

**Translationsmechanismen in Pflanzen am
Modellsystem *potato leafroll virus (PLRV)*: Interner
Ribosomeneintritt steuert die Synthese des
Replikations-Proteins RAPI**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Hannah Miriam Jaag
aus Villingen

Köln 2001

Die vorliegende Dissertation wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Köln-Vogelsang in der Abteilung "Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie" (Prof. Dr. F. Salamini) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Rohde angefertigt.

Berichterstatter: Prof. Dr. F. Salamini
Prof. Dr. G. Weissenböck

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2001

Universe in diameter: $1,6 \cdot 10^{28}$ cm

Galaxy in diameter: 10^{23} cm

*Anything that happens, happens.**

Anything that, in happening, causes something else to happen, causes something else to happen.

*Anything that, in happening, causes itself to happen again, happens again.**



Side-view of the Galaxy: There are some 10^{11} stars (200 billion) in this system, which is about 30 000 parsecs across with maximum thickness at the centre of about 4000 parsecs. The sun is about 10 000 parsecs from the centre of the Galaxy. The planet Earth orbits the sun between the planets Venus and Mars at a mean distance from the sun of 149 600 000 km. The mantle of this planet extends some 29 000 km below the crust; and the core, part of which is believed to be liquid. The composition of the crust is: oxygen 47%, silicon 28%, aluminium 8%, iron 4,5%, calcium 3,5%, sodium and potassium 2,5% each and magnesium 2,2%. Hydrogen, carbon, phosphorus, and sulphur are all present to an extent of less than 1% (Dictionary of Science, Oxford Press).

*It doesn't necessarily do it in chronological order, though.**

PLRV in diameter: $3 \cdot 10^{-6}$ cm

Enzyme in diameter: $3 \cdot 10^{-7}$ cm

* according to Douglas Adams, "Mostly Harmless"

1. Einleitung	1
1.1. Translationsmechanismen	3
1.1.1. Interne Translationsinitiation	5
1.2. Das Kartoffel-Blattrollvirus (PLRV)	7
1.2.1. Funktion viraler Gene	8
1.2.2. Der Replikase-Komplex von PLRV	10
1.3. Ziele der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Material	14
2.1.1. Chemikalien	14
2.1.2. Radioaktive Nukleotide	14
2.1.3. Enzyme und Reaktionskits	14
2.1.4. Filter, Filme, Membranen	14
2.1.5. Antikörper	14
2.1.6. Pflanzenmaterial	14
2.1.7. Lösungen und Medien	15
2.1.8. Bakterienstämme und Bakteriophagen	15
2.1.9. Vektoren	16
2.1.10. Sequenzangaben	16
2.2. Methoden	17
2.2.1. Präparation von Nukleinsäuren	17
2.2.1.1. Elution von DNA-Fragmenten	17
2.2.1.2. Plasmidpräparationen	17
2.2.1.3. Polysomale RNA Extraktion	17
2.2.1.4. RNA-Extraktion aus Protoplasten	17
2.2.1.5. PCR-Amplifikationen	18
2.2.1.6. Restriktionsverdau der DNA	18
2.2.1.7. Mutagenesen	18
2.2.1.8. Sequenzierungen und Sequenzdateien	18

2.2.2. Plasmid-Konstrukte	19
2.2.2.1. pBINcDNA ^c Mut41 und pBINcDNA ^c Mut34	19
2.2.2.2. pSP65-GUS, mut1-mut26	19
2.2.2.3. pSP72, G/RAP1-P1, Gmut27P1-Gmut30P1	20
2.2.2.4. pBIN19, GUS/RAP1-P1C und RAP1-P1C	20
2.2.2.5. HP-GUS, HP-RAP1-P1C-GUS	20
2.2.3. Oligonukleotide	20
2.2.4. Northern Blot	21
2.2.5. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	21
2.2.6. <i>In vitro</i> -Transkription	22
2.2.7. <i>In vitro</i> -Translation	22
2.2.8. Nachweis radioaktiv-markierter Translationsprodukte	23
2.2.9. Protoplastenpräparation	23
2.2.10. Protoplastentransfektion	24
2.2.11. Glukuronidase-Aktivitätstest (GUS-Test)	24
2.2.12. Pflanzentransformation	25
2.2.13. Proteinisolierung aus Pflanzen	25
2.2.14. Proteinisolierung aus Protoplasten	25
2.2.15. Western Blot	26
2.2.16. Proteindetektion	26
2.2.17. Sonstiges	26
3. Ergebnisse	27
3.1. Untersuchungen zum Replikasekomplex anhand von voller Länge Mutanten	27
3.2. Untersuchungen zum Translationsmechanismus von RAP1	31
3.3. Identifizierung des RAP1 Startcodons	38
3.4. Identifizierung von Motiven für eine interne Initiation	40
3.5. Untersuchungen des Motivs GGAGAGAGAGG	41
3.6. <i>In vitro</i>-Untersuchungen zur möglichen PLRV IRES-Region	43
3.7. <i>In vivo</i>-Untersuchungen zur internen Initiation von RAP1	46
3.8. <i>In vivo</i>-Untersuchungen zur IRES	48

4. Diskussion	53
4.1. Expressionsanalyse des kleinen offenen Leseraster von RAP1	53
4.2. Identifikation des RAP1 Proteins	54
4.3. Mögliche Eigenschaften von RAP1	55
4.4. Expression von RAP1 durch interne Initiation der Ribosomen	58
4.4.1. Die Analyse verantwortlicher Signale <i>in vitro</i>	58
4.4.1.1. Identifizierung des RAP1 Startcodons	59
4.4.1.2. Untersuchungen zur invertierten Wiederholung	60
4.4.1.3. Untersuchungen zur PLRV IRES-Region	61
4.4.2. Die Analyse verantwortlicher Signale <i>in vivo</i>	63
4.4.2.1. Expression der IRES-Sequenz in transgenen Pflanzen	63
4.4.2.2. Transiente Expressionsanalyse zur PLRV-IRES Region	64
4.5. Ausblick	67
5. Zusammenfassung	68
6. Literaturverzeichnis	69
7. Anhang	80
7.1. Liste verwendeter Oligonukleotide	80
7.2. Tabelle der GUS-Expressionseffizienzen	81
7.3. Abkürzungen	82

1. Einleitung

Die Evolution höherer Tiere und Pflanzen beruht auf der Hervorbringung einer wachsenden Zahl spezialisierter Zelltypen und spiegelt ein zunehmend verfeinertes System von Kontrollen über die Genexpression in den einzelnen Zellen, die sie zusammensetzen wider. Die Expression von Genen höherer Eukaryonten kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden, wobei unser Wissen über die Kontrolle der Initiation der Transkription überwiegt. Einige Gene werden jedoch mit konstanter Häufigkeit transkribiert und durch translationale Prozesse reguliert (wie Translationsinitiation). So ist die Analyse von Mechanismen, die der Regulation der Translation zugrunde liegen, ein wichtiger Aspekt der molekularbiologischen Grundlagenforschung.

Die einzelnen Vorgänge während der Proteinsynthese am Ribosom werden in drei Stadien - *Initiation*, *Elongation* und *Termination* - eingeteilt. Dabei unterscheiden sich *Elongation* und *Termination* bei Pro- und Eukaryonten meist nur in der Beteiligung verschiedener Proteinfaktoren. Die *Initiation* der Translation dagegen weist ganz wesentliche Unterschiede auf. Die mRNA-Moleküle der Bakterien enthalten eine bis zu sechs Nukleotide lange Ribosomen-Bindungssequenz (Shine-Dalgarno Sequenz), die in einem mRNA-Molekül mehrmals an verschiedenen Stellen vorkommen kann. Diese Initiationssequenzen liegen vier bis sieben Nukleotide stromaufwärts von einem AUG-Codon; sie bilden Basenpaare mit einem bestimmten Abschnitt in der rRNA eines Ribosoms und liefern damit das Signal für den Beginn der Proteinsynthese an dem in der Nähe liegenden Startcodon. Die Ribosomen der Bakterien können mit der Proteinsynthese auch innerhalb eines mRNA-Moleküls beginnen, deshalb ist ihre mRNA meist polycistronisch.

Für die Bildung eines Initiationskomplexes im eukaryontischen System sind andere Mechanismen verantwortlich, obwohl Shine-Dalgarno ähnliche Sequenzen auf der 18S rRNA diskutiert werden. Jedoch gibt es bisher keinen Beweis für das Vorkommen von Basenpaarung zwischen eukaryontischer mRNA und 18S rRNA.

Durch Marilyn Kozak konnte in der Vergangenheit ein Modell beschrieben werden, welches zu einem tiefgreifenden Verständnis der eukaryontischen Translationsinitiation geführt hat. In Anlehnung an den verantwortlichen Mechanismus wurde es das *“scanning” Modell für die Initiation der Translation in höheren Eukaryonten* genannt (Kozak, 1989, 1990, 1999, 2000, 2001). Dieses postuliert, dass die ribosomale 40S Untereinheit - mit der Initiator-Met-tRNA_i^{Met} und verschiedenen Initiationsfaktoren - an oder in der Nähe der *cap*-Struktur am 5'-Ende der mRNA bindet um dann an der mRNA entlangzuzugleiten bis ein AUG-Startcodon im optimalen Kontext erreicht wird. Für 90-95% aller bisher bekannten Vertebraten-mRNAs wird in der Regel das erste AUG stromabwärts vom 5'-Ende der mRNA für die Initiation der Translation verwendet (*“first AUG rule”*; Kozak, 1987a). Bakterien-mRNA ist daher gewöhnlich polycistronisch, die mRNAs der Eukaryonten dagegen monocistronisch.

Viren sind zum Vollenden ihres Lebenszyklus auf eine eukaryontische Zelle angewiesen. Ihre vergleichbar kleinen Genome besitzen nur eine begrenzte genetische Information. Deshalb nutzen sie Reaktionswege ihrer Wirtszellen für wesentliche Schritte der Fortpflanzung. Virale mRNAs sind ähnlich prokaryontischen mRNAs meist polycistronisch und stellen daher besondere Ansprüche an den Translationsapparat der Zelle. Die virale Translation kann sich dabei Mechanismen zu nutze machen, die bisher in eukaryontischen Zellen weitgehend unbekannt sind. Beispiele sind interne Ribosomenbindung in der Initiation, der ribosomale Leserasterwechsels bei der Elongation und die Stopcodon-Suppression bei der Termination. Die Mechanismen der Genexpression viraler Proteine ermöglichen eine optimale Nutzung der begrenzten Kapazität des viralen Genoms. Dieses Genom kann eine einzelsträngige RNA-Kette, eine doppelsträngige RNA-Helix, eine ringförmige, einzelsträngige DNA-Kette oder ein lineares, einzelsträngiges DNA-Molekül sein.

1.1. Translationsmechanismen

Eukaryontische mRNAs besitzen keine Shine-Dalgarno-Sequenz. Statt dessen wird die Auswahl eines AUG-Codons als Translations-Startpunkt weitgehend durch seine Nähe zum Cap am 5'-Ende des mRNA-Moleküls bestimmt, da an dieser Stelle die kleine ribosomale Untereinheit an die mRNA bindet. Während der Initiationsphase der Proteinsynthese lagern sich die Ribosomen-Untereinheiten genau an der Stelle der mRNA zusammen, wo die Polypeptidkette beginnen soll. Der Initiationsvorgang ist kompliziert und umfasst eine Reihe von Proteinen, die Initiationsfaktoren (eIFs), von denen viele selbst wieder aus mehreren Polypeptidketten zusammengesetzt sind. Wegen dieser Komplexität sind viele Einzelheiten der Initiation noch nicht bekannt. Sicher ist jedoch, dass das Ribosom an der mRNA-Kette in zwei Schritten zusammengefügt wird; erst wenn die kleine Ribosomen-Untereinheit, beladen mit Initiationsfaktoren und Met-tRNA_i^{Met}, das AUG Startcodon erreicht, bindet auch die große Untereinheit (siehe Abbildung 1).

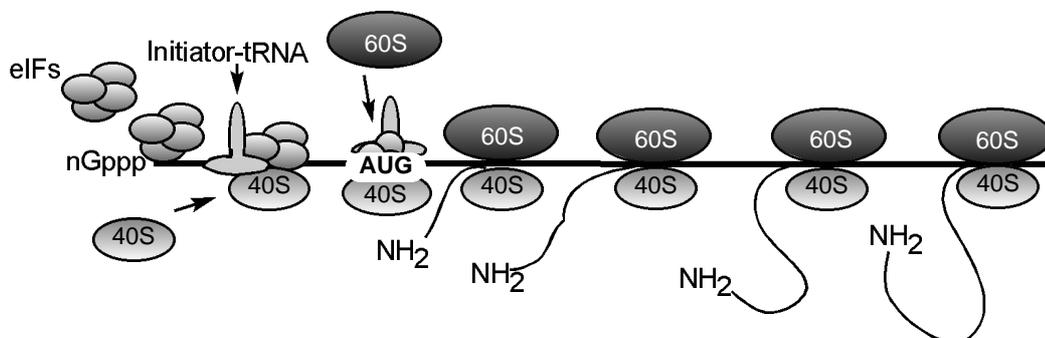


Abb. 1: Initiationsphase der Proteinsynthese bei Eukaryonten.

Die kleine Ribosomen-Untereinheit (40S) bindet mit eukaryontischen Initiationsfaktoren (eIFs) an die mRNA und sucht ein AUG Startcodon, das von einem besonderen Initiator-tRNA-Molekül erkannt wird. Dann dissoziieren die verschiedenen Initiationsfaktoren, und ermöglichen die Bindung der 60S großen Ribosomen-Untereinheit; nun ist das Ribosom vollständig und die Elongationsphase der Proteinsynthese beginnt: Aminoacyl-tRNAs binden nacheinander an die entsprechenden Codons der mRNA, wobei sich Basenpaarungen mit dem Anticodon der tRNA ausbilden. Das Ribosom wandert auf dem mRNA-Molekül in 5' → 3' - Richtung voran und die Polypeptidkette wird verknüpft.

Die AUG flankierenden Nukleotide beeinflussen die Effizienz der Translationsinitiation während des Suchvorgangs ganz wesentlich. Wenn diese Erkennungsstelle nicht geeignet ist, überliest die suchende ribosomale Untereinheit das erste AUG-Codon und bewegt sich statt dessen zum zweiten oder dritten AUG-Codon. Dieses Phänomen, das als "leaky scanning" bekannt ist, kann zur Synthese von zwei oder mehreren Proteinen von ein und derselben mRNA führen, die sich folglich in ihren Aminoenden unterscheiden (Abbildung 2A). So können z.B. Proteine mit oder ohne Signalsequenz synthetisiert werden, wodurch das Protein zu zwei verschiedenen Kompartimenten in der Zelle gelenkt wird. Die Grundlage für "leaky scanning" wird durch das einleitend beschriebene Modell nach Kozak (1989) gebildet. Erweiternd kommt hinzu, dass das erste Initiationscodon durch 40S ribosomale Untereinheiten überlesen wird, die dann für alle weiteren AUGs und somit für die Expression interner Leseraster zur Verfügung stehen (Kozak, 1990 als Übersichtsartikel).

