenüber der nicht-transgenen Kontrolle häufig lediglich eine um ca. 8 Tage verzögerte systemische Ausbreitung auf.

Systemische Infektionen mit dem besonders virulenten TSWV-Isolat DH37 traten bei den Linien XL 8.28, XL 14.1 sowie bei der Wildtyp-N exprimierenden Linie X 15.1 deutlich häufiger auf als bei Inokulation mit dem homologen Isolat TSWV-L3. Insbesondere die Linien XL 14.1 und X 15.1 zeigten gegen Infektionen mit TSWV-DH37 nur noch eine sehr geringe bzw. gar keine Resistenz. Bei Inokulation mit GRSV-SA05 zeigten sich bei den XL-Linien häufiger Infektionen in der Wurzel, und folglich im Leitgefäßsystem, als mit TSWV-L3. Dies führte jedoch nicht zu häufigeren systemischen Erkrankungen der Blätter dieser Pflanzen. Die Beschränkung der Infektion auf das Leitgefäßsystem zeigte sich besonders deutlich an einer Pflanze der Linie XL 8.28, die zwar nekrotische Symptome auch in jungen Blättern zeigte, diese blieben jedoch auf die Blattadern beschränkt und konnten sich nicht, oder nur in sehr geringem Maße, in die Blattspreite ausbreiten.

Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse interpretiert und mögliche Resistenzmechanismen der untersuchten Pflanzen diskutiert werden. Dabei müssen drei Fragen geklärt werden:

- Ist die Resistenz der XL-Linien RNA- oder Protein-vermittelt?
- Wenn eine Protein-vermittelte Resistenz vorliegt, welchen Einfluss hat das Leader-Peptid auf den Resistenzmechanismus?
- Warum wird die Resistenz in den XL-Linien mit hohen Konzentrationen rekombinanten Proteins im Blatt leichter gebrochen als bei den Linien mit niedrigen Konzentrationen?

Die Frage nach RNA- oder Protein-vermitteltem Resistenzmechanismus bei den XL-Linien kann aus den vorliegenden Daten gut beantwortet werden. RNA-vermittelte Resistenz in transgenen Pflanzen wurde bereits in der Einleitung erläutert (1.1.2), sie zeichnet sich vor allem durch Sequenzspezifität aus und wirkt daher nur gegen das homologe Virus-Isolat, also dasjenige aus welchem das Transgen stammt, und gegen sehr nahe verwandte Isolate. RNA-vermittelte Resistenz greift an der Replikation des Virus an und unterbindet diese entweder vollständig oder verlangsamt

sie sehr stark (1.1.2). In manchen Fällen ist sie auch durch eine spätere Erholung der Pflanze von der Infektion gekennzeichnet ("recovery"-Phänotyp).

Die genannten Merkmale treffen auf die XL-Linien nicht zu. Die Verzögerung der Replikation, die in den Pflanzen der Linien XL 4.24, XL 7.1 und XL 8.28 festgestellt wurde, war nur sehr geringfügig und kann die Resistenz der Pflanzen nicht erklären. Wichtiger noch ist die Resistenz der XL-Linien gegen die Spezies GRSV, die mit einem RNA-vermittelten Resistenz-Mechanismus oder durch Expression des unmodifizierten TSWV N-Proteins offenbar nicht erreicht werden kann (vergl. 1.1.2). Es steht also fest, dass die Resistenz der XL-Linien Protein-vermittelt ist und dass die Modifikation des N-Proteins, also das N-terminale Leader-Peptid, eine entscheidende Rolle spielen muss. Gleichwohl kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass RNA-vermittelte Mechanismen ebenfalls einen, wenn auch geringen, Beitrag zur Ausprägung der Resistenz in diesen Pflanzen spielen. Hierauf wird später noch genauer eingegangen.

Auf welche Weise wirkt nun das modifizierte TSWV N-Protein gegen Infektionen mit Tospoviren? Ein signifikanter Einfluss auf die Replikation der Viren ist auszuschließen, da diese dann wesentlich stärker verlangsamt sein müsste, als dies gemessen wurde. Zudem trat diese Verlangsamung in der Linie XL 14.1, die besonders hohe Konzentrationen des rekombinanten Proteins beinhaltet, nicht auf. Folglich kommt eine Inhibition der Interaktion zwischen N-Protein und viraler Replikase als Wirkungsmechanismus nicht in Frage. Mögliche Erklärungen für die geringfügig verlangsamte Replikation in einigen Linien werden weiter unten noch besprochen.

Durch den Nachweis des ungehinderten Einbaus von XL-N-Protein in virale Nukleoprotein-komplexe ist außerdem eine Behinderung der Nukleoprotein-komplex-Bildung durch das rekombinante Protein auszuschließen. Dies ist ein wenig überraschend, da Uhrig *et al.* (1999) herausfanden, dass die Multimerisierung von N-Protein durch die N- und C-terminalen Bereiche des Proteins vermittelt wird, wodurch eine Behinderung durch das N-terminale Leader-Peptid zunächst wahrscheinlich erscheint. Die Ergebnisse von Uhrig *et al.* deuten allerdings darauf hin, dass die äußersten Enden (10 Aminosäuren C-terminal und 22 Aminosäuren N-terminal) nicht an der Multimerisierung teilnehmen. Daher ist es vorstellbar, dass das Leader-Peptid in der Tat keinen Einfluss auf diese Reaktion ausübt. Die Interaktion zwischen N-Protein und viraler RNA findet ebenfalls an den N- und C-terminalen Bereichen des N-Proteins statt (Richmond *et al.*, 1998), wird aber offenbar ebenfalls nicht beeinträchtigt.

Auch eine Behinderung der Interaktion mit den viralen G-Proteinen ist auszuschließen, da auch die Verpackung der Nukleoprotein-komplexe in Virionen nicht durch das Vorhandensein des rekombinanten N-Proteins gestört wird. Bei diesem Vorgang spielen die G-Proteine eine wichtige Rolle (Matsuoka *et al.*, 1991). Eine Wirkung des XL-N-Proteins auf die Bildung von Virionen hätte ohnehin nur eine Bedeutung bei der Transmission und könnte die Resistenz der Pflanzen nicht erklären.

Aus den Versuchen mit 4×1 cm langen Blattstreifen sowie den Beobachtungen zur Ausbreitung in ganzen Pflanzen (3.3.1.3 bzw. 3.3.2.3) hat sich hingegen ein deutlicher Effekt des XL-N-Proteins auf den Transport des Virus durch die Pflanze ergeben. Zwei Erklärungsmodelle bieten sich hier an. Es ist bekannt, dass die Transportform von Tospoviren in der Pflanze nicht die membranumhüllten Virionen sind sondern Nukleoproteinkomplexe (Storms *et al.*, 1995). Da alle Proteine bei Tospoviren von mRNAs, und nicht direkt von genomischer RNA, translatiert werden, müssen stets einige Kopien der viralen Replikase mitgeführt werden, um Replikation und Translation in neu infizierten Zellen zu starten. Diese Replikase-Kopien binden an das N-Protein und werden so von Zelle zu Zelle transportiert (Storms *et al.*, 1995; Inoue-Nagata *et al.*, 1998). Wäre diese Interaktion durch das Leader-Peptid gestört, so würde sich der L-Protein-Gehalt bei der Ausbreitung durch die Pflanze ausdünnen und diese somit verlangsamen. Dies könnte der Pflanze dann die rechtzeitige Etablierung von Schutzmaßnahmen (systemisch erworbene Resistenz, vergl. 1.1.2) erlauben, was möglicherweise schließlich zu einem vollständigen Stopp der Infektion führen könnte. Gegen diese Möglichkeit spricht die bereits erwähnte ungehinderte Interaktion zwischen XL-N- und L-Protein bei der Replikation, wobei andererseits diese beiden Funktionen über vollkommen unterschiedliche Domänen auf dem N-Protein vermittelt werden könnten und folglich nicht korreliert sein müssen.

Plausibler erscheint jedoch die zweite Möglichkeit: eine durch den N-terminalen Leader verursachte Behinderung der Interaktion zwischen XL-N- und NSm-Protein, das für die Bewegung der Nukleoproteinkomplexe über Zellgrenzen hinweg die entscheidende Rolle spielt (Storms *et al.*, 1995). Soellick *et al.* (2000) konnten nachweisen, dass NSm sowohl ssRNA, als auch das N-Protein *in vitro* binden kann. Zudem wurden Bindungen mit DNAJ-ähnlichen Proteinen gefunden, die als Regulatoren von Chaperonen eine Rolle spielen, die wiederum häufig an Transportvorgängen beteiligt sind. Es scheint also ein ganzer Komplex verschiedener Komponenten für den Transport zusammenkommen zu müssen. Hier könnte eine sterische Inhibition durch das Leaderpeptid des XL-N-Proteins ansetzen.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse zur Ausbreitung der Infektion in den Pflanzen der XL-Linien (3.3.2.3) fällt auf, dass zwar in manchen Fällen virale Proteine in den Wurzeln detektiert werden können, dies aber vor allem in den Linien XL 4.24, XL 7.1 und XL 8.28 meist nicht zu einer systemischen Infektion der Blätter führt. Häufig konnten bei erfolgreichem Nachweis von viralem Protein in den Wurzeln auch in den Adern junger Blätter Viren detektiert werden, die aber nicht, oder nur sehr eingeschränkt, ins Mesophyll gelangten. Bei einer mit GRSV inokulierten Pflanze der Linie XL 8.28 konnte dies besonders deutlich beobachtet werden. Hier zeigten sich zwar die für dieses Isolat typischen schweren Nekrosen auch in jungen Blättern, diese blieben jedoch fast vollständig auf die Blattadern beschränkt (**Abb. 21** Abschnitt 3.3.2.1).