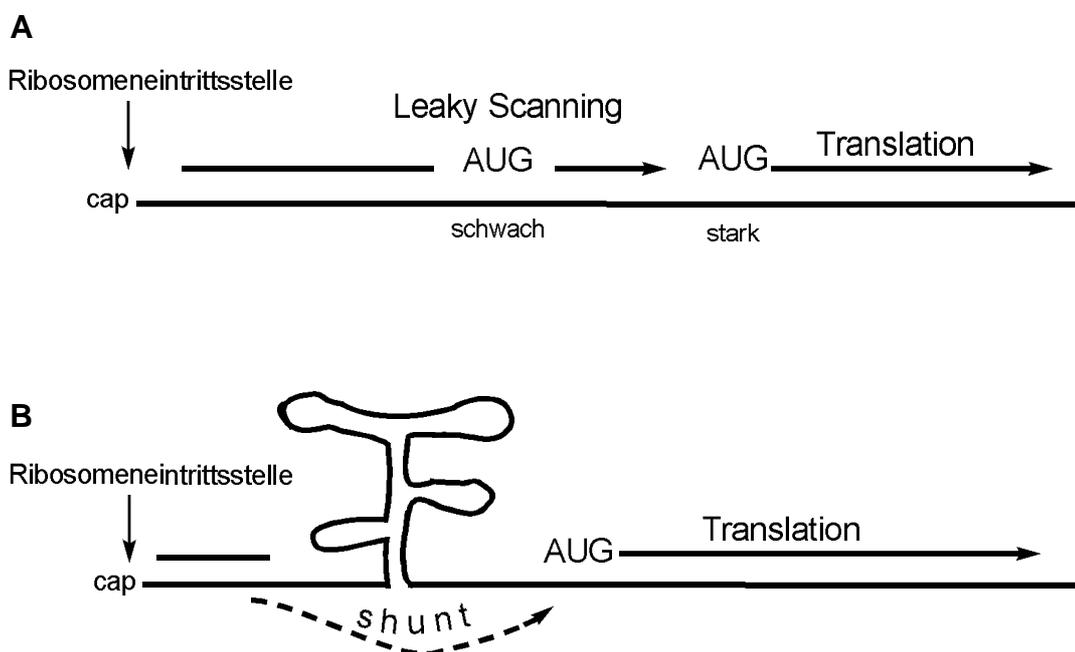


Abb. 2: Schematische Darstellung cap-abhängiger Translationsmechanismen

A: "Leaky Scanning": Das erste Initiationscodon wird durch 40S ribosomale Untereinheiten überlesen und die Translation beginnt an einem weiter 3'gelegenen Startcodon.

B: "Ribosome shunting": Eine RNA-Sekundärstruktur wird "übersprungen" und die Translation beginnt an einem stromabwärts gelegenen Startcodon.

Ein weiterer Mechanismus ist das sogenannte "Ribosome shunting" (Abbildung 2B). Dies wurde zuerst für das *cauliflower mosaic virus* (CaMV) in der Expression von ORF VII gefunden (Fütterer *et al.*, 1990). Hierbei "überspringen" die Ribosomen eine spezifische RNA-Sekundärstruktur (ca. 300 Nukleotide) und initiieren an einem stromabwärts gelegenen AUG (Übersichtartikel: Fütterer und Hohn, 1996).

1.1.1. Interne Translationsinitiation

Bei einigen eukaryontischen- und viralen mRNAs wird die Translation durch einen alternativen Mechanismus eingeleitet. Dabei findet die Initiierung an internen Erkennungssequenzen innerhalb des Moleküls statt. Der interne Ribosomeneintritt unterscheidet sich von dem schon beschriebenen Modell des "leaky scanning" nach Kozak (1989). Diese mRNAs enthalten komplexe Nukleotidsequenzen, die sogenannten "Internen Ribosomeneintrittsstellen" (engl.: Internal Ribosome Entry Sites - IRES), an welche die Ribosomen in einer cap-unabhängigen Art binden und mit der Translation an dem nächsten stromabwärts liegenden AUG-Codon beginnen (Abbildung 3). Dieser Mechanismus wurde zuerst für Picornaviren (Übersichtartikel von Sonenberg und Pelletier, 1989) beschrieben, deren mRNA-Moleküle keine cap-Struktur, jedoch dafür eine lange 5'-nicht-codierende Region (650-1300 bp) besitzen. Diese Regionen enthalten mehrere AUG Codons, an denen keine Initiation nachzuweisen ist. 5'-nicht-codierende Regionen von 130-460 Nukleotiden Länge des *foot-and-mouth disease virus* (FMDV, Belsham und Brangwyn, 1990; Kühn *et al.*, 1990) und des *encephalomyocarditis virus* (EMCV, Jang und Wimmer, 1990), die den Initiationscodons benachbart sind, führen *in vivo*, an artifiziellen bicistronischen mRNAs zur internen Initiation der Proteinbiosynthese. Die Anwesenheit von IRES in der Nähe eines ORF bedingt auch dann die Translation des ORFs, wenn die cap-abhängige Translation gehemmt ist. Dies konnte gezeigt werden, wenn die p220 Komponente des cap-bindenden Komplexes abgespalten wurde (Belsham und Brangwyn, 1990). Da cap-unabhängige Initiation ein Hauptmerkmal der internen Initiation ist, kann dieses Ergebnis als guter Hinweis gelten, dass interne Initiation in eukaryontischen Zellen auftreten kann (Übersichtartikel von Jang *et al.*, 1988; Sonenberg und Pelletier, 1989; Belsham und Sonenberg, 1996; Jackson *et al.*, 1990, 1991; Martinez-Salas, 1999; Sachs, 2000; Kozak, 2001).

Weitere IRES-Motive wurden gefunden für *hepatitis C virus* (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993; Reynolds *et al.*, 1995; Rijnbrand *et al.*, 1995), *murine leukemia virus* (Berlioz und Darlix, 1995), *moloney murine leukemia virus* (Vagner *et al.*, 1995b), *harvey murine sarcoma virus* (Berlioz *et al.*, 1995), *bronchitis virus* (Liu und Inglis, 1992; Le *et al.*, 1994), *potyvirus* (Levis und Astier-Manificier, 1993; Basso *et al.*, 1994), *cowpea mosaic virus* (Thomas *et al.*, 1991), *crucifer infecting tobamovirus* (Ivanov *et al.*, 1997) und einige nicht viralen mRNAs (Macejak und Sarnow, 1991; Jackson, 1991; Oh *et al.*, 1992; Vittorioso *et al.*, 1994; Vagner *et al.*, 1995a; Gan und Rhoads, 1996).

Alle bisher bekannten IRES-Elemente bilden Sekundärstrukturen aus. Mutationen die diese zerstören, bewirken das Ausbleiben der internen Translationsinitiation (Pilipenko *et al.*, 1989; Kaminski *et al.*, 1990). Eine Wechselwirkung durch spezifische Sequenzmotive zwischen IRES und Ribosomen (bzw. Initiationsfaktoren) wird angenommen.

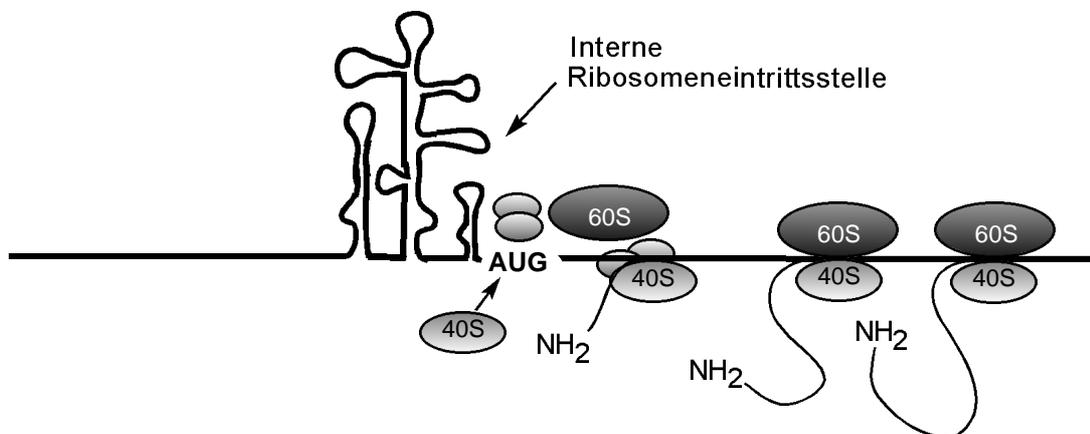


Abb.: 3: Schematische Darstellung interner Ribosomenbindung

Bei einigen Eukaryonten- und viralen mRNAs wird die Translation durch einen alternativen Mechanismus eingeleitet. Dabei findet die Initiierung an internen Erkennungssequenzen, sogenannten Internen Ribosomeneintrittsstellen (IRES) statt. Diese IRES enthalten komplexe Nukleotidsequenzen an die Ribosomen in einer cap-unabhängigen Art binden und die Translation am nächsten stromabwärts liegenden AUG-Codon initiieren.

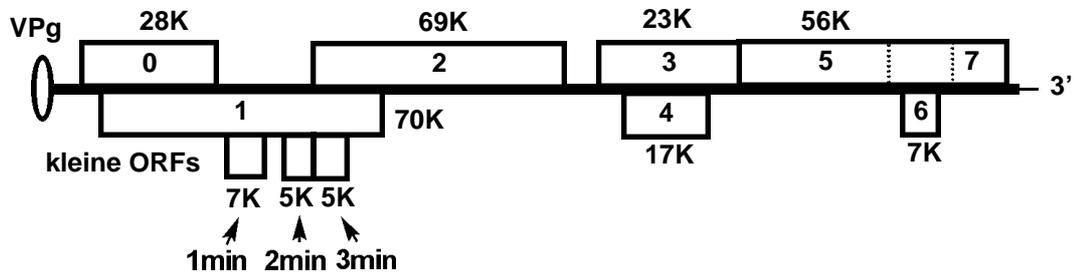
Im Hinblick auf ihre relativ kleinen Genome nutzen Viren translationale Regulationsvorgänge, um das Optimum an benötigten Proteinen aus einem Minimum an genetischen Informationen zu erreichen. Diese Strategien, die unter anderem auf unüblichen Translationsmechanismen beruhen (Rohde *et al.*, 1994), wurden in Luteoviren häufig beobachtet. So wurde u.a. translationale Recodierung (Prüfer *et al.*, 1992; Brault und Miller, 1992; Garcia *et al.*, 1993; Kujawa *et al.*, 1993), die Suppression von "undichten" Stopcodons (Bahner *et al.*, 1990; Tacke *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1996) und auch cap-unabhängige Translationsinitiation (Wang, S. *et al.*, 1995, 1997) beobachtet.

1.2. Das Kartoffel-Blattrollvirus (PLRV)

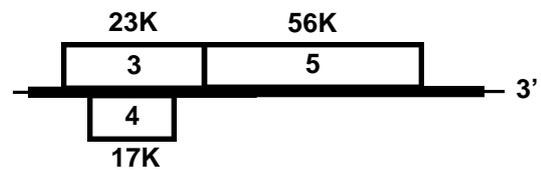
Das Kartoffel-Blattrollvirus (*potato leafroll virus* - PLRV) gehört taxonomisch zur Gruppe der Luteoviren, Untergruppe Poleroviren (vormals Untergruppe II). Es hat einen relativ engen Wirtspflanzenkreis und befällt hauptsächlich Nachtschattengewächse (*Solanaceae*). Dieses Virus verursacht die Blattrollkrankheit der Kartoffel. Sie führt zu gelb gefärbten (lat.: luteus), gerollten Blättern sowie zu einer reduzierten Anzahl an Knollen. Infizierte Kartoffelknollen verursachen eine Sekundärinfektion der Folgegeneration, da Kartoffeln vegetativ vermehrt werden und die Viruspartikel in der Knolle persistieren. Die Infektion von Pflanze zu Pflanze erfolgt durch die Grüne Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*). Charakteristisch für Luteoviren ist ihre gewebespezifische Vermehrung im Phloem der infizierten Wirtspflanze (Übersichtartikel: Francki *et al.*, 1985).

Die Viruspartikel enthalten eine ca. 5.9 kb einzelsträngige, nicht polyadenylierte RNA in Sinnorientierung (Mayo *et al.*, 1982; van der Wilk *et al.*; 1989; Keese *et al.*; 1990). Der 5'-Terminus der genomischen RNA weist ein kovalent gebundenes Protein (VPg, Virus Protein genome linked; Mayo *et al.*; 1982, 1989; van der Wilk *et al.*, 1989) auf.

Genomische RNA (5,9 kb)



Subgenomische RNA1 (2,3 kb)



Subgenomische RNA2 (0,8 kb)

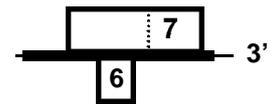


Abb. 4: Schematische Übersicht des PLRV Genoms und der subgenomischen RNAs.

Am 5'-Ende befindet sich ein kovalent gebundenes virales Genombindungsprotein (VPg). Die RNA codiert für acht große und möglicherweise weitere drei kleine Proteine. Leseraster 0, 1 und 2 werden von der genomischen RNA, ORF 3, 4 und 5 von der subgenomischen RNA1 und ORF 6 + 7 von der subgenomischen RNA2 translatiert. Die Größen der einzelnen Proteine sind in Kilodalton (K) angegeben.

1.2.1. Funktion viraler Gene

Die Virus RNA enthält mehrere Offene Leseraster (ORFs), von denen die für den Lebenszyklus notwendigen Proteine (P) translatiert werden. Das PLRV-ORF0 wird nur bei den Poleroviren gefunden. Der N-Terminus von P0 (Translationsprodukt von ORF0) ist hydrophob und Computervergleiche ergaben Übereinstimmungen zu membranassoziierten Proteinen (Mayo *et al.*, 1989). Wenn PLRV ORF0 in Kartoffeln exprimiert wird, zeigen diese Pflanzen stark ausgeprägte Symptome, die denen einer systemischen Infektion durch PLRV gleichen (Van der Wilk *et al.*, 1997a). Die offenen Leseraster 1 und 2 codieren die virale Replikase der Luteoviren (siehe Kapitel 1.2.2.). Der Ursprung des kovalent an die Virus-RNA gebundenen VPgs (Abbildung 4) konnte durch Proteinsequenzierung als Spaltprodukt der potentiellen Helikase (P1) identifiziert werden (van der Wilk *et al.*, 1997b).

Die offenen Leseraster 3, 4 und 5 werden durch eine 2,3 kb große subgenomische RNA (sgRNA1), die in der intergenen Region startet, gebildet (Tacke *et al.*, 1990). Immunologische Studien mit PLRV-spezifischen Antikörpern zeigten, dass ORF3 für das virale Hüllprotein (Englisch: coat protein CP) codiert. Zudem wurde dieses Ergebnis durch den direkten Sequenzvergleich mit bekannten luteoviralen Hüllproteingenen bestätigt (Tacke *et al.*, 1989; Mayo *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1988; Veidt *et al.*, 1988).

Das 17 kDa große Genprodukt für ORF4 besitzt alle biochemischen Eigenschaften für ein Zell-zu-Zell-Transportprotein. Die C-terminale Domäne des PLRV P4 bindet unspezifisch einzelsträngige Nukleinsäuren (Tacke *et al.*, 1991), ähnlich wie bei dem Transportprotein des Tabakmosaikvirus (TMV; Citovsky *et al.*, 1990). Aufgrund seiner relativ hohen Expression (1:7 für ORF3:ORF4) wurde als zusätzliche Funktion des 17-kDa Proteins der Schutz der RNA-Einzelstränge vor endogenen Nukleasen während der Replikation von PLRV angenommen (Tacke *et al.*, 1991). Der N-Terminus des 17K wird von einer membranassoziierten Proteinkinase phosphoryliert (Sokolova *et al.*, 1997) und besitzt außerdem eine hohe Affinität zu den Plasmodesmata des Siebelement/Geleitzellenkomplexes (Schmitz *et al.*, 1997).