Die Detektion viraler Proteine in den Wurzeln und Blattadern ist gleichzusetzen mit einer Infektion des Leitgefäßsystems. Pflanzenviren verbreiten sich, mit wenigen Ausnahmen, in ihren

pflanzlichen Wirten über das Phloem, wobei sie dem Assimilatstrom von der Quelle zum Verbrauchsort ("source to sink") folgen (Hull, 2001). Die beiden wichtigsten Zelltypen dieses Transportsystems sind die Siebzellen, also die eigentlichen "Transportröhren", und die Geleitzellen. Siebzellen verfügen im ausdifferenzierten Zustand über keinen Kern und keinen Translationsapparat mehr. Die für ihre Erhaltung benötigten Proteine werden in den Geleitzellen synthetisiert. Nur dort kann demnach auch virale Replikation und Translation erfolgen. Der Übergang zwischen Sieb- und Geleitzellen ist für die Viren problemlos, da die Größenausschluss-Grenzen ("size exclusion limits", SEL) der dortigen Plasmodesmata besonders hoch liegen (Kempers und van Bel, 1997). In den Fällen, in denen der Eintritt in das Leitgefäßsystem gelang, konnten die Tospoviren auch in den XL-Pflanzen im Transportgewebe, also vermutlich in den Geleitzellen des Phloems, replizieren. Dies wurde durch den Nachweis des G1-Proteins im Leitgewebe bestätigt, das nicht Bestandteil des Nukleoproteins, also der Transportform innerhalb der Pflanze, ist.

Es ist demnach also nicht die Ausbreitung der Tospoviren im Phloem, die in den XL-Pflanzen beeinträchtigt ist, sondern der Zugang zu diesem Transportsystem und der Wiederaustritt ins Mesophyll. Zumindest mit Pflanzen der Linie XL 8.28 konnte dies auch durch direkte Inokulation in das Phloem mittels Pfropfung auf systemisch infizierte Unterlagen bestätigt werden. Die Barriere des Eintritts in das Leitgefäßsystem musste hier von den Viren nicht mehr überwunden werden. Daher traten bei diesen Versuchen wesentlich häufiger systemische Symptome in den oberen Blattetagen auf, als bei mechanischer Inokulation der Blätter. Diese Symptome blieben jedoch wiederum lokal auf die Blattadern beschränkt, konnten das Leitgefäßsystem also offenbar nur mit sehr geringer Effizienz wieder verlassen.

Die Übergänge zwischen Mesophyll und Phloem sind nach Wintermantel *et al.* (1997) und Wang *et al.* (1998) die kritischen Punkte einer systemischen Virus-Infektion. Sie sind bei resistenten Pflanzen häufig unterbrochen oder beeinträchtigt. Dies ist vor allem bei Pflanzen wie *N. tabacum* der Fall, die Makromoleküle apoplastisch in das Phloem laden und daher nur sehr wenige Plasmodesmata zwischen Geleitzellen und Bündelscheiden- bzw. Parenchymzellen besitzen (Ding *et al.*, 1988). Auch bei nicht-resistenten Pflanzen stauen sich Viren an diesem Übergang stark an (Ding *et al.*, 1998).

Obwohl Infektionen im Leitgewebe in den Pflanzen der XL-Linien beobachtet werden konnten, traten diese doch eher selten und unvorhersehbar auf. Es scheint, als wäre ein zufälliges Ereignis bei der Inokulation hierfür verantwortlich. Die mechanische Inokulationen von Blättern mit Hilfe eines Abrasivums und eines stark verdünnten Inokulums (2.2.4.4) führt zur Etablierung von nur wenigen Infektionsherden, die im späteren Verlauf in Form von Lokalläsionen deutlich erkennbar werden. Das zufällige Ereignis, das zu einer Infektion des Phloems führt, könnte daher eine direkte Inokulation des Leitgewebes oder der unmittelbaren Umgebung sein. Auf diese Weise könnte trotz

der starken Behinderung des Übertrittes der Nukleoprotein-Komplexe in das Phloem noch eine ausreichende Anzahl von Viren in das Transportgewebe gelangen. Möglich ist auch, dass primär infizierte Zellen besonders nahe an noch unreifen kleinen Blattadern höherer Ordnung liegen müssen. Diese reifen erst, wenn das Blatt von Assimilat-Import auf -Export umschaltet, und sind vor diesem Ereignis noch nicht vom Mesophyll isoliert (Roberts *et al.*, 1997). Daher können Viren hier besonders leicht eindringen.

Zusammenfassend kann folgende Hypothese für die Wirkung des modifizierten N-Proteins gegen Infektionen mit Tospoviren in den XL-Linien formuliert werden: Das XL-N-Protein wird wie das Wildtyp-N-Protein in Nukleoproteinkomplexe replizierender Tospoviren eingebaut. Es behindert die Replikation nicht oder nur in sehr geringem Maße und hat keinen Einfluss auf die Reifung von Virionen. Es behindert jedoch den Transport der Nukleoproteinkomplexe über Zellgrenzen hinweg, vermutlich durch sterische Inhibition von Interaktionen mit anderen am Transport beteiligten Proteinen, also dem viralen NSm-Protein oder Wirtsfaktoren. Dies zeigt sich in einem verlangsamten Nahtransport und einem fast vollständig blockierten Langstreckentransport durch das Leitgefäßsystem, wobei vor allem die Übergänge in das Phloem und wieder hinaus blockiert werden. Diese Verzögerung der Ausbreitung ermöglicht der Pflanze vermutlich die rechtzeitige Aktivierung von Abwehrmaßnahmen, die die Infektion schließlich vollständig stoppen können. Nach Waterhouse *et al.* (1999) muss ein Virus für eine erfolgreiche systemische Infektion einer Pflanze entweder die wirtseigene Abwehr unterdrücken oder sich schneller in der Pflanze ausbreiten als die pflanzlichen Signale zur systemischen Aktivierung der Abwehr (systemisch erworbene Resistenz, vergl. 1.1.2).

Wenn das modifizierte N-Protein diese Wirkung hat, warum besteht dann aber keine positive Korrelation zwischen der Konzentration rekombinanten Proteins und der Ausprägung der Resistenz in den verschiedenen XL-Linien?

Um diese Frage klären zu können, soll zunächst die Linie X 15.1 näher betrachtet werden, da hier ein interessantes Phänomen beobachtet wurde, das wichtige Indizien liefert.

Die Linie X 15.1 exprimiert das unmodifizierte TSWV N-Protein und weist in fast allen Entwicklungsstadien eine höhere Konzentration des rekombinanten Proteins auf als alle XL-Linien. Die Pflanzen dieser Linie zeigten nur gegen das homologe Isolat TSWV-L3 Resistenz, die zudem häufig gebrochen wurde.

Interessanterweise führten Inokulationen von Pflanzen der Linie X 15.1 mit der Spezies GRSV zu einer heftigeren und schnelleren Symptomausprägung als in den nicht-transgenen Kontrollpflanzen. Dieses Phänomen ist bislang in der Literatur für Tospoviren in N-transgenen Pflanzen nicht beschrieben worden, trat im Laufe der Untersuchungen jedoch immer wieder auf. Es bieten sich zwei mögliche Erklärungen hierfür an: (i) das TSWV N-Protein interagiert effizienter mit

einigen GRSV-Komponenten (z.B. Replikase oder NSm-Transportprotein) als das GRSV N-Protein oder (ii) das bereits vor der Inokulation in großen Mengen vorhandene N-Protein behindert die natürlichen Resistenzmechanismen der Pflanze, vor allem das post-transkriptionale "gene-silencing" (PTGS, vergl. 1.1.2).

Ersteres kann zwar nicht widerlegt werden, es ist jedoch eher unwahrscheinlich, dass Komponenten aus verschiedenen Spezies besser interagieren als Komponenten aus dem selben Isolat. Über die zweite Möglichkeit gibt es zwar noch keine Daten in der Literatur, es spräche jedoch einiges für diese Annahme. So wurde im Laufe der Untersuchungen immer wieder beobachtet, dass auch die nicht-transgenen *N. tabacum* cv. Samsun NN-Kontrollpflanzen bei Infektionen mit GRSV deutlich schwächere Symptome zeigten als, ebenfalls nicht-transgene, *N. tabacum* cv. Nevrokop-Pflanzen, die für die Vermehrung des Virus benutzt wurden. Während letztere 14-20 Tage nach Inokulation normalerweise vollkommen abgestorben und verkümmert waren, standen die *N. tabacum* Samsun NN-Pflanzen, obwohl auch sie schwere Nekrosen entwickelten, nach dieser Zeit noch aufrecht, besaßen noch einige grüne Blätter und bildeten sogar noch junge Blätter aus. Außerdem wurde bei nicht-transgenen *N. tabacum* Samsun NN-Kontrollpflanzen oft eine Erholung von TSWV-Infektionen, also das Ausbilden gesunder Blätter nach anfänglicher systemischer Infektion durch das Virus, beobachtet. Dieser sogenannte "recovery"-Phänotyp steht nach Al-Kaff *et al.* (1998) mit dem "gene-silencing"-Abwehrmechanismus der Pflanze in Verbindung. Er wurde bei Nevrokop-Pflanzen nur selten beobachtet. Es scheint also, als wäre der "gene-silencing"-Mechanismus in den Pflanzen des Kultivars Samsun NN aktiver als in denen des Kultivars Nevrokop, was normalerweise zu einer Abschwächung der Infektion führt und sich besonders bei GRSV-Infektionen bemerkbar macht. Dass "gene-silencing" nicht nach einem "Alles oder Nichts"-Schema abläuft, sondern auch lediglich zu einer Reduktion (viraler) Ziel-RNA führen kann, und damit zu einer Abschwächung der Infektion, ohne diese ganz zu stoppen, ist durch Beobachtungen an transgenen Pflanzen bereits bewiesen (Seymour *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1990; Boerjan *et al.*, 1994). In den transgenen Samsun NN-Pflanzen der Linie X 15.1 könnte das exprimierte TSWV N-Protein also zu einer Behinderung des pflanzeigenen "gene-silencing"-Mechanismus führen, wodurch die schwereren Symptome bei Infektion mit GRSV erklärlich wären. Auch die Resistenzen der verschiedenen XL-Linien könnten unter dieser Annahme besser erklärt werden. Dies soll weiter unten geschehen.

Virale Proteine, die das "gene-silencing" unterdrücken, sind vor allem bei Potyviren bekannt (Kasschau und Carrington, 1998). Doppelinfektionen einer Pflanze mit einem Potyvirus und einem Nicht-Potyvirus führen in vielen Fällen zu einer deutlich erhöhten Aktivität des letzteren, das von der Behinderung des PTGS durch das Potyvirus profitiert. Dieses Phänomen wird als Synergismus bezeichnet (Hull, 2001) und wurde bereits 1967 von Damirdagh und Ross bei Doppelinfektionen von Potato Virus-Y und Potato Virus-X in Tabak, und seitdem mit vielen anderen Kombinationen, beschrieben (Wang *et al.*, 2002). Vance *et al.* (1995) konnten diesen Effekt auch in transgenen

Pflanzen mit dem potyviralen Hc-Pro Gen erzeugen. Umgekehrt wurde auch bereits bewiesen, dass RNA-vermittelte Resistenzen transgener Pflanzen durch vorherige Infektion mit einem PTGS-unterdrückenden Potyvirus gebrochen werden können (Savenkov und Valkonen, 2001).

Einen Hinweis auf eine mögliche Unterdrückung von "gene-silencing" durch Tospoviren könnte die Beobachtung liefern, dass bei Doppelinfektionen mit TSWV und einem Potyvirus (PMV) das Tospovirus, anders als in Versuchen mit Vertretern vieler anderer Genera, keine erhöhte Aktivität zeigte (Hoffmann *et al.*, 1998). Dass TSWV von der Behinderung des pflanzlichen PTGS-Mechanismus durch das Potyvirus nicht profitiert, wäre verständlich, wenn man annimmt, dass Tospoviren selbst bereits über PTGS-hemmende Komponenten verfügen, so dass für sie kein Unterschied zwischen alleiniger Infektion und Doppelinfektion mit einem Potyvirus bestünde. Es gibt allerdings bislang keine Angaben in der Literatur über mögliche "gene-silencing"-unterdrückenden Proteine bei Tospoviren.

Im Folgenden soll nun von der Hypothese ausgegangen werden, dass das TSWV N-Protein die pflanzeigene Abwehr (PTGS) schwächen kann und dies auch für das modifizierte XL-N-Protein gilt, das damit gleichzeitig eine positive und eine negative Wirkung in Bezug auf Infektionen mit Tospoviren ausüben würde.

Die Resistenzen der transgenen Linien werden nun einzeln unter diesem Aspekt charakterisiert.

Linie X 15.1: Hierbei handelt es sich um die einzige Linie, die das Wildtyp-N-Protein exprimiert. Die N-Protein Konzentration in dieser Linie war im Vergleich zu den XL-Linien in allen Entwicklungsstufen stets besonders hoch. Diese Linie zeigte nur Resistenz gegen das homologe Isolat TSWV-L3, nicht gegenüber TSWV-DH37 und sogar eine Intensivierung der Infektion mit GRSV-SA05 gegenüber der nicht-transgenen Kontrolle.

Während die Resistenz transgener Pflanzen mit niedrigem Gehalt an N-Protein und transgener mRNA mittlerweile recht gut erforscht ist und auf PTGS zurückgeführt werden kann, ist die Resistenz von Pflanzen mit hohem N-Protein Gehalten noch nicht befriedigend erklärt worden. Die ursprünglich von Gielen *et al.* (1991) vorgeschlagene Blockierung viraler RNA durch die in "antisense"-Orientierung stehende transgene mRNA wurde bislang allerdings nicht widerlegt. Die Hybridisierung von viraler RNA mit transgener mRNA könnte letztlich auch den PTGS-Mechanismus aktivieren, da doppelsträngige RNA vermutlich einer der wichtigsten Auslöser dieses Systems ist (Waterhouse *et al.*, 1998). Durch die "antisense"-Blockierung oder das "gene-silencing" würde die Replikation verlangsamt werden, was sich auch in den Ergebnissen mit 1 cm² großen Blattscheiben zeigte (3.3.1.2). Dies könnte der Pflanze die Gelegenheit zur rechtzeitigen Aktivierung von Abwehrmechanismen geben, wodurch eine systemische Erkrankung in den meisten Fällen verhindert werden könnte.

Trotz einer Homologie der N-Gen-Sequenzen der Isolate L3 und DH37 von 98 % scheint dieser Schutz gegen das Isolat DH37 jedoch zu versagen. Ein ähnliches Ergebnis beschreiben Pang *et al.* (1994). Sie stellten fest, dass das besonders virulente Isolat TSWV-10W die Resistenz von Pflanzen mit hohem TSWV N-Protein Gehalten stets brechen konnte, obwohl diese gegen das homologe Isolat (TSWV-BL, Homologie: 99 %) eine, wenn auch schwache, Resistenz aufwiesen. Genaue Daten über den molekularen Mechanismus der Resistenzbrechung durch besonders virulente Isolate stehen zur Zeit noch nicht zur Verfügung.

Gegen GRSV wurden mit TSWV N-transgenen Pflanzen noch niemals eine Resistenz erzielt. Dies bestätigte sich auch in diesem Fall. Vaira *et al.* (1995) beobachteten lediglich eine Verzögerung der GRSV Infektion bei einigen TSWV N-transgenen Pflanzen, die besonders wenig rekombinantes Protein exprimierten. Wie bereits in 1.1.2 beschrieben, hat sich inzwischen herausgestellt, dass die meisten bisher gegen Tospoviren erzielten Resistenzen transgener Pflanzen RNA-vermittelt sind und nicht auf der Anwesenheit eines rekombinanten Proteins beruhen. Die Homologie zwischen den N-Proteinen von TSWV und GRSV beträgt 79 % und ist in funktionellen Bereichen, die meist stärker konserviert sind, wahrscheinlich noch größer. Aufgrund dieser Ähnlichkeit hat das TSWV N-Protein vermutlich keine störende Wirkung auf Replikation und Ausbreitung von GRSV. Für eine RNA-vermittelte Resistenz reichen die Sequenz-Homologien zwischen TSWV und GRSV jedoch offensichtlich nicht aus, dies bestätigten auch Pang *et al.* (1992 und 1994). Wenn also weder die transgene mRNA noch das rekombinante Protein einen nennenswerten Einfluss auf die Infektion mit GRSV haben, das N-Protein aber sogar die pflanzeneigene Abwehr hemmen kann, sind die besonders schweren Symptome auf Pflanzen der Linie X 15.1 bei GRSV-Infektion verständlich.