Das durch ORF5 codierte Protein ist Teil des Viruspartikels und stellt sehr wahrscheinlich den Blattlaus-Übertragungsfaktor (Englisch: aphid transmission factor; Bahner *et al.*, 1990) dar. Da ORF5 ähnlich ORF2 über kein eigenes Initiationscodon am 5'-Terminus des Leserasters verfügt, wurde von Mayo *et al.* (1989) vermutet, dass ORF5 als Fusions- bzw. Durchleseprotein ("inframe"-Protein) mit ORF3 durch die Suppression eines *amber*-Stopcodons exprimiert wird. Mit Hilfe transienter Expression chimärer PLRV/GUS-Konstrukte in Kartoffel- und Tabakprotoplasten konnte durch Tacke *et al.* (1990; siehe auch Prüfer, 1992) eine Suppression des *amber*-Stopcodons mit einer Effizienz von ca. 1% beobachtet werden. P3/5 ist eine strukturelle Komponente der PLRV-Viruspartikel (Bahner *et al.*, 1990) und ist für die Transmission des Virus und die Stabilität im Insekten-Vektor nötig. Dabei bindet es an das bakterielle MpB GroEL-Protein von *Buchnera sp.*, einem Endosymbionten des Virus-Vektors *Mycus persicae* (Hogenhout *et al.*, 2000).

Eine kürzlich nachgewiesene zweite subgenomische RNA2 codiert für die Leseraster ORF6 und ORF7 (Ashoub *et al.*, 1998), wobei das RNA-bindende ORF7-Genprodukt in zwei Formen als 14kDa schweres P7_{AUG}, bzw. N-terminal verlängertes 36 kDa P7_{UUG} auftreten kann (Ashoub, unveröffentlicht). Über die biologische Funktion dieser beiden Proteine ist derzeit nichts bekannt, jedoch wird diskutiert, dass P7 aufgrund seiner Nukleinsäure-bindenden Eigenschaften an der Regulation der Transkription beteiligt sein könnte.

1.2.2. Der Replikase-Komplex von PLRV

Besondere Anforderungen werden an die Replikationsmechanismen der RNA-Viren gestellt: Sie müssen RNA-Moleküle kopieren, um ihr Genom zu vermehren, d.h. sie müssen Nukleosid-Triphosphate an einer RNA-Matrize polymerisieren. Zellen besitzen normalerweise keine Enzyme, die eine solche Reaktion ausführen könnten, daher müssen selbst die kleinsten RNA-Viren ihre eigene RNA-abhängige Polymerase besitzen, um sich vermehren zu können.

Die Replikation des Genoms von RNA-Viren verläuft, wie die DNA-Replikation, über die Bildung komplementärer Stränge. Sie wird bei den meisten RNA-Viren von spezifischen RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (Replikasen) katalysiert. Die Synthese der Virus-RNA beginnt immer am 3'-Ende der RNA-Matrize und läuft so lange in 5' 3'-Richtung weiter, bis das 5'-Ende der Matrize erreicht ist. Korrekturlese-Mechanismen gibt es für die Virus-RNA-Synthese nicht, und daher findet man hier eine ähnliche Fehlerhäufigkeit wie bei der DNA-Transkription (David und Larner, 1992).

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) für PLRV besitzt das typische und essentielle GDD-Motiv (Koonin, 1991; Molinari *et al.*, 1998) im Kontext mit einer basischen Aminosäurefolge. Sie wird als P1/2-Fusionsprotein durch einen ribosomalen -1 Leserasterwechsel exprimiert. Dieser wird durch ein spezifisches Heptanukleotidsignal (UUUAAAU) und eine fünf Basen stromabwärts gelegene RNA-Struktur ausgelöst (Prüfer *et al.*, 1992; Brault und Miller, 1992). Sowohl die potentielle Helikase (P1), die über das typische YVF-Motiv verfügt (Kadare und Haenni, 1997), wie auch die RdRP (P1/2) zeigten *in vitro* Nukleinsäure-bindende Eigenschaften (Prüfer, 1992). Das 70 kDa große P1 dient außerdem als Vorläuferprotein für die Generierung des VPg-Proteins und seines protolytischen Spaltprodukts, dem P1-C25-Protein (Prüfer *et al.*, 1999). Diese beiden für die Replikation notwendigen Proteine könnten somit, zusammen mit anderen viralen Minimalproteinen und Wirtsfaktoren, im Replikasekomplex assoziiert sein (Prüfer, 1992).

Im Bereich von ORF1, aber in einem anderen Leseraster, befinden sich drei kleine offene Leseraster (1min, 2min, 3min). Diese Proteine könnten aufgrund charakteristischer Sequenzmotive (hydrophobe Bereiche, Helikasemotive) für das PLRV von Bedeutung zu sein. Das ORF2min befindet sich kurz vor der Überlappungszone ORF1/2 und somit kurz vor der für den ribosomalen -1 Leserasterwechsel notwendigen RNA-Struktur (siehe Abbildung 5). 2min ist ein 46 Aminosäuren langes 5kDa großes Protein von hoher Basizität (Isoelektrischer Punkt = 12,98), das aber nicht Nukleinsäure-bindend ist (Prüfer, unpublizierte Daten). Im selben Leseraster folgt nach dem 2min ein weiterer ORF für ein 5K Minimalprotein (3min), für das RNA-bindende Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (Prüfer *et al.*, 1992; Monecke, 1999).

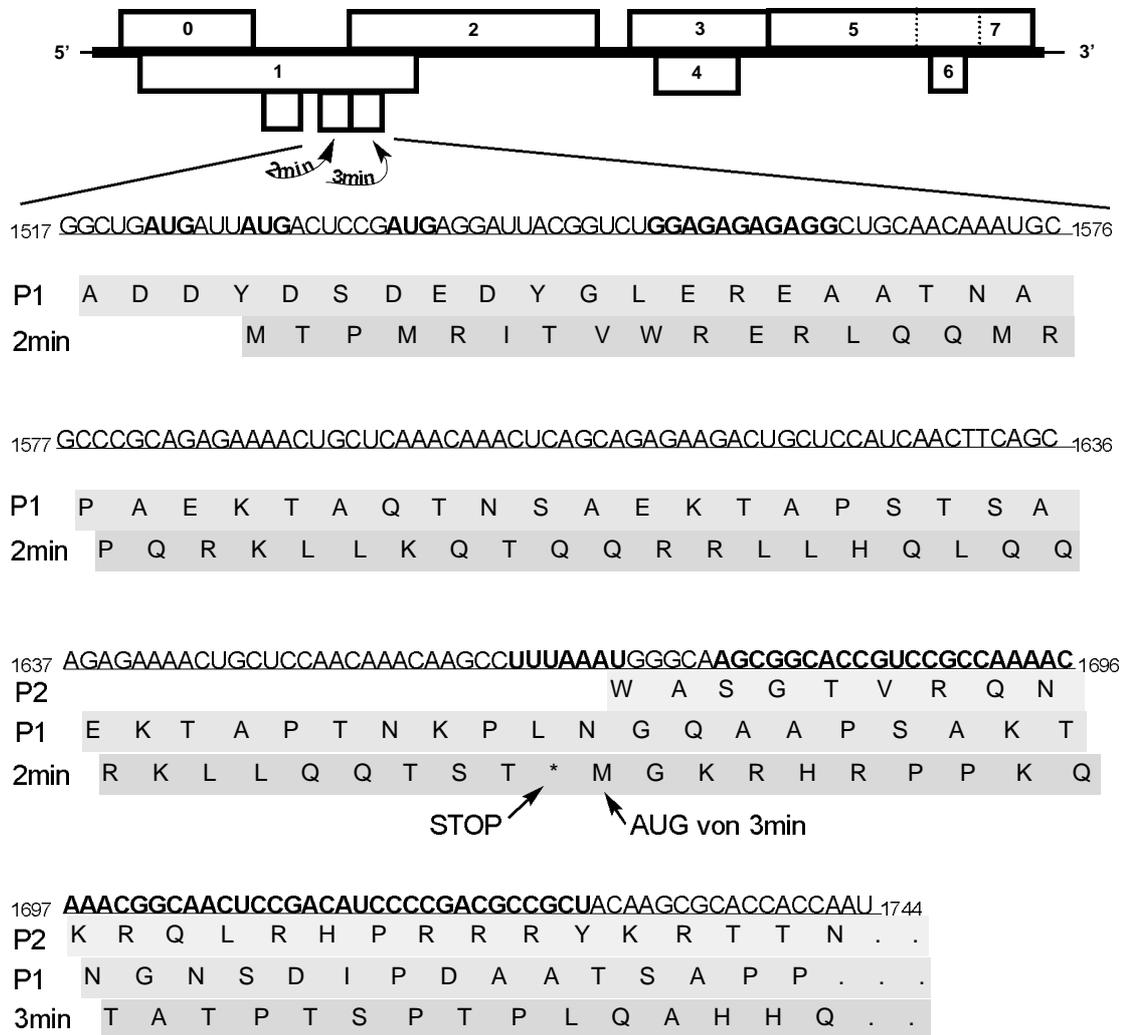


Abb. 5: Ausschnitt der Sequenz nt 1517 - 1744 des kanadischen PLRV-Isolates
 Die möglichen Initiationscodons und wichtigen Signale für 2min (RAP1), sowie die Signale für den -1 Leserasterwechsel sind mit Fettschrift gekennzeichnet.

1.3. Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Expression und Funktion des intern gelegenen offenen Leserasters 2min studiert werden. Aus Vorarbeiten war ansatzweise bekannt, dass dieses Protein über einen internen Ribosomeneintritt ausgebildet wird. Diese initiale Beobachtung sollte überprüft und unter Berücksichtigung der nachfolgenden Kriterien weiter analysiert werden:

- Welche funktionelle Bedeutung hat das durch 2min codierte Protein für den Lebenszyklus von PLRV?
- Welcher Mechanismus ist verantwortlich für die Translation des fast 1600 Nukleotide vom 5' Ende des viralen Genoms gelegenen 2min Proteins?
- Welche Signale sind für die *in vitro* und *in vivo* Initiation der Translation notwendig?
- Erlauben die identifizierten Signale die Expression beider Proteine einer bicistronischen mRNA *in planta*?

2. Material und Methoden

2.1. Material

Die in dieser Arbeit erwähnten Chemikalien, Enzyme und sonstigen Hilfsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen:

2.1.1. Chemikalien:

Biomol (Hamburg), Boehringer La Roche (Mannheim), Difco Laboratories (Detroit/USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fulka Chemie AG (Buchs, Schweiz), Aventis (Frankfurt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Steinheim).

2.1.2. Radioaktive Nukleotide:

Amersham Buchler (Braunschweig).

2.1.3. Enzyme und Reaktionskits:

Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), La Roche (Mannheim), GibcoBRL (Eggenstein), Macherey-Nagel (Düren), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt a.M.), Promega (Heidelberg), Pharmacia (Uppsala/Schweden), Serva (Heidelberg), Stratagene (Heidelberg).

2.1.4. Filter, Filme, Membranen:

Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), Schleicher & Schuel (Dassel), Whatman (Maidstone, USA).

2.1.5. Antikörper:

BioRad (München), Dianova (Hamburg), GibcoBRL (Karlsruhe), Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule (Aachen).

2.1.6. Pflanzenmaterial:

Solanum tuberosum cv. Désirée

Nicotiana tabacum cv. Petit Havanna SR1 (Maliga *et al.*, 1973)

2.1.7. Lösungen und Medien

Standardlösungen wie SSC, TBE und Medien zur Kultivierung von *E.coli* wie NZCYM, LB und DYT sind in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. *A.tumefaciens* wurde in YEB-Medium kultiviert (Casaminosäuren, Fleischextrakt, Saccharose (je 5 g/l), Hefeextrakt (1 g/l) und 2 mM MgSO₄). Für *A.tumefaciens* LBA4404 (s.u.) wurde aufgrund des Plasmids pAI4404 mit Rifampicin (100 mg/l) und Streptomycin (300 mg/l) selektiert, pBIN19-Transformanten wurden auf Kanamycin (25 mg/l) selektiert.

Zur Regeneration und Kultivierung transgener Pflanzen wurde nach Murashige und Skoog (1962) modifizierte MS-Medien benutzt: Allgemeine Komponenten waren MS-Basalsalzmedium (Sigma; 4,5 g/l), sowie Myo-Inositol (100mg/l), Thiaminhydrochlorid (0,1 mg/l), Glycin (2 mg/l), Nikotinsäure (0,5 mg/l) und Pyridoxinhydrochlorid (0,5 mg/l). MSI und MSII-Medium enthielten zusätzlich Glucose (30 g/l). MSII enthielt ferner Kanamycin (100 mg/l), Claforan (500 mg/l), sowie die Phytohormone Zeatin (2 mg/l), Gibberelinsäure A₃ (GA₃; 20 µg/l) und Naphtylelessigsäure (NAA; 20 µg/l). In MSIII fehlten die Phytohormone und anstelle von Glucose wurde Saccharose (20 g/l) zugesetzt. Der pH-Wert der MS-Medien wurde mit NaOH auf pH 5,8 eingestellt.

2.1.8. Bakterienstämme und Bakteriophagen

Escherichia coli

DH10B	F', mcrA, (mvr-hsd RMS-mcrBC), ø80dlacZ, M15, lacI74, deoRrecA1, endA1, eraD139, (ara, leu) 7697galU, galK _{rpsL} , nupG. (Stratagene).
JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺), relA1, supE44, <i>Lambda</i> , (lac-proAB), lacI ^q ZM15) (Hanahan, 1985).
BMH 71-18 mutS	thi, supE, #(lac-proAB), (mutS::Tn10), (F' proA ⁺ B ⁺ , lacI ^q ZM15) (Promega).
MC1061	araD139, (ara, leu) 7697, lacX74, galU, galK (Casadaban und Cohen, 1980).

Agrobacterium tumefaciens

LBA 4404 wurde auf dem Ach5-Hintergrund konstruiert, enthält das verkürzte Ti-Plasmid pAL 4404 (Deletion vom Octopin-Typ Plasmid pTiAch5), Sm^r, Rif^r (Hoekema *et al.*, 1983).

Bakteriophagen

R408, M13K07 von Promega (Dotto *et al.*, 1981, 1983, 1984).