Linie XL 14.1: Die Pflanzen dieser Linie exprimieren, wie alle Pflanzen der XL-Linien, das N-terminal durch ein Leader-Peptid vergrößerte TSWV N-Protein. In den Pflanzen der Linie XL 14.1 wurde dies stets in besonders hohen Konzentrationen gefunden. Die Resistenz dieser Linie gegen das homologe Isolat TSWV-L3 wurde bei jeweils einer von fünf, gegen TSWV-DH37 sogar bei vier von fünf Pflanzen gebrochen. Gegen GRSV-SA05 bestand hingegen in allen Fällen Resistenz. Nach der oben aufgestellten Argumentation müsste auch in dieser Linie, so wie bei X 15.1, die pflanzeneigene Abwehr durch die relativ hohe Konzentration rekombinanten Proteins behindert werden. Dies wird hier allerdings durch die Störung des viralen Transportes durch die Pflanze, die durch das Leader-Peptid des XL-N-Proteins vermittelt wird, größtenteils kompensiert. Die, im Gegensatz zu den Linien XL 4.24, XL 7.1 und XL 8.28, nicht verlangsamte Replikation von TSWV-L3 in Blattscheiben dieser Linie könnte ein zusätzlicher Hinweis darauf sein, dass der "gene-silencing"-Mechanismus, mit dem die Pflanze normalerweise auf Infektion reagieren würde, in den Pflanzen dieser Linie durch die hohe Konzentration rekombinanten Proteins in der Tat behindert wird. Diese Störung des pflanzeneigenen Abwehrmechanismus könnte erklären, warum

die Resistenz gegen das Isolat DH37 in den Pflanzen der Linie XL 14.1 so schlecht ausfällt. Vermutlich kann eine Infektion mit diesem besonders virulenten Isolat nur erfolgreich abgewehrt werden, wenn gentechnisch erzeugte und natürliche Resistenz gemeinsam wirken. Dies wird unten noch genauer erläutert. Bei dieser Linie kommt noch hinzu, dass zumindest in einigen Entwicklungsstadien neben dem modifizierten auch das Wildtyp-N-Protein translatiert wird (3.1.5.1). Dieses würde zur Störung des pflanzlichen Abwehrmechanismus beitragen, ohne die Wirkung des XL-N-Proteins auf den Transport der Tospoviren zu besitzen.

Gegen GRSV-SA05 reicht offenbar die durch das XL-N-Protein vermittelte Behinderung des Transportes bereits für eine sehr stabile Resistenz in den Pflanzen dieser Linie aus.

XL 7.1: Diese Linie zeigt stets die geringsten Konzentrationen rekombinanten Proteins und unterscheidet sich im Resistenzverhalten besonders deutlich von der Linie XL 14.1. Gegen alle drei getesteten Tospoviren war die Resistenz der Pflanzen der Linie XL 7.1 besonders gut, lediglich bei einer Pflanze wurden lokal begrenzte systemische Symptome mit TSWV-L3 gefunden, mit den anderen Tospoviren wurden niemals erfolgreiche Infektionen beobachtet. In Protoplasten und Blattscheiben wurde eine leichte Verzögerung der Replikation, in Blattstreifen eine Verlangsamung des Zell-zu-Zell Transportes, gemessen. Tissue Print Immunoblots der systemisch mit TSWV-L3 infizierten Pflanze ergaben eine klare Begrenzung der Viren auf die Wurzeln und Blattadern, also auf das Leitgefäßsystem.

In dieser Linie scheint das rekombinante Protein in optimaler Konzentration vorzuliegen. Es genügen offenbar bereits wenige Kopien pro RNA-Segment, um den Transport über Zellgrenzen hinweg signifikant zu stören. Dies deutete sich auch durch die Ergebnisse zur Inokulation älterer Pflanzen aller Linien an (3.3.2.2), die trotz abnehmender Konzentrationen rekombinanten Proteins in den Blättern keine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen zeigten. Möglicherweise bleiben Nukleoproteinkomplexe schon mit einer einzigen Kopie des vergrößerten N-Proteins in den Desmotubuli regelrecht hängen. Der genaue Ablauf dieses "Durchschleusens" ist bislang noch nicht untersucht. Durch die geringe Konzentration ist der postulierte inhibitorische Effekt auf die pflanzeneigene Abwehr, also das "gene-silencing", minimal. So können beide Mechanismen gleichzeitig arbeiten und eine besonders effiziente Resistenz erzeugen, die sogar gegen das besonders virulente Isolat DH37 einen vollkommenen Schutz ermöglicht. Wie das Beispiel der Linie XL 14.1 zeigt, ist dies durch das rekombinante Protein allein nicht möglich. Das Zusammenspiel von transgener und pflanzeneigener Resistenz könnte in etwa so aussehen: Durch den Einfluss des XL-N-Proteins breitet sich die Infektion deutlich langsamer durch die Pflanze aus als in nicht-transgenen Pflanzen. Dies ermöglicht der Pflanze die rechtzeitige Mobilisierung der eigenen Abwehr ("systemisch erworbenen Resistenz", vergl. 1.1.2). Es wurde oben schon erwähnt, dass ein Virus für eine erfolgreiche Infektion entweder die wirtseigenen Abwehrmaßnahmen ausschalten,

oder sich schneller als die Abwehr-induzierenden Signale in der Pflanze ausbreiten muss (Waterhouse *et al.*, 1999).

Die Resistenz der Linie XL 7.1 hat also offenbar neben dem Protein-vermittelten auch einen RNA-vermittelten Anteil. Für diese Annahme spricht auch die, wenn auch geringe, Verlangsamung der Replikation von TSWV in Protoplasten und Blattscheiben dieser Linie sowie der Linien XL 4.24 und XL 8.28, nicht aber bei XL 14.1. Ein rein RNA-vermittelter Mechanismus kann andererseits aufgrund der Resistenz gegen GRSV ausgeschlossen werden. Germundsson *et al.* (2002) beschrieben Versuche mit Hüllprotein-vermittelter Resistenz gegen *Potato Mop-Top Pomovirus* (PMTV) in Tabak und Kartoffel, die ebenfalls ein Zusammenwirken von RNA- und Protein-vermittelter Resistenz vermuten ließen.

Ob die transgene mRNA in der Linie XL 7.1 bereits in frühen Stadien das PTGS der Pflanze aktiviert, was dann zu den geringen Mengen rekombinanten Proteins führen würde, ist unklar. Da aber ein bereits vor der Inokulation etabliertes "gene-silencing" viraler Sequenzen zu einer wesentlich intensiveren Behinderung der Replikation führen sollte als gemessen wurde, ist dies eher unwahrscheinlich. Das "gene-silencing" wird also vermutlich erst durch das Überschreiten eines Schwellenwertes durch die Summe transgener mRNA und viraler RNA während der Replikation der Tospoviren ausgelöst. Eine solche Auslöseschwelle für das „gene-silencing“ wurde von Dougherty und Parks (1995) diskutiert.

XL 4.24 und XL 8.28: Diese beiden Linien liegen sowohl mit ihren jeweiligen Expressionsniveaus als auch mit den Qualitäten der Resistenz zwischen den Linien XL 7.1 und XL 14.1.

Nach dem oben diskutierten möglichen Zusammenspiel zweier Mechanismen (Behinderung des viralen Transportes durch das XL-N-Protein und pflanzeigene Abwehr) könnte dies folgendermaßen gedeutet werden: Mit zunehmendem N-Protein-Gehalt wird der wirtseigene Abwehrmechanismus des "gene-silencing" zunehmend stärker gestört. Gleichzeitig nimmt der Schutz, der durch das XL-N-Protein verliehen wird, zu. Bei der Linie XL 4.24 äußert sich dies in einem moderaten Resistenzverhalten gegenüber allen getesteten Tospoviren. In den Pflanzen der Linie XL 8.28 vermittelt die hohe Konzentration des rekombinanten Proteins einen wesentlich besseren Schutz gegen das homologe Isolat sowie die Spezies GRSV. Ähnlich wie oben für XL 14.1 diskutiert, führt die postulierte Inhibition des wirtseigenen PTGS-Mechanismus durch den hohen Gehalt an rekombinantem Protein aber dazu, dass die Pflanzen gegenüber Infektionen mit dem besonders virulenten Isolat TSWV-DH37 einen deutlich geringeren Schutz aufweisen, als die Pflanzen der Linie XL 7.1.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit der Literatur ist nur bedingt möglich, da Daten zu Resistenzen durch modifizierte Hüllproteine bislang kaum vorliegen. Da jedoch andererseits in vielen Publikationen lediglich eine quantitative Bewertung der Expression des rekombinanten Proteins mit Hilfe

des "Enzyme-linked Immunosorbent Assay" (ELISA) beschrieben wurde, ist es durchaus vorstellbar, dass einige der beschriebenen Resistenzen, wie im Falle der XL-Linien, auf zunächst unbeabsichtigte Expression modifizierter Hüllproteine beruhen, diese Modifikationen jedoch nicht bemerkt wurden.

Gentechnische Konstrukte enthalten häufig 5'-Leadersequenzen als Transkriptionsverstärker, bzw. um die offenen Leserahmen von RNA-Viren für die Transkription von pflanzlicher genomischer DNA mit einer 5'-Promotorregion auszustatten, die dem viralen Genom fehlt. Start-Codons im selben Leserahmen wie das zu exprimierende Gen können dann sowohl durch die Promotor- oder Leader-Sequenzen selbst, als auch durch Reste von Klonierungsvektoren (Linker-Sequenzen), möglicherweise unbeabsichtigt, eingebracht werden. In manchen Fällen ist ein künstliches Start-Codon sogar unumgänglich. Dies gilt beispielsweise für Konstrukte zur Expression von Hüllproteinen aus Potyviren, die durch die besondere Genomorganisation dieser Viren über kein eigenes Start-Codon verfügen (Allison *et al.*, 1985).

Stoeva *et al.* (1998) verwendeten die gleichen XL-N-Konstrukte, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden (2.1.1), transformierten damit jedoch keine *N. tabacum* cv. Samsun NN-Pflanzen sondern eine Vielzahl anderer *N. tabacum* Kultivare, u.a. das Kultivar Nevrokop. Zu der Zeit war noch nicht bekannt, dass diese Konstrukte ein N-terminal verlängertes N-Protein exprimieren könnten. Daher wurde die Expression lediglich mittels ELISA gemessen, weshalb die Modifikation auch im Laufe der Untersuchungen nicht entdeckt wurde. In Feld- und Gewächshaus-Versuchen erwiesen sich einige Linien als stark resistent gegen Tosspoviren, wobei die Menge detektierbaren N-Proteins in der Pflanze keinen Einfluss auf den Resistenzphänotypen hatte. Da jedoch nicht bekannt ist, welche dieser Linien tatsächlich das Leader-Peptid exprimieren, lassen sich die Ergebnisse nicht mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichen.

Einer der wenigen Berichte über gentechnische Konstrukte mit einem modifizierten Hüllprotein zeigt einige interessante Parallelen zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Dolja *et al.* (1994 und 1995) produzierten Defekt-Mutanten des *Tobacco Etch Potyvirus* (TEV), bei denen jeweils einige Aminosäuren am N- oder C-Terminus des Hüllproteins deletiert waren. Primäre Replikation und Enkapsidierung verliefen bei den Defekt-Mutanten ungehindert, der Zell-zu-Zell Transport durch inokulierte Blätter lief jedoch verlangsamt ab. Der Ferntransport durch das Leitgefäßsystem war sogar komplett ausgeschaltet. In transgenen Pflanzen, die intaktes Hüllprotein exprimierten, konnte der Zell-zu-Zell Transport der N- und C-terminalen Defekt-Mutanten normalisiert werden, nicht aber der Langstreckentransport. Da die N- und C-terminalen Enden nach Allison *et al.* (1985) auf der Oberfläche der Virionen von Potyviren liegen, wird eine Interaktion mit anderen viralen oder Wirts-Komponenten an dieser Stelle vermutet. Diese Experimente mit Hüllprotein-defekten Potyvirus-Mutanten, vor allem aber die durchgeführten Komplementations-Experimente mit Defekt-Mutanten des Virus in transgenen Pflanzen, die das intakte Hüllprotein

exprimieren, haben große Ähnlichkeit mit den in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Abläufen von Replikation und Ausbreitung von TSWV in Pflanzen, die ein "defektes" Hüllprotein (XL-N) exprimieren. In beiden Fällen liegen defekte und intakte Hüllproteine nebeneinander in den Zellen vor, wobei die defekten Proteine jeweils durch Manipulationen der Enden gekennzeichnet sind. Im Falle der XL-N transgenen Pflanzen ist dies eine N-terminale Erweiterung, in den Versuchen von Dolja *et al.* eine N- oder C-terminale Deletion. Die zwei wichtigsten Unterschiede zwischen beiden Ansätzen sind zum einen die Verwendung verschiedener Viren aus unterschiedlichen Familien zum anderen die Tatsache, dass in einem Fall die Pflanze das defekte Protein liefert, in dem anderen hingegen das Virus selbst manipuliert wurde. Dies wirkt sich vor allem in frühen Phasen der Infektion von Zellen aus, da die von den Pflanzen synthetisierte Form des jeweiligen Hüllproteins dann in wesentlich größeren Mengen vorliegt als die Virus-codierte Form. Dennoch zeigen die Ergebnisse deutliche Übereinstimmungen. In beiden Fällen ist die primäre Replikation in infizierten Zellen nicht, der Zell-zu-Zell Transport leicht, und der Langstreckentransport durch das Phloem stark beeinträchtigt bzw. vollständig ausgeschaltet.

Es steht also fest, dass Konstrukte mit modifizierten viralen Genen ein großes Potential für die Gewinnung neuartiger transgener Virusresistenzen haben, die sich durch eine bislang nicht erreichbare Breitbandresistenz auszeichnen. Dies beweisen die XL-Linien, die eine zuvor bei TSWV N-transgenen Pflanzen nicht beobachtete Resistenz gegen die Spezies GRSV besitzen. Es existieren bislang jedoch noch zu wenig Daten, um eine umfassende Theorie zu diesem Phänomen formulieren zu können.

Ausblick

Es wurden Möglichkeiten diskutiert, wie die Wirkungsweise modifizierter Hüllproteine in resistenten transgenen Pflanzen erklärt werden könnte. Die hier vorgestellten Hypothesen müssten nun durch weitere Experimente überprüft werden.

Aus den vorliegenden Daten kann bereits mit Sicherheit abgeleitet werden, dass es vor allem die systemische Ausbreitung der Tospoviren in den XL-N-transgenen Pflanzen ist, die durch das veränderte N-Protein behindert wird. Es ergab sich jedoch keine einfache Beziehung zwischen der Menge exprimierten Proteins und der Resistenz. Der hierzu diskutierte Einfluss des N-Proteins auf pflanzliche Abwehrmechanismen ist bislang noch nicht geklärt und bedarf einer genaueren Untersuchung.

Die mögliche Wirkung von N-Protein auf das PTGS könnte zum Beispiel in transgenen Pflanzen untersucht werden, die durch Überexpression des GFP-Reportergens und das dadurch ausgelöste "gene-silencing" kein GFP mehr synthetisieren. Durch Infektion mit TSWV oder Injektion gereinigten N-Proteins müsste dann das PTGS blockiert und die GFP-Synthese wieder ermöglicht werden.

Um den Mechanismus der Resistenz durch das N-terminale modifizierte N-Protein weitergehend zu untersuchen, sollten die XL-N- und N-Konstrukte verändert werden. So könnte etwa das N-Gen von TSWV gegen dasjenige von GRSV ausgetauscht werden. Pflanzen mit hohem Gehalt an Wildtyp-N-Protein müssten dann gegen GRSV resistent, gegenüber TSWV-Isolaten aber anfällig sein. Die entsprechenden XL-Konstrukte müssten sich hingegen ähnlich verhalten wie die TSWV-Konstrukte, die in dieser Arbeit untersucht wurden, also vor allem bei niedrigen Expressionsniveaus eine stabile Resistenz gegen TSWV und GRSV aufweisen.

Auch die Leader-Sequenz, hier vor allem die translatierte Polylinker-Sequenz aus dem Klonierungsvektor, sollte ausgetauscht werden. Auf diese Weise könnte geprüft werden, ob die beobachteten Effekte des Leader-Peptids von dessen Sequenz abhängen oder es tatsächlich nur um eine sterische Inhibition von Protein-Interaktionen geht. Um letzteres genauer eingrenzen zu können, wären auch Konstrukte mit unterschiedlich großem Leader-Peptid von Interesse.

Schließlich sollten auch Versuche mit Hüllproteinen von Viren anderer Genera unternommen werden, deren Gene anstelle des TSWV N-Gens im XL-Konstrukt eingesetzt werden sollten. Möglicherweise lässt sich dieser Mechanismus auch auf andere Viren übertragen und führt dort ebenfalls zu einer Breitbandresistenz, so wie in den XL-Konstrukten gegen Tosspoviren.

5 Zusammenfassung

Der Mechanismus der TSWV-Resistenz von fünf transgenen Tabak-Linien, bezogen von der AG P. Schreier (Bayer AG), wurde untersucht. Eine dieser Linien enthielt lediglich das Wildtyp-N Gen aus TSWV-L3 (N-Konstrukt), die vier anderen eine Modifikation davon mit einer 5'-Leader Sequenz (XL-N-Konstrukt). Die Translation des 5'-Leaders in ein N-terminales Peptid sowie dessen Lage auf der Oberfläche des Fusionsproteins konnte nachgewiesen werden. Der Einbau des rekombinanten Proteins in virale Nukleoproteinkomplexe konnte ebenfalls demonstriert werden. Die zeitliche und räumliche Verteilung der Expression in den Pflanzen wurde untersucht. Es ergab sich eine deutliche Abhängigkeit der Konzentration rekombinanten N-Proteins vom Alter der Pflanze und des Blattes. Replikation und Ausbreitung von Tosspoviren wurden in Einzelzellen, Gewebeverbänden und Pflanzen verfolgt. Dabei ergab sich in Pflanzen der Linien mit dem XL-Konstrukt eine geringfügig verlangsamte Replikation, ein ebenfalls verlangsamter Transport der Viren durch Blätter und eine starke Beeinträchtigung des Langstreckentransportes durch die Pflanzen. Im Gegensatz zur Linie mit dem N-Konstrukt zeigten die XL-N-Pflanzen Resistenz gegen das besonders virulente TSWV-Isolat DH37 sowie gegen die Spezies GRSV. Eine solche Breitband-Resistenz wurde bei TSWV-N-transgenen Pflanzen in der Literatur bislang nicht beschrieben.

Diese Resistenz scheint durch eine sterische Behinderung der Interaktion zwischen modifiziertem N-Protein und dem Transport-Protein NSm hervorgerufen zu werden. Hierdurch wird offenbar vor allem der Übergang in das Leitgefäßsystem und wieder heraus gestört. Eine mögliche hemmende Wirkung des TSWV-N-Proteins auf den natürlichen Abwehrmechanismus der Pflanze wird ebenfalls diskutiert. Dieser könnte erklären, warum trotz eines eindeutig Protein-vermittelten Resistenzmechanismus höhere Expressionsniveaus des rekombinanten Proteins zu einer Verschlechterung der Resistenz führen.