2.1.9. Vektoren

Als Standard-Klonierungsvektoren wurden pBluescript II, pSP65 und pSP72/73 verwendet. Konstrukte für Pflanzentransformationen wurden zunächst in pRT104 kloniert. Die Kassetten, bestehend aus Promotor-Gen-Terminator, wurden in den binären Vektor pBIN19 integriert.

p1158-GUS	(Ashoub <i>et al.</i> , 1998)
pALTER-1	(Promega)
pBIN19	(Bevan, 1984)
pBluescript IISK+/-	(Stratagene)
pCA-WT	(Prüfer <i>et al.</i> , 1995)
pFF35S	(Ivanov, Moskau)
35SHP-EMCV-GUS	(Ivanov, Moskau)
pFFHP	(Ivanov, Moskau)
pSelect	(Promega)
pRT100	(Töpfer <i>et al.</i> , 1987)
pRT104	(Töpfer <i>et al.</i> , 1987)
pSP65	(Promega; Melton <i>et al.</i> , 1984)
pSP72	(Promega; Krieg und Melton, 1987)
pSP73	(Promega; Krieg und Melton, 1987)
pBINcDNA ^g	(„p35SPL-WT“ Prüfer <i>et al.</i> , 1997)
pBINcDNA ^c	(„p35ScDNA ^c “ Franco-Lara <i>et al.</i> , 1999)

2.1.10. Sequenzangaben

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Sequenzangaben für das PLRV beziehen sich auf das kanadische Isolat (Keese *et al.*, 1990; Accession/ID: D13945.1).

2.2. Methoden

2.2.1. Präparation von Nukleinsäuren

2.2.1.1. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden mit OIAEX® (Qiagen, Hilden) oder Extraktions Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach dem entsprechenden Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

2.2.1.2. Plasmidpräparationen aus *E. coli* erfolgten nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) und nach der Quiagen-Midipräparations-Methode (Qiagen, 1995).

2.2.1.3. Polysomale RNA Extraktion aus Pflanzen wurde nach der Methode von Leiser *et al.* (1992) durchgeführt. Hierbei wurden zwei Gramm Blattmaterial unter flüssigen Stickstoff gemörsert und in 5 ml Polysomenpuffer aufgenommen.

Polysomenpuffer

200	mM Tris-HCl pH 9,0
400	mM KCl
35	mM MgCl ₂
200	mM Saccharose
12,5	mM EDTA

Die Lösung wurde sofort mit einem Volumen Phenol gemischt und die Nukleinsäuren nach zweimaliger Phenol/Chloroform Extraktion mit 2 Volumen Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 1,5 ml 3M Natriumacetat pH 5,0 aufgenommen und für 1 h auf Eis gestellt. Polysomale RNA wurde abzentrifugiert und mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen. Die RNAKonzentration wurde bei 260 nm gemessen (UVIKON 810, Kontron instruments) und auf 1 µg/µl eingestellt.

2.2.1.4. RNA-Extraktion aus Protoplasten wurde nach folgendem abgewandelten Protokoll durchgeführt:

Die Protoplasten wurden in 200 µl Puffer D aufgenommen und nach zweimaliger Phenol/Chloroform-Extraktion mit 400 ml Ethanol gefällt.

Puffer D

50	mM Tris-HCl pH 7,2
150	mM NaCl
1	mM EDTA
1	% (w/v) SDS
0,03	% (w/v) Bentonite

Nach Waschen mit 70% Ethanol wurden die Nukleinsäuren in 150 µl H₂O aufgenommen, mit 50 µl 8M LiCl gemischt und für drei Stunden auf Eis gestellt. Die ungelösten mRNAs, rRNAs und viralen RNAs wurden abzentrifugiert und in H₂O aufgenommen. Nach einem erneuten Fällen mit 2 Volumen Ethanol und Waschen mit 70% Ethanol wurde die gereinigte RNA in 10 ml H₂O gelöst.

2.2.1.5. PCR-Amplifikationen

PCR Amplifikationen, deren Produkte für Klonierungen bestimmt waren, wurden mit Expand Plus DNA-Polymerase (La Roche) durchgeführt. Diese zeichnet sich im Vergleich zu Taq-Polymerase durch eine geringe Fehlerrate aus. Für die RT-PCR wurde ebenfalls von La Roche das Kit verwendet. Für die übrigen PCR-Amplifikationen wurde Taq-DNA-Polymerase (Gibco BRL) verwendet.

Das jeweilige Protokoll wurde nach den Angaben des Herstellers erstellt und die Reaktionen im Thermo-Cycler durchgeführt. Anzahl der Amplifikationszyklen, Dauer der einzelnen Schritte und Annealing-Temperaturen wurden in Abhängigkeit von den zu amplifizierenden DNA-Fragmenten und den Primersequenzen bestimmt.

2.2.1.6 Restriktionsverdau der DNA

Die DNA konnte mit Hilfe von spezifischen Restriktionsendonukleasen entsprechend der Empfehlungen der Hersteller an den gewünschten Stellen geschnitten werden. Die Überprüfung der Größe von den dabei entstandenen Fragmenten erfolgte anschließend über eine Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.1.7. Mutagenesen

Mutagenesen wurden unter Verwendung des "Altered Sites™ *in vitro* Mutagenesis System" der Firma Promega oder mittels PCR-Mutagenese hergestellt. Bei der PCR-Mutagenese wurde ein drittes Oligonukleotid mit der gewünschten Mutation aber einer geringeren Menge als die flankierenden Primer dem PCR-Ansatz zugegeben.

2.2.1.8. Sequenzierungen und Sequenzdateien

DNA-Sequenzen wurden auf PE/Applied Biosystems 377 und 3700 Sequenzierautomaten unter Verwendung der BigDye-Terminator Methode von der ADIS-Service-Einheit am MPIZ erstellt.

Sequenzanalysen wurden mit Programmen der GCG-Software durchgeführt (Devereux *et al.*, 1984).

2.2.2. Plasmid-Konstrukte

2.2.2.1. pBINcDNA^cMut41 und pBINcDNA^cMut34

Hierzu wurde ein *Xba*I-Fragment (nt 971-3020) aus dem kanadischen volle Länge Klon pBINcDNA^c in pBluescript kloniert. In diesem Konstrukt, pBlueORF1, wurde durch PCR-Mutation (Oligonukleotide T38FW, T38BW und T41 bzw. T34) die entsprechenden Basen geändert. Das mutagenisierte PCR-Produkt wurde *Swa*I und *Pst*I geschnitten und zurück in den pBlueORF1 (*Swa*I-1492/*Pst*-1848) transferiert. Das ganze mutagenisierte *Xba*I-Fragment wurde dann wieder in pBINcDNA^c kloniert, wobei durch PCR und Sequenzanalyse die richtige Orientierung der Einfügungen abgesichert wurde.

2.2.2.2. pSP65-GUS, mut1-mut26

Durch einen Restriktionsverdau des Vektors pSP65GUS mit *EcoRV* wurde ein 230 bp großes internes GUS-Fragment (Koordinaten: 584-814 des Wildtyp-GUS-Gens) deletiert und im Anschluss durch die Nukleotide 1061-1773 von PLRV vergrößert. Das RAP1-Stopcodon wurde zu UAC mutagenisiert. Ab mut3 wurde ein *Alu*I-Fragment (nt1481-1773) in den *EcoRV*-verdauten pSP65-GUS Vektor eingesetzt. Alle weiteren Mutationen basierten auf mut5, bei der ein *ochre*-Stopcodon am 3'-Ende des N-GUS eingefügt wurde. Die Herstellung der Deletionsmutanten erfolgte über singuläre Restriktionsschnittstellen. Die Translationsblockierungssequenzen wurden durch die Oligonukleotide TBS1 (FW+BW) sowie TBS2 (FW+BW) in die *Nco*I-Schnittstelle von N-GUS eingefügt. Alle weiteren Mutanten basieren auf mut5 und sind in den entsprechenden Abbildungen angegeben. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzanalyse überprüft. Für *in vitro* Transkriptionsexperimente wurden die Plasmide mit *Hind*III linearisiert.

2.2.2.3. pSP72: G/RAP1-P1C, Gmut27P1-Gmut30P1

Für *in vitro*-Transkriptions- und Translationsexperimente wurde das GUS-Gen (Jefferson *et al.*, 1986) mit den Enzymen *NcoI/XbaI* in pSP72 kloniert. Die in der Abbildung angegebenen Sequenzabschnitte wurden durch eine *EcoRV*-Schnittstelle vor den C-Terminus (nt1870-2120) von ORF1 ligiert. Die Richtigkeit aller Konstrukte wurde durch Sequenzanalyse überprüft.

2.2.2.4. pBIN19: GUS/RAP1-P1C und RAP1-P1C

Zur Herstellung dieser Konstrukte wurde GUS/RAP1-P1C und RAP1-P1C aus pSP72 über pRT104 in den Pflanzentransformationsvektor pBIN19 in die *HindIII* Schnittstelle kloniert.

2.2.2.5. pFFHP: HP-GUS, HP-RAP1-P1C-GUS, HPm48GUS-HPm51GUS

Hiefür wurde der Vektor pFF35S *KpnI/XbaI* verdaut und mit einem *KpnI/SalI* Fragment plus einem *SalI/XbaI* GUS (ohne AUG) aus p1158-GUS ligiert. Das Insert RAP1-P1C (nt 1520-2120) und seine Deletionsmutanten wurden mit den Oligonukleotiden m43FW und m43BW, bzw. m48BW - m51BW mittels PCR aus G/RAP1-P1C hergestellt. Die Kassette des zu untersuchenden Konstrukts (PLRV-Sequenz-GUS) wurde dann nach Sequenzierung mittels *KpnI/PstI* in den Vektor pFFHP transferiert. Die einzelnen Deletionsmutanten wurden durch PCR mit den entsprechenden Oligonukleotiden (*KpnI/XbaI*) hergestellt. Die Integrität aller Konstrukte wurde durch Sequenzanalyse überprüft.

2.2.3. Oligonukleotide

In der Arbeit wurden Oligonukleotide von MWG (Ebersberg), Life Technologies (Karlsruhe) oder Metabion (Planegg-Martinsried) eingesetzt (Liste siehe Anhang).

2.2.4. Northern Blot

Die zu untersuchende RNA wurde bei 55°C in 50% (v/v) Formamid, 2,2 M Formaldehyd, 0,1 mg/ml Bromphenolblau und 1 x MOPS denaturiert und auf einem Formaldehyd-Gel (1% Agarose, 6% Formaldehyd) in 1 x MOPS-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer auf S&S NYTRAN-N⁺-Membran erfolgte über einen semidry Vakuumblotter mit 20 X SSC für 3 Stunden. Die RNA wurde mit UV-crosslinking (UV stratalinker 2400, Stratagene) immobilisiert. Die Vorhybridisierung und Hybridisierung der Filter erfolgte in 50% Formamid mit 5 x SSC, 5% Denhardt, 0,1 % SDS und 10 µg /ml Heringsperma DNA. Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten erfolgte in einer Glasschale in einem temperierten Wasserbad für mindestens 12 Stunden bei 42°C unter gleichmäßigem Schwenken. Anschließend wurden die Filter 2 X 20 Min bei 65°C in 2 x SSC, 0,1% (w/v) SDS gewaschen, in Haushaltsfolie eingeschlagen und auf einer Trimax-Verstärkerfolie (3M, Neuss) mit Kodax Filmen bei -70°C exponiert.

20 x SSC

3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat
pH 7,0

100 x Denhardt

2% (w/v) Ficoll
2% (w/v) PVP
2% (w/v) BSA

20 x MOPS

0,4 M MOPS
0,1 M Natriumacetat
0,02 M EDTA
pH 7,0

2.2.5. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Radioaktiv markierte DNA-Fragmente wurden anhand von PCR-Produkten und mit Oligonukleotiden wie folgt hergestellt.

100 ng	DNA
100 pmol	Oligonukleotid
5 µl	2,5 mM dATP, dGTP und dTTP
5 µl	α - ³² P-dCTP
5 µl	10 x Klenow Puffer
4 U	Klenow Polymerase
Das Endvolumen wurde auf 50µl mit H ₂ O eingestellt.	

Die Reaktion wurde für 20 Minuten bei 37°C durchgeführt. Die Sonde wurde anschließend bei 100°C für drei Minuten denaturiert und in die Hybridisierungslösung gegeben.

Bei 18SrRNA-Sonden wurden das entsprechende Oligonukleotid (100 pmol) mit radioaktiv markiertem α -³²ATP und T4-Polynukleotidkinase für eine Stunde phosphoryliert.

2.2.6. *In vitro*-Transkription

Die Plasmide wurden stromabwärts der zu untersuchenden Sequenz mit dem entsprechenden Enzym linearisiert und unter Kontrolle des SP6 Promotors in Anwesenheit des cap Analogs m⁷GpppG und RNA Polymerase synthetisiert.

Standardansatz für die *in vitro*-Transkription

5 µl 10 x Transkriptionspuffer
 7,5 µl 3,3 mM ATP, UTP, CTP
 5 µl 0,5 mM GTP
 5 µl 5mM m⁷GpppG
 5 µl linearisierte Plasmid-DNA (200 ng/µl)
 50 U RNase Inhibitor
 15 U SP6-Polymerase

Das Endvolumen von 50 µl wurde mit H₂O eingestellt.

Der Transkriptionsansatz wurde für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Nach DNA Verdau und zweimaliger Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die RNA mit Ethanol präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in einer Konzentration von 1 µg/µl in H₂O aufgenommen.

2.2.7. *In vitro*-Translation

1 µg mRNA wurde mit Aminosäuren (minus Methionin) und ³⁵S Methionin in einem Gesamtvolumen von 50µl für eine Stunde bei 30°C (Retikulozytensysat) oder 25°C (Weizenkeimextrakt) inkubiert.

Retikulozytenlysat

30µl Retikulozytenlysat (Promega)
 1µl mRNA
 1µl ³⁵S Methionin (10mCi/ml)
 1µl Aminosäuren-Mix (ohne Methionin)
 2µl 1 M KOAc
 15µl H₂O

Weizenkeimextrakt

8 µl Weizenkeimextrakt (Promega)
 1 µl mRNA
 1 µl ³⁵S Methionin
 5 µl Aminosäuren-Mix (ohne Methionin)
 (vom Hersteller mitgeliefert)
 35µl H₂O

Die Translations-Reaktionen wurde durch Zugabe des gleichen Volumens an 2 x Dissoziationspuffer und 3minütigem Kochen gestoppt.

2 x Dissoziationspuffer

0,1 M Tris/HCl (pH 6,8)
 17,2 % (v/v) Glycerin
 4% (w/v) SDS
 0,8 M Mercaptoethanol

2.2.8. Nachweis radioaktiv-markierter Translationsprodukte

Zur Identifikation der radioaktiv-markierten Translationsprodukte wurden die Proben auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) aufgetrennt und durch Fluorographie wie bei Hames und Rickwood (1987) erläutert, dargestellt: Hierbei wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel für 2 Stunden in 10% Essigsäure und 40% Methanol unter leichtem Schütteln fixiert, 2 x 30 Min. in 100% DMSO geschwenkt, eine Stunde in Rotifluoreszenzfarbstoff inkubiert und anschließend eine Stunde in H₂O gewässert. Dann wurden die Gele bei 60°C in einem Vakuum-Geltrockner getrocknet und mittels Autoradiographie analysiert.

2.2.9. Protoplastenpräparation

Die Isolierung von Mesophyllprotoplasten (modifiziert nach Jefferson, 1987) erfolgte aus Blättern 6 bis 8 Wochen alter, steril aufgewachsenen Kartoffelpflanzen. Die Blätter wurden über Nacht in K3-Medium mit einer Enzymmischung aus 0,2 % (w/v) Cellulase und 0,2 % (w/v) Mazerozym R-10 bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Nach 30minütigem leichtem Schütteln des Ansatzes wurde dieser über ein Sieb mit mindestens 100 µm Maschenweite gegeben. Die Lösung mit den Protoplasten wurde 5 Minuten (bei 1000 rpm) zentrifugiert und anschließend die Zelltrümmer und K3-Lösung unter den schwimmenden Protoplasten abgesaugt. Nach zweimaligem waschen mit W5 wurden die Protoplasten in einer MaMg-Lösung aufgenommen.