Summary

Five transgenic tobacco-lines obtained from P. Schreier (Bayer AG) were analysed for their mechanisms of TSWV-resistance. One of these lines contained only the wildtype-N gene of TSWV-L3 (N-construct), the other four carried a modification thereof containing a 5'-leader sequence (XL-N-construct). The translation of this leader into an N-terminal peptide as well as its localization on the surface of the resulting fusion-protein was confirmed. Integration of recombinant protein into viral nucleoprotein-complexes could also be demonstrated. Temporal and spatial distribution of recombinant protein was monitored. This revealed a strong dependence of recombinant protein concentration on plant and leaf age. Replication and spread of tospoviruses were analysed in single cells, tissues and whole plants. Those lines transformed with the XL-N-construct showed a slight slow-down in replication, a slower cell-to-cell movement and a strong impairment of long-distance transport of TSWV. In contrast to the one line expressing only wildtype-N-protein, the XL-N-plants exhibited resistance against highly aggressive TSWV-isolate DH37 and the species GRSV. Such a broad-spectrum resistance was never described before for TSWV-N-transgenic plants.

This resistance seems to be caused by steric inhibition of interactions between N-protein and movement-protein NSm. This interfered especially with phloem entry and exit of the virus, which seemed to be blocked very efficiently.

A possible function of TSWV-N-protein as gene-silencing suppressor is also discussed. This hypothesis was derived from the observation that inoculation of plants expressing only wildtype-N-protein with GRSV led to faster appearance of systemic symptoms which were also much more severe than those of non-transgenic control plants. This could explain the observation, that higher expression-levels of recombinant protein weaken the resistance against tospoviruses conferred by the XL-N-construct, although this resistance is clearly protein-mediated.

6 Literatur

- Adam G, Lesemann DE, Vetten HJ (1991): Monoclonal antibodies against *tomato spotted wilt virus*: Characterization and application. *Ann. Appl. Biol.* **118**: 87-104
- Adam G, Kegler H (1994): *Tomato spotted wilt virus* and related tospoviruses. *Arch. Phytopath. Pflanz.* **28**: 483-504
- Adkins S, Choi TJ, Israel BA, Bandla MD, Richmond KE, Schulz KT, Sherwood JL, German TL (1996): *Baculovirus* expression and processing of *tomato spotted wilt tospovirus* glycoproteins. *Phytopathology* **86**: 849-855
- Al-Kaff NS, Covey SN, Kreike MM, Page AM, Pinder R, Dale PJ (1998): Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* **279**: 2113-2115
- Allison RF, Sorenson JG, Kelly ME, Armstrong FB, Dougherty WG (1985): Sequence determination of the capsid protein gene and flanking regions of *tobacco etch virus*: Evidence for the synthesis and processing of a polyprotein in potyvirus genome expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 3969-3972
- Baulcombe DC (1996): Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**: 179-188
- Benfey PN, Ren L, Chua NH (1990 a): Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J.* **9**(6): 1677-1684
- Benfey PN, Ren L, Chua NH (1990 b): Combinatorial and synergistic properties of CAMV 35S enhancer subdomains. *EMBO J.* **9**(6): 1685-1696
- Boerjan W, Bauw G, van Montagu M, Inze D (1994): Distinct phenotypes generated by overexpression and suppression of S-adenosyl-L-methionine synthetase reveal developmental patterns of gene silencing in tobacco. *Plant Cell* **6**: 1401-1414
- Bornstein P, Balian G (1977): Cleavage at Asn-Gly bonds with Hydroxylamine. *Method. Enzymol.* **47**: 132-144
- Broadbent L (1976): Epidemiology and control of *tomato mosaic virus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **14**: 75-95

- Callaway A, Giesman-Cookmeyer D, Gillock ET, Sit TL, Lommel SA (2001): The multi-functional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**: 419-460
- Carrington JC, Freed DD (1990): Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J. Virol.* **64**(4): 1590-1597
- Cheng YH, Yeh SD (2000): Construction and evaluation of transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of *papaya ringspot virus* with different translation leaders. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **41**: 1-10
- Clark MF, Adams AN (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**(3): 475-483
- Costa AS, Muller GW (1980): Tristeza control by cross protection: An U. S.-Brazil cooperative success. *Plant Dis.* **64**: 538-541.
- Covey SN, Al-Kaff NS, Langara N, Turner DS (1997): Plants combat infection by gene silencing. *Nature* **385**: 781-782
- Damirdagh IS, Ross AF (1967): A marked synergistic interaction of *potato viruses X* and *Y* in inoculated leaves of tobacco. *Virology* **31**(2): 296-307.
- De Avila AC, de Haan P, Kormelink R, Resende R de O, Goldbach RW, Peters D (1993): Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *J. Gen. Virol.* **74** (2): 153-159
- De Haan P, Wagemakers L, Peters D, Goldbach R (1990): The S RNA segment of *tomato spotted wilt virus* has an ambisense character. *J. Gen. Virol.* **71**(5): 1001-1007
- De Haan P, Kormelink R, Resende R de O, van Poelwijk F, Peters D, Goldbach R (1991): *Tomato spotted wilt virus* L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **71**: 2207-2216
- De Haan P, Gielen JJL, Prins M, Wijkamp IG, van Schepen A, Peters D, van Grinsven MQJM, Goldbach R (1992): Characterization of RNA-mediated resistance to *tomato spotted wilt virus* in transgenic tobacco plants. *Bio/Technology* **10**: 1133-1137
- Ding B, Parthasarathy MV, Niklas K, Turgeon R (1988): A morphometric analysis of the phloem-unloading pathway in developing tobacco leaves. *Planta* **176**: 307-318

- Ding XS, Carter SA, Deom M, Nelson RS (1998): Tobamovirus and potyvirus accumulation in minor veins of inoculated leaves from representatives of the *Solanaceae* and *Fabaceae*. *Plant Physiol.* **116**: 125-136
- Dolja VV, Haldeman R, Robertson NL, Dougherty WG, Carrington JC (1994): Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of *tobacco etch potyvirus* in plants. *EMBO J.* **13**(6): 1482-1491
- Dolja VV, Haldeman-Cahill R, Montgomery AE, Vandenbosch KA, Carrington JC (1995): Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of *tobacco etch potyvirus*. *Virology* **206**(2): 1007-1016
- Dougherty WG, Parks TD (1995): Transgenes and gene suppression: telling us something new? *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 399-405
- English J, Mueller E, Baulcombe D (1996): Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* **8**: 179-188
- Fernow KH (1967): Tomato as a test plant for detecting mild strains of *potato spindle virus*. *Phytopathology* **57**: 1347-1352.
- Fischer C (1998): Definitionen von Resistenz-Begriffen und ihre Anwendung in Forschung und Züchtung. *Erwerbsobstbau* **40**: 117-118
- Fraser RSS, Gerwitz A (1987): The genetics of resistance and virulence in plant virus disease. In: Day PR, Jellis GJ (Eds.): Genetics and Plant Pathogenesis. *Blackwell Scientific Publication, Oxford*: pp. 33-44
- Fraser RSS (1989): Control of plant viruses. *Plants today* **2**: 100-105
- Fraser RSS (1992): The genetics of plant-virus interactions: implications for plant breeding. *Euphytica* **63**: 175-185
- Fuchs M, Ferreira S, Gonsalves D (1997): Management of virus diseases by classical and engineered protection. *Molecular Plant Pathology On-Line* [<http://www.bspp.org.uk/mppol/>] 1997/0116fuchs
- Geisler G (1991): Farbatlas Landwirtschaftliche Kulturpflanzen. Ulmer-Verlag, Stuttgart
- German TL, Ullmann DE, Moyer JW (1992): Tospoviruses : Diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Ann. Rev. Phytopathol.* **30**: 315-348

- Germundsson A, Sandgren M, Barker H, Savenkov EI, Valkonen JPT (2002): Initial infection of roots and leaves reveals different resistance phenotypes associated with coat protein gene-mediated resistance to *Potato mop-top virus*. *J. Gen. Virol.* **83** : 1201-1209
- Gielen JJL, de Haan P, Kool AJ, Peters D, van Grinsven MQJM, Goldbach RW (1991): Engineered resistance to *tomato spotted wilt virus*, a negative-strand RNA virus. *Bio/Technology* **9**: 1363-1367
- Goldbach R, Peters D (1996): Molecular and biological aspects of tospoviruses. In Elliott RM (ed.): *The Bunyaviridae*. Plenum-Press, New York: pp. 129-157
- Gonsalves D, Garnsey SM (1989): Cross-protection techniques for control of plant virus diseases in the Tropics. *Plant Dis.* **73**: 592-597
- Goodwin J, Chapman K, Swaney S, Parks TD, Wernsman EA, Dougherty WG (1996): Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell* **8**(1): 95-105
- Gross P (1985): Biologic activity of hydroxylamine: a review. *Crit. Rev. Toxicol.* **14**(1): 87-99
- Heinze C, Roggero P, Sohn M, Vaira AM, Masenga V, Adam G (2000): Peptide-derived broad-reacting antisera against tospovirus NSs-protein. *J. Virol. Methods* **89**: 137-145
- Heinze C, Letschert B, Hristova D, Yankulova M, Willingmann P, Adam G (2001): Variability of the N-protein and the intergenic region of the S RNA of *tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV). *New Microbiol.* **24**: 175-187
- Hoffmann K, Geske SM, Moyer JW (1998): Pathogenesis of *tomato spotted wilt virus* in peanut plants dually infected with *peanut mottle virus*. *Plant Dis.* **82**: 610-614
- Hristova D, Karadjova O, Yankulova M, Heinze C, Adam G (2001): A Survey of Tospoviruses in Bulgaria. *J. Phytopathol.* **149**: 1-5
- Hulbert SH, Webb CA, Smith SM, Sun Q (2001): Resistance gene complexes: Evolution and utilization. *Ann. Rev. Phytopath.* **39**: 285-312
- Hull R (2001): *Matthews' Plant Virology*. 4. Auflage. Academic Press, New York
- Inoue-Nagata AK, Kormelink R, Sgro JY, Nagata T, Kitajima EW, Goldbach R, Peters D (1998): Molecular characterization of *tomato spotted wilt virus* defective interfering RNAs and detection of truncated L proteins. *Virology* **248**(2): 342-356