K3-Medium

4,2 g	„Murashige and Skoog basal medium“ (Sigma)
100 mg	Inosit
250 mg	Xylose
136,92 g	Saccharose
1000 ml	Gesamtvolumen mit H ₂ O
pH 5,6	
600 mOs (osmotischer Wert)	

W5

154 mM NaCl
125 mM CaCl ₂
5 mM KCl
5 mM Glucose
pH 5,6-6

MaMg

450 mM Mannitol
15 mM MgCl ₂
0,1 % (w/v) MES
pH 5,6

2.2.10. Protoplastentransfektion

Protoplasten wurden mit MaMg-Medium auf eine Zelldichte von etwa 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in Polystyrolröhrchen transferiert und nach Zugabe der DNA (10 µg Plasmid-DNA pro 100 µl Protoplasten/MaMg/Volumen) 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde ein gleiches Volumen an PEG (0,1 M $\text{Ca}(\text{NO}_2)_3 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,4 M Mannitol, 40% (w/v) PEG 4000, pH 7-9) addiert. Der Ansatz wurde für weitere 25 Minuten bei Raumtemperatur gehalten und dann 6 Volumen K3 (+ 1mg/l NAA, 250 mg/l Claforan) zugegeben. Die Protoplastenansätze wurden dann für ein bis zwei Tage bei 26°C im Dauerdunkel gehalten. Anschließend wurden die Röhrchen mit W5 gefüllt, die transfizierten Protoplasten abzentrifugiert und in flüssigem N_2 aufgeschlossen.

2.2.11. Glukuronidase-Aktivitätstest (GUS-Test)

β -Glukuroidase-Aktivitäten in rohen Protoplastenextrakten und Extrakten transgener Pflanzen wurden durch den Umsatz von 4-Methyl-Umbelliferyl-Glukuronid (4-MUG) zu dem fluoreszierenden Endprodukt 4-Methyl-Umbelliferon (4-MU) nach etablierten Protokollen (Jefferson, 1987) bestimmt. Hierfür wurde der zu untersuchende Extrakt mit GUS-Extraktionspuffer lysiert und nach Proteinbestimmung (Bradford, 1976) verdünnt und standardisiert. 10mM 4-MUG wurde bei 37°C mit 5µg des Proteinextrakts für eine Stunde in GUS-Extraktionspuffer inkubiert. Die Enzymaktivitäten wurden nach fluorimetischen Messung (Perkin-Elmer LS-2B) in pmol Methylumbelliferon (MU) pro mg Protein und Minute unter Verwendung von MU-Standardkurven berechnet.

GUS Extraktionspuffer

50 mM NaPO_4 (pH 7,0)
10 mM β -Mercaptothanol
10 mM Na_2EDTA
0,1 % (w/v) Triton X-100

2.2.12. Pflanzentransformation

Die stabile Integration chimärer GUS/PLRV-Konstrukte in das pflanzliche Genom durch Wundinfektion von Kartoffelblatt- und Tabak-Explantaten mit *Agrobacterium tumefaciens*, sowie die Pflanzenregeneration wurde nach etablierten Protokollen (Horsch *et al.*, 1985, 1986) durchgeführt. Hierfür wurden transformierte Agrobakterien-Kulturen bei 28°C über Nacht in YEB-Medium angezogen und mit 10 mM MgSO₄ und MSI-Medium gewaschen. Die Zellsuspension (ca. 40 ml) wurde auf OD=1 eingestellt und mit verwundeten Blattscheibchen inkubiert. Nachfolgend wurden die Blattscheiben 2 Tage bei 26°C im Dunkelraum auf MSI-Agar kultiviert. Die weitere Kultivierung erfolgte unter Langtag-Bedingungen (16 Std. Licht, 25°C; 8 Std. Dunkelheit, 18°C; 55% rel. Luftfeuchte). Vor dem Transfer und der Kultivierung auf MSII-Medium wurden die Blattscheiben in Claforan (1g/l in MSI) gewaschen. Nach der Entwicklung von Kalli und nachfolgenden Sprossachsen auf MSII-Medium (nach ca. 1-3 Monaten; Medienwechsel ca. alle 2 Wochen) wurden die Sprossachsen auf MSIII-Medium überführt. Nach der Wurzelbildung auf MSIII (ca. 2-4 Wochen) erfolgte der Transfer der transgenen Pflanzen in Erde und nach einer Woche in der Phytokammer wurden die Pflanzen ins Gewächshaus gestellt.

2.2.13. Proteinisolierung aus Pflanzen

Das Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Ca. 300 mg des Pflanzenpulvers wurden in 900 µl 1 x Probenpuffer (ROTI®, Roth) aufgenommen und 5 Minuten in einem Wasserbad bei 100°C erhitzt. Die Probe wurde 1 h bei RT geschüttelt, abzentrifugiert und 500 µl des Überstandes mit dem doppelten Volumen Aceton über Nacht bei -20°C präzipitiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation und Waschen mit 70%igem (v/v) Aceton wurde das Sediment in 100-200 µl 6 M Harnstoff/5 % Essigsäure resuspendiert. Die Probe wurde erneut 15 min geschüttelt, 5 Minuten abzentrifugiert und mit ca. 1-2 µl des Überstandes in einem Bradford-Test der Proteingehalt bestimmt (Bradford, 1976).

2.2.14. Proteinisolierung aus Protoplasten

Die Protoplasten wurden in 200 µl Puffer D (siehe 2.2.1.4.) aufgenommen und mit zwei Volumen Phenol gemischt und zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Proteine aus dem Phenol mit 1000 µl Aceton über Nacht bei -20°C präzipitiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation und Waschen mit 70%igem (v/v) Aceton wurde das Sediment in 50 µl 6 M Harnstoff/5 % (v/v) Essigsäure resuspendiert. Die Probe wurde 30 min geschüttelt, 5 Minuten abzentrifugiert und mit ca. 1-2 µl des Überstandes in einem Bradford-Test der Proteingehalt bestimmt (Bradford, 1976).

2.2.15. Western Blot

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer relativen Molekülmasse erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in 12,5 - 16 %igen vertikalen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Eine Proteinlösung der gewünschten Konzentration wurde mit 1/4 Vol 4x Probenpuffer (ROTH) versetzt, 3 Min. in einem kochenden Wasserbad erhitzt und nach dem Abkühlen aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend in einer BioRad Trans-Blot Apparatur für 4 h mit 300 mA bei 4°C auf ein Nitrozellulosefilter übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Die Qualität des Proteintransfers wurde mit einer Ponceau-S Färbung (Serva) verifiziert.

Trans-Blot Puffer

25 mM Tris
192 mM Glycin

2.2.16. Proteindetektion

Für den Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine mit poly- und monoklonalen Antisera wurde das "ECL Western Blotting Detection System" (Amersham) verwendet, das auf der enzymatischen Chemolumineszenz einer durch Peroxidase katalysierten Oxidation von Luminol in Anwesenheit von H₂O₂ beruht. Die auf Nitrozellulose (S&S) transferierten Proteine wurden nach einstündiger Inkubation in Blocklösung mit dem entsprechenden Antikörper (Verdünnung 1:10000) bei Raumtemperatur zum inkubieren für eine Stunde leicht geschwenkt. Die Antisera wurden vorher u.U. mit Proteinextrakt aus Wildtyp-Kartoffelpflanzen vorinkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern wurde die Nitrozellulose-Membran dreimal 10 Min. mit TBS gewaschen. Peroxidase-sekundäre-Antikörper (Verdünnung 1:10000) wurden anschließend in Blocklösung zugegeben und für höchstens 1 Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Nicht gebundene Antikörper wurden wieder mit dest. Wasser und TBS-Puffer (3 x 15 Min.) abgewaschen und die Proteinbanden im Anschluss daran mit dem ECL-System nach Herstellerangaben sichtbar gemacht.

TBS

20 mM Tris-HCl (pH 7,6)
137 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween20

Blocklösung

1 x TBS
5 % (w/v) Magermilchpulver
oder
1 x TBS
0,5 % (w/v) Casein

2.2.17. Sonstiges

Alle hier nicht näher ausgeführten Standardmethoden wurden nach Maniatis *et al.* (1982) oder Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1994) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Die biologische Bedeutung der durch 1min, 2min und 3min codierten Proteine im Lebenszyklus von PLRV ist nicht bekannt. In Vorarbeiten (Prüfer, 1992) wurde ansatzweise beschrieben, dass eines der Proteine - ORF2min - wahrscheinlich durch interne Initiation der Translation gebildet wird. In weiterführenden Studien sollte daher neben einer eingehenden Analyse des zugrundeliegenden Expressionsmechanismus, die mögliche Funktion von ORF2min aufgezeigt werden. Während für das Studium der Expression von ORF2min hauptsächlich chimäre PLRV/Reporterenzym Konstrukte *in vitro* und *in vivo* verwendet werden sollten, wurde die biologische Bedeutung von ORF2min im viralen Lebenszyklus mittels reverser Genetik basierend auf etablierten PLRV "voller Länge" Klonen untersucht.

3.1 Untersuchungen zum Replikase-Komplex anhand von voller Länge Mutanten

Für die Analyse der unbekannt Proteine 1min, 2min und 3min, in der Region des offenen Leserasters ORF1 wurden in diesem Bereich volle Längen Mutanten hergestellt. Hierzu wurde auf die vorhandenen infektiösen cDNA Klone der kanadischen und deutschen Virusisolate zurückgegriffen. In diesen pBINcDNA Konstrukten wird die gesamte PLRV-cDNA unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert.

Zur Herstellung dieser voller Längen Mutanten wurde ein *Xba*I-Fragment (nt 971-3020) aus dem kanadischen Klon pBINcDNA^c nach pBluescript kloniert (pBlueORF1). Auf Basis von pBlueORF1 wurden durch PCR Mutagenese (Oligonukleotide T38FW, T38BW und T41 bzw. T34) folgende Änderungen in der Sequenz von ORF2min vorgenommen: In pBINcDNA^cMut41 wurde lediglich eine Base, G → A (nt 1553) ausgetauscht. Dies hatte den Vorteil, dass die Aminosäuresequenz des offenen Leserasters ORF1 nicht verändert wurde, aber im ORF2min in der 5'-Region ein *amber*-Stopcodon eingeführt wurde. Hierdurch wurde eine vorzeitige Termination der Translation von 2min erreicht. In der zweiten Mutante, pBINcDNA^cMut34, wurden die Nukleotidsequenz AGAGG zu TCTCC (nt 1559-1563) ausgetauscht. Hierbei wurden zwar auch drei Aminosäuren im offenen Leseraster ORF1 geändert, aber kein zusätzliches Stopcodon eingefügt (Abbildung 6). Auf diese Mutation wird in späteren Kapiteln und der Diskussion noch eingegangen.

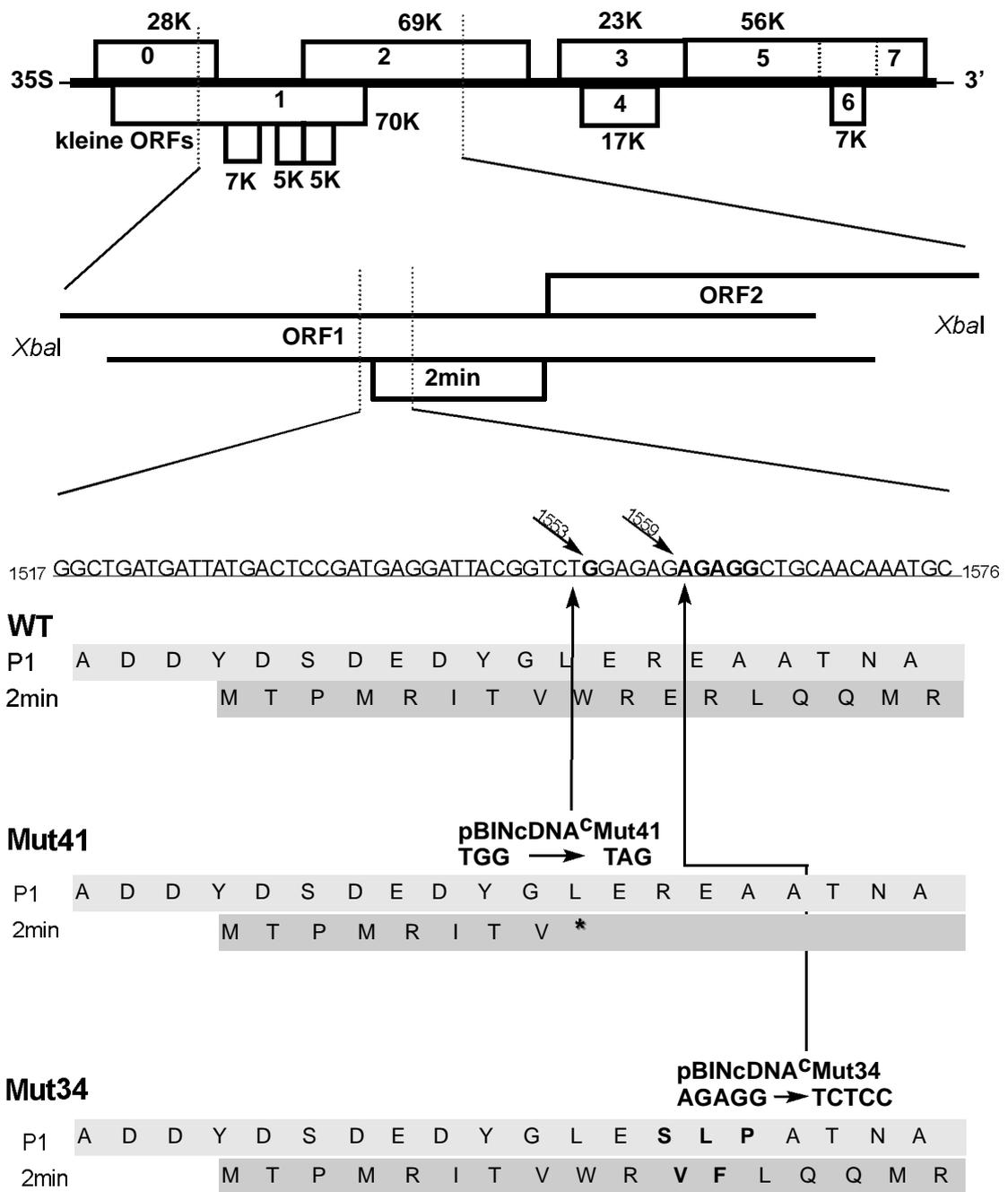


Abb. 6: Vollängen Mutanten in der pBINcDNA^C.

Schematische Repräsentation der genomischen RNA mit offenen Leserastern. Oben: *Xba*I-Fragment (Koordinaten 971-3020) der kanadischen PLRV-Sequenz. Unten: Relevanter Sequenzbereich von ORF2min (nt 1517-1576) mit Positionen der Mutanten. Die Positionen der spezifischen Mutationen pBINcDNA^CMut41 und pBINcDNA^CMut34 sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die veränderten Basen, bzw. deren Aminosäuren, sind jeweils mit Fettschrift gekennzeichnet.