- Jorgensen RA, Atkinson RG, Forster RLS, Lucas WJ (1998): An RNA-based information superhighway in plants. *Science* **279**: 1486-1487
- Kasschau KD, Carrington JC (1998): A counter-defensive strategy of plant viruses: suppression of post-transcriptional gene silencing. *Cell* **95**: 461-470
- Kempers R, van Bel AJE (1997): Symplasmic connections between sieve element and companion cell in the stem phloem of *Vicia faba* have a molecular exclusion limit of at least 10 kDa. *Planta* **201**: 195-201
- Kennedy BS, Nielsen MT (1993): Characterization of *tomato spotted wilt virus* (TSWV) resistance in the tobacco cultivar 'Polalta'. *Phytopathology* **83**: 1420-1421
- Kikkert M, van Poelwijk F, Storms M, Bloksma H, Karsies W, Kormelink R, Goldbach R (1997): A protoplast system for studying *tomato spotted wilt virus* infection. *J. Gen. Virol.* **78**: 1755-1763
- Kormelink R, Kitajima EW, de Haan P, Zuidema D, Peters D, Goldbach R (1991): The nonstructural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of *tomato spotted wilt virus* is associated with fibrous structures in infected plant cells. *Virology* **181**(29): 459-68
- Kormelink R, de Haan P, Meurs C, Peters D, Goldbach R (1992a) : The nucleotide sequence of the M RNA segment of *tomato spotted wilt virus*, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *J. Gen. Virol.* **73** : 2795-2804
- Kormelink R, van Poelwijk F, Peters D, Goldbach R (1992b): Non-viral heterogeneous sequences at the 5' ends of *tomato spotted wilt virus* mRNAs. *J. Gen. Virol.* **73** (8): 2125-2128
- Kozak M (1986): Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283-292
- Kozak M (1989): The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* **108**: 229-241
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lassner MW, Peterson P, Yodar JL (1989): Simultaneous amplification of multiple DNA fragments by polymerase chain reaction in the analysis of transgenic plants and their progeny. *Plant Mol. Biol. Rep.* **7**: 116-128

- Law MD, Speck J, Moyer JW (1992): The M RNA of *impatiens necrotic spot tospovirus* (Bunyaviridae) has an ambisense genomic organization. *Virology* **188**: 732-741
- Lecoq H, Raccach B (2001): Cross-protection: Interactions between strains exploited to control plant virus diseases. In Jeger MJ, Spence NJ (eds.): Biotic Interactions in Plant-Pathogen Associations. *CAB International Publishing*: pp 177-192
- Lee KY, Baden C, Howie WJ, Bedbrook J, Dunsmuir P (1997): Post-transcriptional gene silencing of ACC synthase in tomato results from cytoplasmic RNA degradation. *Plant J.* **12**: 1127-1137
- Lindbo JA, Dougherty WG (1992): Untranslatable transcripts of the *tobacco etch virus* coat protein gene sequence can interfere with *tobacco etch virus* replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* **189**: 725-733
- MacKenzie DJ, Ellis PJ (1992): Resistance to *tomato spotted wilt virus* infection in transgenic tobacco expressing the viral nucleocapsid gene. *Mol. Plant-Microbe-Interact.* **5**(1): 34-40
- Maiss E, Timpe U, Brisske A, Jelkmann W, Casper R, Himmler G, Mattanovich D, Kattinger HWD (1989): The complete nucleotide sequence of *plum pox virus* RNA. *J. Gen. Virol.* **70**: 513-524
- Maiss E, Ivanova L, Breyel E, Adam G (1991): Cloning and sequencing of the S RNA from a Bulgarian isolate of *tomato spotted wilt virus*. *J. Gen. Virol.* **72**: 461-464
- Matsuoka Y, Chen SY, Compans RW (1991): Bunyavirus protein transport and assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **169**: 143-159
- McKinney HH (1929): Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *J. Agr. Res.* **39**: 557-578
- Metzlaff M, O'Dell M, Cluster PD, Flavell RB (1997): RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia. *Cell* **88**(6): 845-854
- Murashige T, Skoog F (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen RA (1990): Introduction of a chimeric chalcone gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2**:279-289.

- Nelson RS, Powell Abel P, Beachy RN (1987): Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat-protein gene of *tobacco mosaic virus*. *Virology* **158**: 126-132
- Obijeski JF, Bishop DH, Murphy FA, Palmer EL (1976): Structural proteins of *La Crosse virus*. *J. Virol.* **19**(3): 985-987
- Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM, Vaucheret H (1997): Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* **16**(15): 4738-45.
- Palauqui JC, Vaucheret H (1998): Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(16): 9675-9680
- Pang SZ, Nagpala P, Wang M, Slightom JL, Gonsalves D (1992): Resistance to heterologous isolates of *tomato spotted wilt virus* in transgenic tobacco expressing its nucleocapsid protein gene. *Mol. Plant. Pathol.* **82**(10): 1223-1229
- Pang SZ, Slightom JL, Gonsalves D (1993): Different mechanisms protect transgenic tobacco against *tomato spotted wilt* and *impatiens necrotic spot tospoviruses*. *Bio/Technology* **11**: 819-824
- Pang SZ, Bock JH, Gonsalves C, Slightom JL, Gonsalves D (1994): Resistance of transgenic *Nicotiana benthamiana* plants to *tomato spotted wilt* and *impatiens necrotic spot tospoviruses*: Evidence of involvement of the N protein and N gene RNA in resistance. *Phytopathology* **84**: 243-249
- Pang SZ, Jan FJ, Carney K, Stout J, Tricoli DM, Quemada HD, 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**(6): 899-909
- Peters, D. (1998): An updated list of plant species susceptible to tospoviruses. *Abstracts fourth international Symposium on Tospoviruses and Thrips; Wageningen NL*: pp 101-110
- Powell Abel P, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN (1986): Delay of disease development in transgenic plants that express the *tobacco mosaic virus* coat protein gene. *Science* **232**: 738-743

- Prins M, de Haan P, Luyten R, van Veller M, van Grinsven MQJM, Goldbach R (1995): Broad resistance to tospoviruses in transgenic tobacco plants expressing three tospoviral nucleoprotein gene sequences. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**(1): 85-91
- Prins M, Resende R de O, Anker C, van Schepen A, de Haan P, Goldbach R (1996): Engineered RNA-mediated resistance to *tomato spotted wilt virus* is sequence specific. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**(5): 416-418
- Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC (1997): A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**: 1558-1560
- Richmond KE, Chenault K, Sherwood JL, German TL (1998): Characterization of the nucleic acid binding properties of *tomato spotted wilt virus* nucleocapsid protein. *Virology* **248**: 6-11
- Riechmann JL, Laín S, Garcia JA (1991): Identification of the initiation codon of *plum pox potyvirus* genomic RNA. *Virology* **185**: 544-552
- Roberts AG, Santa Cruz S, Roberts IM, Prior DAM, Turgeon R, Oparka KJ (1997): Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. *Plant Cell* **9**: 1381-1396
- Robinson DJ (1996): Environmental risk assessment of releases of transgenic plants containing virus-derived inserts. *Transgenic Res.* **5**: 359-362
- Roggero P, Ciuffo M, Vaira AM, Milne RG (1998): Rapid purification of tospovirus nucleocapsids for antibody production and RNA analysis. *Abstracts fourth international Symposium on Tospoviruses and Thrips; Wageningen NL*: pp. 25-28
- Sakimura K (1963): *Frankliniella fusca*, an additional vector for the *tomato spotted wilt virus*, with notes on *Thrips tabaci*, another vector. *Phytopathology* **53**: 412
- Sanford JC, Johnston SA (1985): The concept of parasite-derived resistance - deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J. Theor. Biol.* **113**: 395-405
- Savenkov EI, Valkonen JPT (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
- Schiebel W, Haas B, Marinkovic S, Klanner A, Sanger HL (1993a): RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. I. Purification and physical properties. *J. Biol. Chem.* **268**(16): 11851-11857