Zur Analyse von ORF2min wurden in Folge Kartoffelprotoplasten mit den Wildtyp cDNAs (pBINcDNA^C, pBINcDNA^G) und den veränderten cDNA-Konstrukten (pBINcDNA^CMut41, pBINcDNA^CMut34) transfiziert. Nach zwei Tagen wurde eine Proteinextraktion durchgeführt und diese anhand von Western Blotting untersucht (siehe Material und Methoden). Hierbei wurden primäre monoklonale Antikörper gegen das Hüllprotein P3 (23K) und polyklonale Antikörper gegen das Replikaseprotein P1 (70K) verwendet.

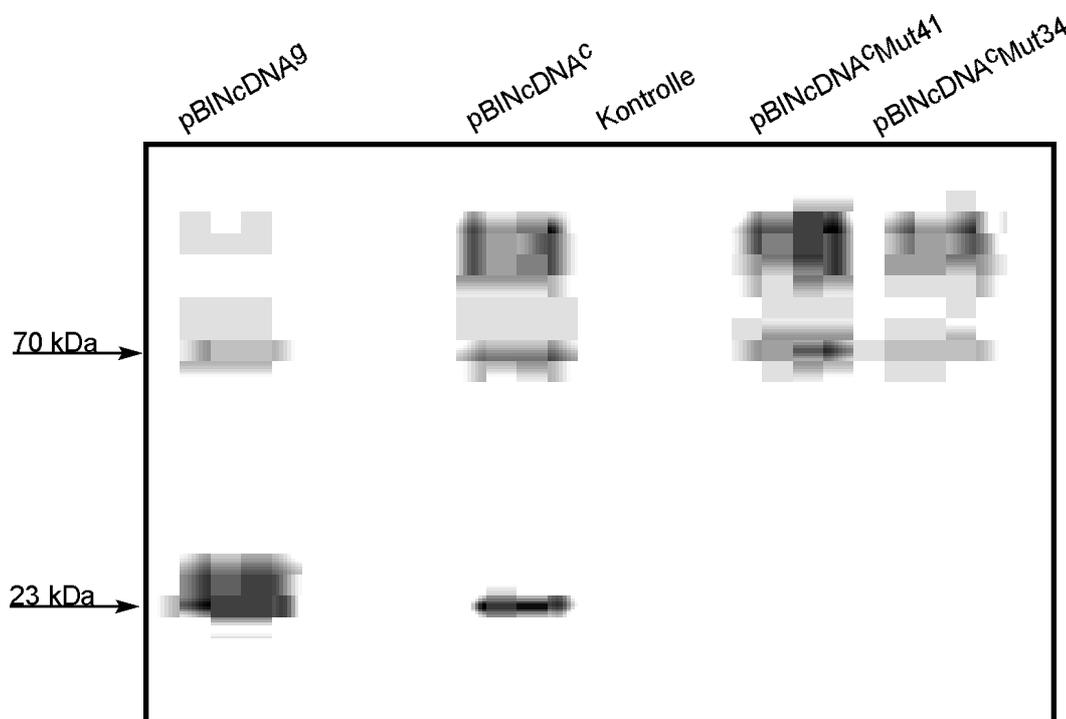


Abb. 7: Western Blott von transfizierten Protoplasten.

Die Gesamtproteine der Protoplasten wurden zwei Tage nach der Transfektion mit Aceton aufgereinigt und in einem 15% SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose-Filter wurden diese mit polyklonalen Antikörpern gegen P1 (70K) und monoklonalen Antikörpern gegen das Hüllprotein (23K) inkubiert. Spur 1: pBINcDNA^G, deutscher Wildtyp. Spur 2: pBINcDNA^C, kanadischer Wildtyp. Spur 3: Kontrolle, nicht transfizierter Kartoffelprotoplasten. Spur 4: pBINcDNA^CMut41, Stopcodon im 5'-Ende von 2min. Spur 5: pBINcDNA^CMut34, Austausch von 5 Basen. Das 70 kDa Protein von P1 konnte in allen transfizierten Protoplasten nachgewiesen werden. Das Hüllprotein konnte hingegen nur in den beiden Wildtypen detektiert werden.

Wie in Abbildung 7 ersichtlich, wurden nur bei der deutschen und kanadischen Wildtyp cDNA Hüllproteine exprimiert. Das 70 K (P1) Protein wurde bei allen transfizierten Protoplasten detektiert. Da das 70 K Protein vom 5'-Ende der viralen RNA translatiert wird, welche unter Kontrolle des 35S Promotors transkribiert wurde, steht seine Produktion nicht in Verbindung mit der viralen Replikation. Das Hüllprotein dagegen kann nur von der sgRNA1 translatiert werden. Folglich wurde durch die Mutationen entweder die virale Replikation oder die Produktion der sgRNA1 gestört. Um zu untersuchen, welcher dieser beiden Annahmen richtig ist, wurde die RNA der transfizierten Protoplasten einer Northern Blot-Analyse unterworfen (Abbildung 8).

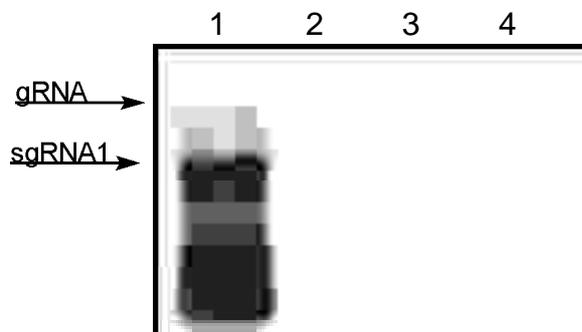


Abb. 8: Northern Blot von transfizierten Protoplasten.

Die Gesamt-RNA wurde aus den Protoplasten isoliert, unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt, auf Hybond N-Filter transferiert und mit einer spezifischen Sonde gegen das ORF3 (codierende Sequenz für das Hüllprotein) hybridisiert. Spur 1: pBINcDNA^c, kanadischer Wildtyp. Spur 2: Kontrolle, nicht transfizierter Protoplasten. Spur 3: pBINcDNA^cMut41, Stopcodon im 5'-Ende von 2min. Spur 4: pBINcDNA^cMut34, Austausch von 5 Basen. Genomische und subgenomische RNA konnte nur in den mit dem Wildtyp-Konstrukt transfizierten Protoplasten nachgewiesen werden.

Bei der Northern-Analyse konnte nur für das Wildtyp-Konstrukt genomische und subgenomische RNA nachgewiesen werden, nicht aber bei den Mutanten. Auch die unter der Kontrolle des 35S Promotors von dem eingebrachten Plasmid transkribierte RNA war nicht nachweisbar. Da relativ wenig mRNA transkribiert wurde und diese auch nicht durch Viruspartikel geschützt ist, kann davon ausgegangen werden, dass beim Wildtyp viral replizierte RNA nachgewiesen wurde.

Da bei der pBINcDNA^cMut41 die Aminosäuresequenz des P1 nicht verändert wurde und nur das Leseraster von 2min betroffen ist, kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass das kleine 2min translatiert wird und dass das Protein für die virale Replikation essentiell ist. Da das ORF2min eine wichtige Rolle bei der viralen Replikation spielt wurde es mit RAP1 (Replikation assoziiertes Protein) bezeichnet.

3.2. Untersuchungen zum Translationsmechanismus von RAP1

Das kleine Leseraster von RAP1 (ehemals 2min) liegt ca. 1500 Basen stromabwärts des 5'-Endes der genomischen RNA. Eine posttranslationale proteolytische Abspaltung von einem anderen Protein kommt als Entstehungsmechanismus dieses Proteins nicht in Frage, da stromaufwärts kein potentiellles Fusionsprotein liegt. Eine weitere, dem ORF entsprechende, subgenomische RNA konnte nicht gefunden werden (Ashoub *et al.*, 1998). Dies spricht für eine interne Translationsinitiation und somit für das Vorhandensein einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES). Zur Identifikation einer vermuteten internen Translationsinitiation wurde die codierende Sequenz von RAP1 in das GUS-Gen inkloniert (Abbildung 9 A).

Um den kurzen, für RAP1 codierenden Bereich besser analysieren zu können, wurde das offene Leseraster (nt 1061-1773), um das 3'-Ende des GUS-Gens vergrößert. Diese bicistronischen, chimären mRNAs eignen sich in Translationsanalysen zur Untersuchung eines eventuellen zweiten Translationsproduktes. Hierfür wurde das RAP1-Stopcodon zu UAC mutagenisiert. Das daraus resultierende Konstrukt mut1 codiert demnach für das N-terminale Ende des GUS-Gens und einen Teil des ORF1. Dieses N-GUS-ORF1-Protein ist ca. 46 kDa groß. Bei einer internen Initiation im Bereich von RAP1 würde das AUG ein chimäres zweites Protein, RAP1-C-GUS, von ca. 43 kDa in einem anderen Leseraster initiieren. Im Gegensatz dazu könnte bei mut2, in welchem das RAP1-Stopcodon vorhanden ist, nur das GUS-N-ORF1-Protein sichtbar gemacht werden. Da hier, auch wenn interne Initiation stattfände, das RAP1 wegen seiner geringen Größe bei der verwendeten PAGE-Analyse nicht nachgewiesen werden könnte.

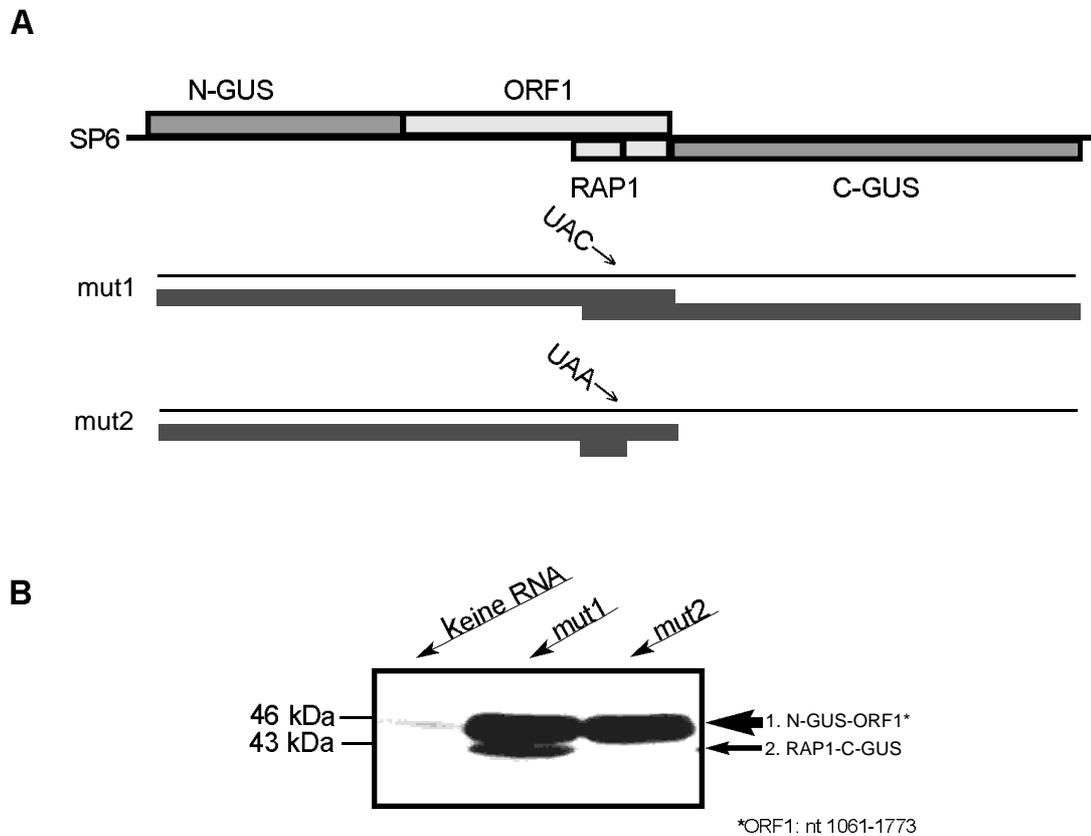


Abb. 9 Chimäre PLRV/GUS-Konstrukte und *in vitro*-Translation der mRNAs von mut1 und mut2.

A: Chimäre PLRV/GUS-Konstrukte für *in vitro*-Transkriptions- /Translationsexperimente. Sequenzen, die in den einzelnen Konstrukten enthalten sind, wurden durch entsprechende Linien gekennzeichnet. Die Balken deuten die zu erwartenden Translationsprodukte an.

B: *in vitro*-Translation der mRNAs von mut1 und mut2. Alle RNAs wurden unter Verwendung des pSP65/SP6-Polymerase-Systems (Melton *et al.*, 1984) hergestellt und in Gegenwart von ^{35}S Methionin in Retikulozytenlysat translatiert. Die Produkte wurden auf einem 16%igen SDS-Gel aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht. Die Pfeile geben die Translationsprodukte des ersten- und des zweiten Cistrons an. Das 43 kDa große Translationsprodukt von dem 2. Cistron konnte in mut1 detektiert werden.

In vitro Transkriptions- und Translationsanalysen (Abbildung 9 B) mit mut1 zeigten tatsächlich eine zusätzliche kleinere Bande von 43 kDa, die dem durch interne Translationsinitiation entstehenden RAP1-C-GUS Fusionsprotein entsprechen könnte. Wie erwartet wurde kein RAP1-C-GUS-Protein bei mut2 gefunden.

Um auszuschließen, dass das 43 kDa Fusionsprotein kein Degradationsprodukt von N-GUS-ORF1 ist, wurde der größte Teil von ORF1 deletiert. Hierfür wurde ein *AluI*-Fragment (nt1481-1773) in den *EcoRV*-verdauten pSP65-GUS Vektor eingesetzt (Abbildung 10 A). Abgesehen von dem erwartet kleineren N-GUS-ORF1, zeigten beide Deletionskonstrukte (mut3: ohne Stopodon, mut4: mit Stopcodon) das gleiche Ergebnis wie mut1 und mut2 (Abbildung 10 B).

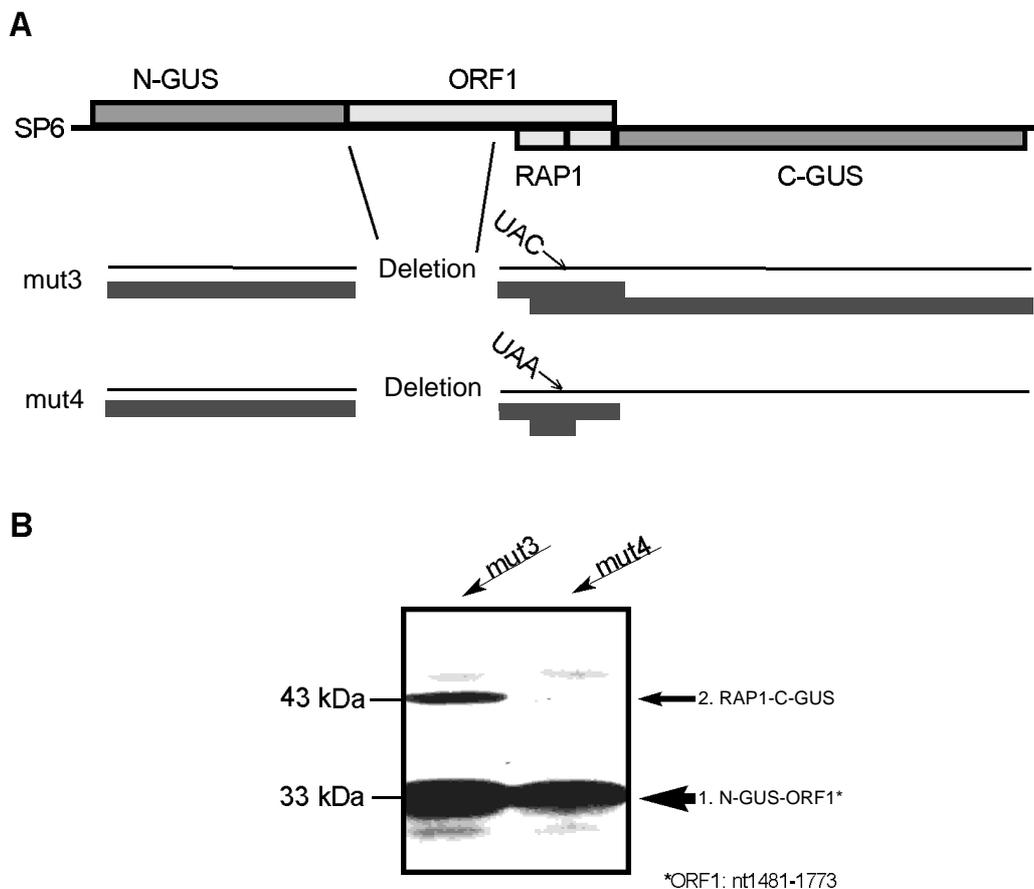


Abb. 10 Chimäre PLRV/GUS-Konstrukte und *in vitro*-Translation der mRNAs von mut3 und mut4.

A: Chimäre PLRV/GUS-Konstrukte für die *in vitro*-Transkriptions- /Translationsexperimente. Sequenzen, die in den einzelnen Konstrukten enthalten sind, sind durch entsprechende Linien gekennzeichnet. Die Balken deuten die zu erwartenden Translationsprodukte an.

B: *in vitro*-Translation der mRNAs von mut3 und mut4. Die Pfeile geben die Translationsprodukte des ersten- und des zweiten Cistrons an. Das 43 kDa große Translationsprodukt des 2. Cistron konnte in mut3 detektiert werden.

Um weiterhin auszuschließen, dass die Translation eines Teils von ORF1 für eine eventuelle interne Initiation von Bedeutung ist, wurde bei *mut5* ein *ochre*-Stopcodon (UAA) am 3'-Ende des N-GUS eingefügt (Abbildung 11 A).

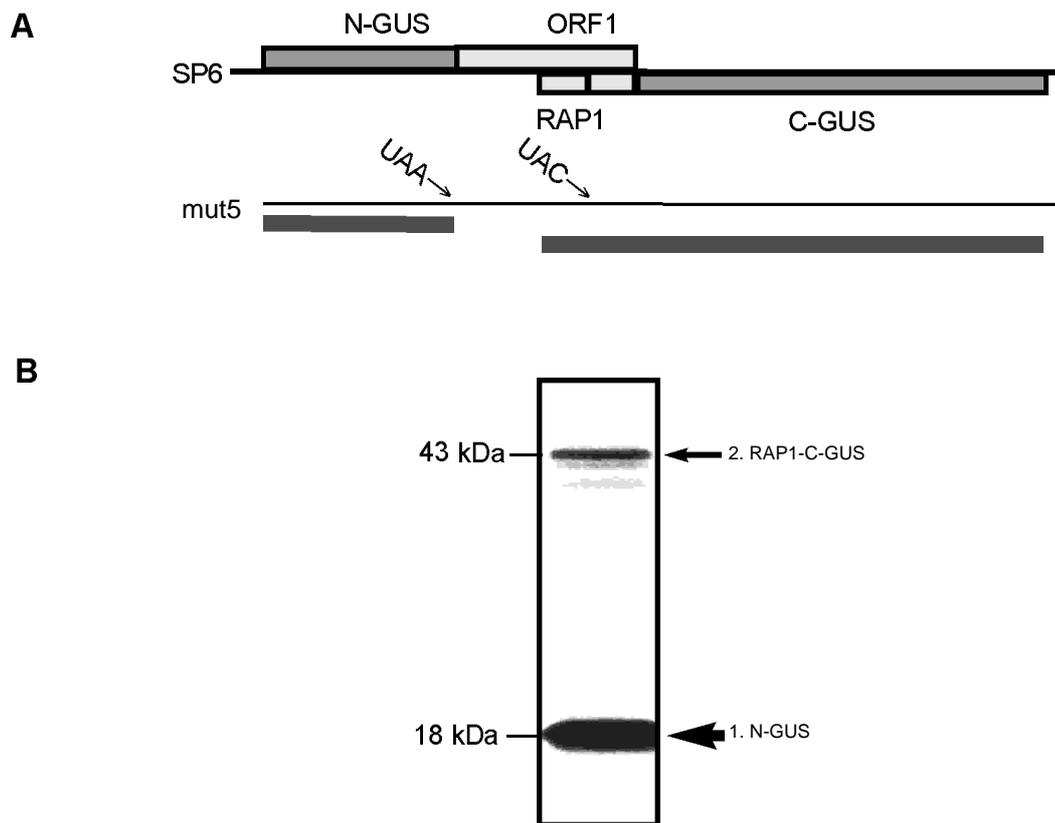


Abb. 11 Chimäres PLRV/GUS-Konstrukt und *in vitro*-Translation der mRNAs von *mut5*

A: Chimäres PLRV/GUS-Konstrukt *mut5* für die *in vitro*-Transkriptions- /Translations-experimente.

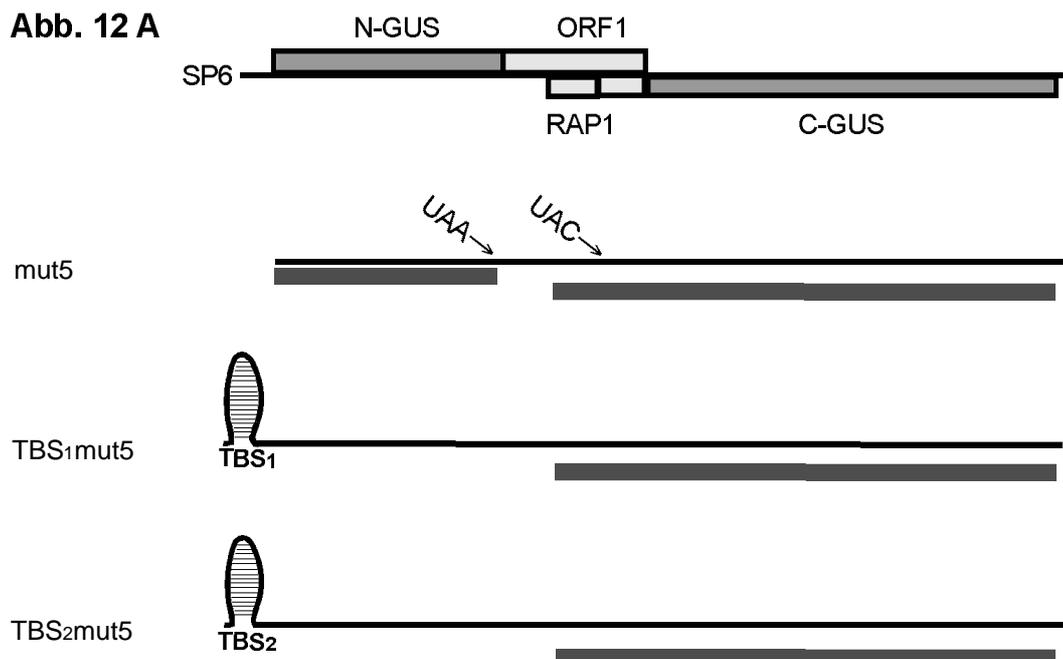
B: *in vitro*-Translation der mRNAs von *mut5*. Die Pfeile geben die Translationsprodukte des ersten- und des zweiten Cistrons an. Das Hauptprodukt N-GUS ist etwa 16 kDa groß.

In vitro-Transkriptions- und Translationsanalysen mit *mut5* zeigten, dass das 43 kDa RAP1-C-GUS Fusionsprotein weiterhin synthetisiert wurde und somit das P1 nicht für eine eventuelle interne Initiation nötig ist (Abbildung 11 B).

Eine Studie von Kozak (1987) sagte aus, dass ein zweites Cistron unter bestimmten Bedingungen, bei einer intercistronischen Sequenz von 79-147 Basen, durch Reinitiation effizient translatiert werden kann. Um zu untersuchen, ob eine solche Termination/Reinitiation nach dem ersten Cistron eventuell eine Rolle spielt, wurde ein zweiter Typ von bicistronischen Transkripten benutzt, die eine sogenannte Translationsblockierungssequenz (TBS) vor dem ersten Cistron tragen. Diese TBS sollte durch die Ausbildung einer stabilen Haarnadel die Translation des ersten Cistrons verhindern (Pelletier und Sonenberg, 1985; Ivanov *et al.*, 1997). Wenn Regionen cap-unabhängig Ribosomen intern rekrutieren können, müssen sie unabhängig von einem stromaufwärts gelegenen, ersten Cistron ein zweites translatieren können.

Um auszuschließen, dass die Ribosomen die von N-GUS bei *mut5* entlassen werden, für die Translation des RAP1-C-GUS reaktiviert werden können, wurden zwei verschiedene TBS (TBS1, TBS2) getestet. TBS1 ist ein *Bam*HI-linker und bildet, wie TBS2, eine stabile Haarnadel aus (TBS1: Pelletier und Sonenberg, 1985; TBS2: Ivanov *et al.*, 1997). Die entsprechenden Oligonukleotide wurden hybridisiert und in die *Nco*I-Seite im 5'-Ende des N-GUS im Konstrukt *mut5* eingefügt (siehe Material und Methoden).

Abb. 12 A



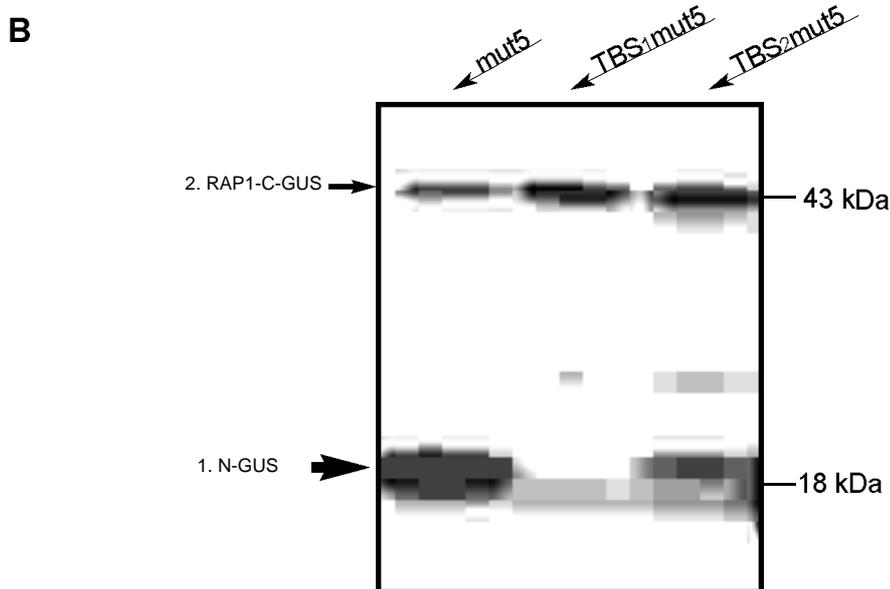


Abb. 12: Weitere chimäre PLRV/GUS-Konstrukte und *in vitro*-Translation der mRNAs.

A: Darstellung von TBS1 und TBS2 mit dem chimären PLRV/GUS-Konstrukt.

B: Translation der mRNAs in Retikulozytenlysats. Spur 1: mut5, ohne TBS. Spur 2: mut5 mit TBS1 vor dem 1.Cistron. Spur 3: mut5 mit TBS2 vor dem 1.Cistron. Das 16 kDa Hauptprodukt N-GUS konnte nur bei mut5 detektiert werden. Vom Konstrukt TBS2 mut5 entstand ein 19 kDa Hauptprodukt (TBS2-N-GUS) in geringerer Intensität. Das Produkt vom 2. Cistron, RAP1-C-GUS liegt unverändert vor.

Abbildung 12 zeigt, dass sowohl TBS1 als auch TBS2 die Translation des ersten Cistrons (N-GUS) verhindern, bzw. stark reduzieren, wobei das zweite Cistron (RAP1-C-GUS) unverändert exprimiert wird. Dies legt die Vermutung nahe, dass das 3'-gelegene Cistron cap-unabhängig, intern initiiert wird.

Um dies zu bestätigen, wurde die mRNA von TBS1mut5 auch in Weizenkeimextrakt translatiert. In diesem *in vitro*-Transkriptions- und Translationsexperiment wurde zudem ein weiteres Konstrukt (mut6) analysiert. Bei mut6 wurde ein zusätzliches *ochre*-Stopcodon direkt am 5' Ende von N-GUS (nach nt 27 von GUS) eingeführt (Abb. 13).

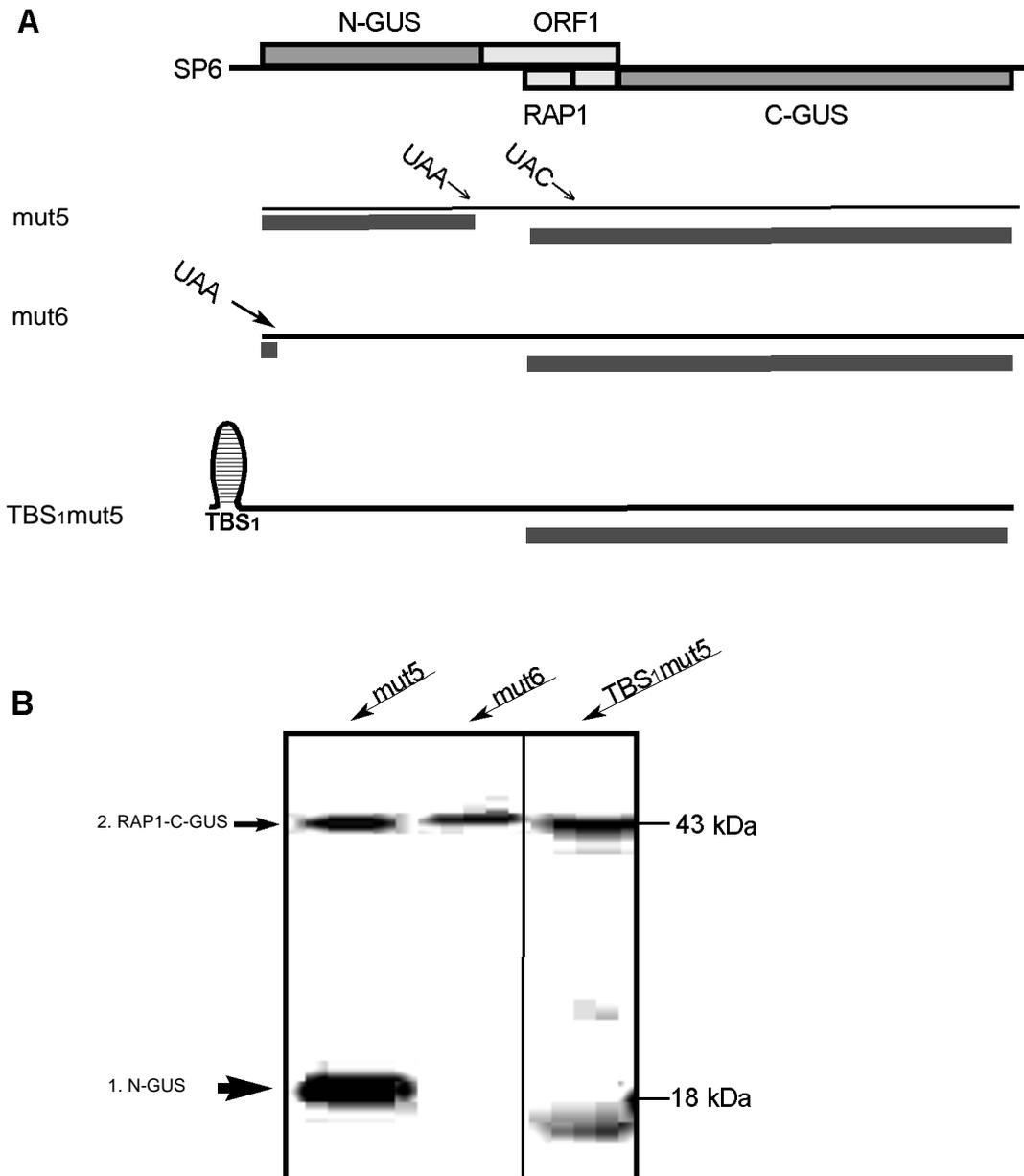


Abb. 13: Weitere chimäre PLRV/GUS-Konstrukte und *in vitro*-Translation der mRNAs.