- Schiebel W, Haas B, Marinkovic S, Klanner A, Sanger HL (1993b): RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. II. Catalytic *in vitro* properties. *J. Biol. Chem.* **268**(16): 11858-11867
- Schiebel W, Pelissier T, Riedel L, Thalmeir S, Schiebel R, Kempe D, Lottspeich F, Sanger HL, Wassenegger M (1998): Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* **10**: 2087-2101
- Schreier PH, Adam G, Stenzel K, Maiss E (1994): DNA comprising *plum pox virus* and *tomato spotted wilt virus* cDNAs for disease resistance. *EU-Patent Nr. EP 626449, Bayer AG, eingereicht am 28.5.1993*
- Seymour GB, Fray RG, Hill P, Tucker GA (1993): Downregulation of two non-homologous endogenous tomato genes with a single chimeric sense gene construct. *Plant Mol. Biol.* **23**: 1-9
- Sharma RC, Schimke RT (1996): Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* **20**(1): 42-44
- Smith CJS, Watson CF, Bird CR, Ray J, Schuch W, Grierson D (1990): Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 477-481
- Soellick TR, Uhrig JF, Bucher GL, Kellmann JW; Schreier PH (2000): The movement protein NSm of *tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(5): 2373-2378
- Steinecke P, Herget T, Schreier PH (1992): Expression of a chimeric ribozyme gene results in endonucleolytic cleavage of target mRNA and concomitant reduction of gene expression *in vivo*. *EMBO J* **11**: 1525-1530
- Steinecke P, Heinze C, Oehmen E, Adam G, Schreier PH (1998): Early events of *tomato spotted wilt* transcription and replication in protoplasts. *New Microbiol.* **21**(3): 263-268
- Stoeva P, Yankulova M, Nikolaeva V, Bachvarova R, Ivanova L, Maiss E, Adam G, Vulkov V, Guelemerov S, Atanassov A (1998): Long-term resistance to *tomato spotted wilt virus* in transgenic tobacco cultivars expressing the viral nucleoprotein gene: greenhouse and field tests. *Mol. Breeding* **4**: 155-164

- Storms MMH, Kormelink R, Peters D, van Lent JWM, Goldbach R (1995): The nonstructural NSm protein of *tomato spotted wilt virus* induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* **214**: 485-493
- Takken FLW, Joosten MHAJ (2000): Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *European J.Plant Pathol.* **106**: 699-713
- Towbin H, Theophil S, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354
- Uhrig JF, Soellick TR, Minke CJ, Philipp C, Kellmann JW, Schreier PH (1999): Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of *tomato spotted wilt tospovirus*: Identification and characterization of two interacting domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 55-60
- Vaira AM, Semaria L, Crespi S, Lisa V, Allavena A, Acotto GP (1995): Resistance to tospoviruses in *Nicotiana benthamiana* transformed with the N gene of *tomato spotted wilt virus*: correlation between transgene expression and protection in primary transformants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**(1): 66-73
- Van Blokland R, Van der Geest N, Mol JNM, Kooter JM (1994): Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J.* **6**: 861-877.
- Van de Wetering F, Goldbach R, Peters D (1996): *Tomato spotted wilt tospovirus* ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *Phytopathology* **86**: 900-905
- Van den Heuvel JJ, Bergkamp RJ, Planta RJ, Rahue HA (1989): Effect of deletions in the 5'-noncoding region on the translational efficiency of phosphoglycerate kinase mRNA in yeast. *Gene* **79**: 83-86
- Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR (1990): Flavonoid genes in *petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**(4): 291-299
- Van Leeuwen W, Ruttink T, Borst-Vrens AW, van der Plas LH, van der Krol AR (2001): Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *J. Exp. Bot.* **52**: 949-959

- Vance VB, Berger PH, Carrington JC, Hunt AG, Shi XM (1995): 5' proximal potyviral sequences mediate *potato virus X*/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* **206**: 583-590
- Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC (1998): Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**(2): 177-87.
- Wang HL, Wang Y, Giesman-Cookmeyer D, Lommel SA, Lucas WJ (1998): Mutations in viral movement protein alter systemic infection and identify an intercellular barrier to entry into the phloem long-distance transport system. *Virology* **245**: 75-89
- Wang Y, Gaba, V, Yang J, Palukaitis P, Gal-On A (2002): Characterization of synergy between *cucumber mosaic virus* and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology* **92**(1): 51-58
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB (1998): Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13959-13964
- Waterhouse PM, Smith NA, Wang MB (1999): Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends Plant Sci.* **4**(11): 452-457
- Weber K, Osborn M (1969): The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412
- Witham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Barker B (1994): The product of the *tobacco mosaic virus* resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1-receptor. *Cell* **78**: 1101-1115
- Wijkamp I, van Lent J, Kormelink R, Goldbach R, Peters D (1993): Multiplication of *tomato spotted wilt virus* in its vector, *Frankliniella occidentalis*. *J. Gen. Virol.* **74** : 341-349
- Wilbur WJ, Lipman DJ (1983): Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**(3): 726-730
- Wintermantel WM, Banerjee N, Oliver JC, Paolillo DJ, Zaitlin M (1997): *Cucumber mosaic virus* is restricted from entering minor veins in transgenic tobacco exhibiting replicase-mediated resistance. *Virology* **231**: 248-257

Danksagung

Herrn Prof. G. Adam danke ich für den Arbeitsplatz, das hochinteressante Thema, und die engagierten Diskussionen.

Der Arbeitsgruppe von Prof. P. Schreier (Bayer AG) danke ich für die Überlassung der transgenen Tabak-Linien, auf denen diese Arbeit basiert.

Prof. H.-P. Mühlbach danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ganz besonderen Dank schulde ich Dr. Cornelia Heinze für die hervorragende Betreuung im Labor, den unermüdlichen Einsatz, die vielen anregenden Diskussionen, die tolle Zusammenarbeit und die vielen guten Tipps und Tricks.

Frau Sigrid George danke ich für den grünen Daumen, den ein Mensch auf dessen Fensterbank selbst Kakteen ums nackte Überleben kämpfen so dringend braucht.

Vielen, vielen Dank auch an die ganze aktuelle und ehemalige Arbeitsgruppe "Pflanzenvirologie": Dr. Peter Willingmann, Judith Mehrmann, Ilse-Dore Schmidt, Bettina Letschert, Dr. Malgorzata Sadowska-Rybak sowie unsere Diplomanden Maike Both, Jens Köppcke, Ute Neumann und Viola Wobbe für Diskussionen, Lebensweisheiten, Hilfestellungen, technische Assistenz, viel Humor, faszinierende Einblicke in die Welt der Pferde und Aufsitzrasenmäher, Jobvermittlungen, noch mehr Lebensweisheiten, sehr viel Spaß bei der Arbeit und jede Menge Kuchen, Muffins und Schokolade.

Dank auch an Anan Kadri für die Unterstützung bei den Virus-Reinigungen und an unsere Auszubildenden Niels Schlottau und Solveig Fedkenheuer für die hilfreiche Mitarbeit und die Dienste als "Versuchskaninchen der Lehre".

Für die tolle Arbeitsatmosphäre am Institut möchte ich mich bei allen Beteiligten bedanken, insbesondere bei Dr. Klaus von Schwarzenberg, Dr. Peter Schulz, Marta Fernández Núñez und Gregor Hilfert.

Gern hätte ich mich auch noch bei unserer Sekräterin, Frau Ingrid Offermann, bedankt, die sich mit so viel Engagement um unsere administrativen Belange gekümmert hat und uns allen stets in bester Erinnerung bleiben wird.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, ganz besonders aber bei meiner Mutter, und bei Helen für Unterstützung, Verständnis und überhaupt Alles bedanken.

Dieses Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unter der Nummer AD 51/9-2 gefördert, auch hierfür bedanke ich mich.

Curriculum Vitae

Name: Frank Schwach
Geboren 28. November 1970 in Hamburg

Schulische und universitäre Laufbahn:

28. Juni 2002 **Universität Hamburg, Institut für Angewandte Botanik:**
Abschluß der Doktorarbeit zum Thema:
”Aufklärung des Resistenzmechanismus gegen Tosspoviren von Nicotiana tabacum L. Pflanzen, transformiert mit dem Nukleokapsidproteingen des Tomato Spotted Wilt Virus mit und ohne Leadersequenz aus dem Plum Pox Virus-Genom.”
Betreuer: Prof. G. Adam
- 1999 - 2002 **Universität Hamburg, Institut für Angewandte Botanik:**
Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung „Pflanzenschutz“, Arbeitsgruppe „Pflanzenvirologie“ von Prof. G. Adam.
- 1998 **Technische Universität Hamburg-Harburg / Universität Hamburg:**
Diplomarbeit zum Thema:
“Untersuchung des psychrophilen Schadstoffabbaus durch Bakterien“
in der Arbeitsgruppe „Biotechnologie II“ der TU-Harburg, betreut durch Prof. R. Müller.
- 1993 - 1998 **Universität Hamburg, Fachbereich Biologie:**
Studium der Biologie mit den Schwerpunkten: Mikrobiologie (Hauptfach), Botanik, Biochemie und Bodenkunde
- 1990 - 1993 **Universität Hamburg, Fachbereich Physik:**
Grundstudium der Physik (4 Semester) unterbrochen durch Zivildienst
- 1990 **Max-Brauer-Gesamtschule Hamburg:**
Abitur