A: Darstellung von mut5, mut6 und mut5TBS1 mit dem chimären PLRV/GUS-Konstrukt.

B: Translation der mRNAs in Weizenkeimextrakt. Spur 1: mut5, ohne TBS. Spur 2: mut6, wie mut5 aber mit *ochre* Stopcodon am 5'Ende von N-GUS Spur 3: mut5 mit TBS1 vor dem 1.Cistron. Das Produkt vom 2. Cistron, RAP1-C-GUS liegt unverändert vor.

In vitro-Transkriptions- und Translationsanalysen legen nahe, dass das RAP1 intern initiiert wird (Abbildung 9-13). Eine Termination/Reinitiation oder Mechanismen, wie z.B. "leaky scanning" konnte anhand von chimären PLRV/GUS-Konstrukten ausgeschlossen werden.

3.3. Identifizierung des RAP1 Startcodons

Für die Initiation von RAP1 kommen vier verschiedene Startcodons in Frage (Abbildung 14). Substitutionen (AUG zu AUC) der ersten drei möglichen Startcodons führten immer zu einem Translationsprodukt des zweiten Cistrons (keine Abbildung). Hierbei spielte vermutlich die relative Nähe der Startcodons zueinander eine große Rolle. Aus diesem Grund wurde die Region dann durch Insertionen (+A) untersucht. Bei einer Insertion von einer Base würde das Leseraster von ORF1 exprimiert werden, dies führt dann im den N-terminalen Bereich von C-GUS nach 19 Aminosäuren zu einem *ochre* (TAA) Stopcodon (siehe Abb.: 14A). Eine Insertion nach dem tatsächlichen Startcodon würde demnach zu einem Translationsprodukt des 2. Cistrons von 10 kDa führen.

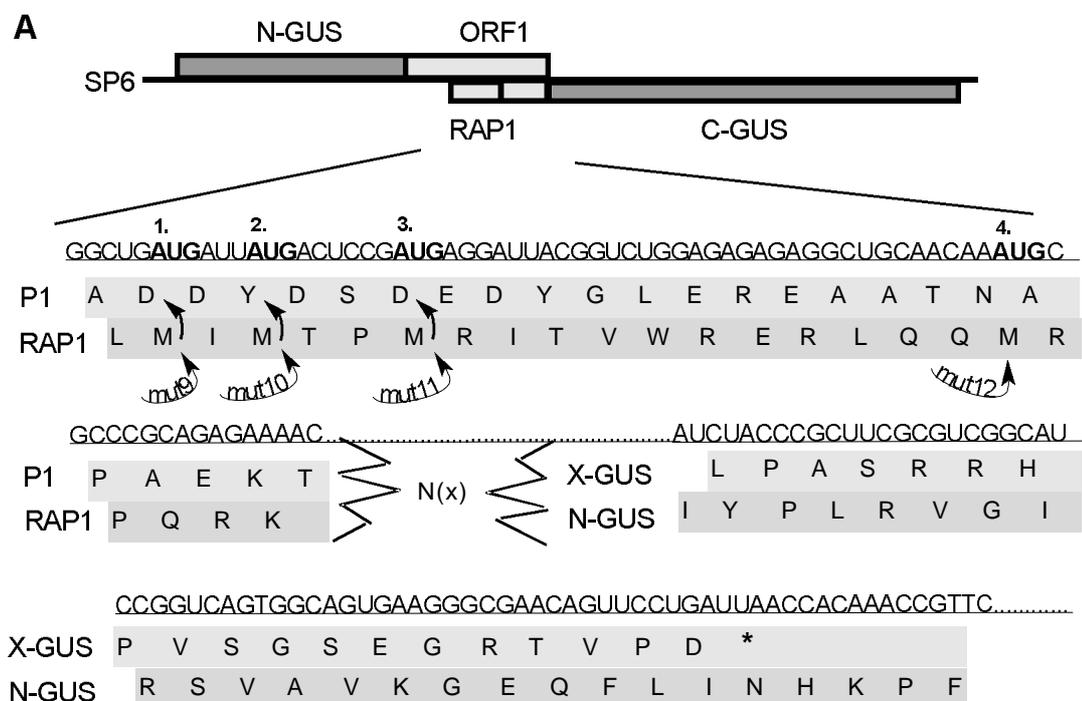


Abb. 14A: Ausschnitt aus mut5 mit den Insertionen (mut9, mut10, mut11) und der Substitution (mut12).

Als Ausgangsbasis für die Mutationen diente mut5. Die Positionen der verschiedenen AUGs sind in Fettschrift und die spezifischen Mutationen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

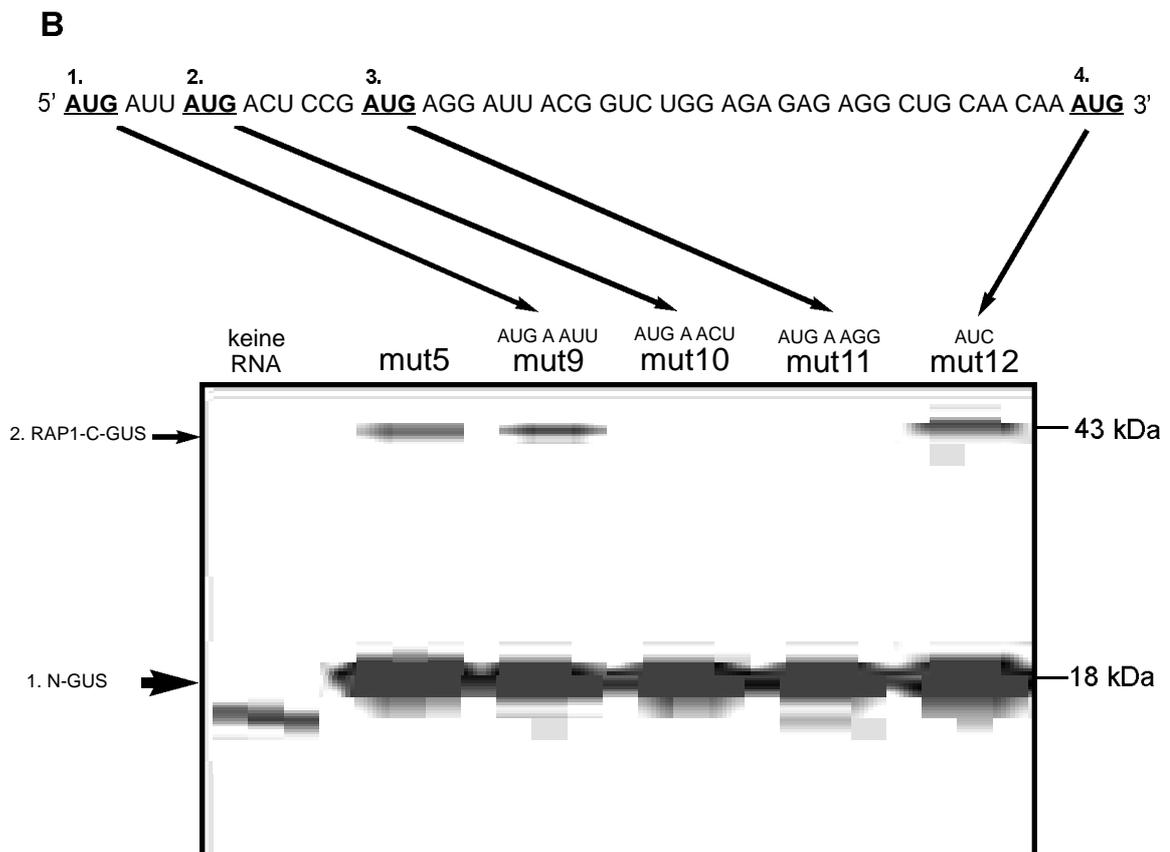


Abb. 14B: In vitro-Transkriptions- /Translationsexperimente der Konstrukten mut9 bis mut12.

Oben: Ausschnitt der Sequenz mit den vier möglichen Startcodons. Unten: SDS-PAGE Analyse der *in vitro*-Translationen der Insertions- und Substitutionsmutanten. Spur 1: Translationsansatz ohne RNA. Spur 2: mut5, Ausgangskonstrukt. Spur 3: mut9, Insertion (+A) nach dem 1. möglichen Startcodon. Spur 4: mut10, Insertion (+A) nach dem 2. möglichen Startcodon. Spur 5: mut11, Insertion (+A) nach dem 3. möglichen Startcodon. Spur 6: mut12, Substitution des 4. möglichen Startcodons (AUG zu AUC). Das RAP1-C-GUS Fusionsprotein tritt nur auf, wenn nach dem AUG₂ das Leseraster nicht geändert wird.

Zur Identifizierung des AUG-Initiationscodons wurden Insertionen (mut9, mut10, mut11) sowie eine Substitution (mut12) durchgeführt. Als Ausgangsbasis für die Mutagenesen diente mut5. Nach *in vitro*-Transkriptions- und Translationsanalysen (Abbildung 14B) ist das zweite AUG (AUG₂) für die interne Translationsinitiation von RAP1 verantwortlich. Insertionen stromabwärts von AUG₂ führten zu keinem RAP1-C-GUS Fusionsprotein. Eine Insertion nach AUG₁, als auch die Änderung von AUG₄ zu AUC hatten keinen Effekt auf die Translationseffizienz. Ein 10 kDa Fusionsprotein, das durch den -1 Leserasterwechsel bei mut10 oder mut11 durch interne Initiation hätte entstehen sollen, konnte nicht detektiert werden.

3.4. Identifizierung von Motiven für eine interne Initiation

Mutationsanalysen zeigten, dass stromabwärts von AUG₂ weitere Motive für die interne Initiation liegen. Um diese Motive einzugrenzen und zu charakterisieren wurden verschiedene Mutagenesen auf Basis von mut5 durchgeführt (keine Abbildung). Hierbei konnte das Sequenzmotiv GGAGAGAGAGG identifiziert werden. Um diese Sequenz zu untersuchen, wurden weitere Mutationen durchgeführt (mut13, mut14, mut15; Abbildung15). Dabei wurde die GGAGAGAGAGG-Sequenz teilweise durch die komplementären Sequenzen CCTCTGAGAGG (mut13) und GGAGAGTCTCC (mut14) oder komplett durch CCTCTCTCTCC (mut15) ersetzt.

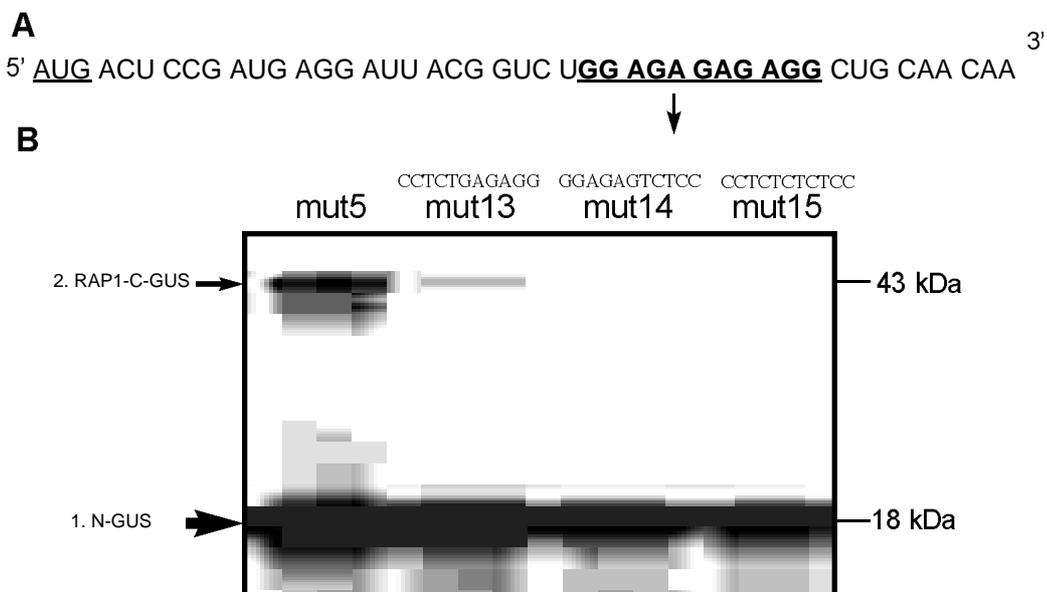


Abb. 15: *In vitro* Transkriptions- / Translationsexperimente der Konstrukte mut13 bis mut15.

A: Ausschnitt der Sequenz (nt 1528-1575) mit dem Motiv GGAGAGAGAGG.

B: SDS-PAGE Analyse der *in vitro*-Translationen der Substitutionsmutanten. Die Initiationseffizienz ist bei Mutationen innerhalb der invertierten Wiederholung GGAGAGAGAGG deutlich verringert.

Mit Hilfe von Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass das RAP1 Startcodon zusammen mit dem Sequenzmotiv GGAGAGAGAGG 22 Nukleotide stromabwärts zur internen Ribosomenbindung führt. Wie aus Abbildung 15 ersichtlich, führten alle drei Substitutionen im Bereich des Motivs zu einer drastischen Verringerung (>90%) der Initiationseffizienz.

3.5. Untersuchungen des Motivs GGAGAGAGAGG

Es konnte gezeigt werden, dass das RAP1 AUG-Startcodon AUG₂ zusammen mit dem Sequenzmotiv GGAGAGAGAGG 22 Nukleotide stromabwärts zur internen Ribosomenbindung führt. Bei einer Reihe von weiteren Mutationen (mut16-25) wurde die Bedeutung des Abstands zwischen AUG₂ und dem GGAGAGAGAGG-Motiv untersucht. Bei mut16 wurde fast die gesamte Region von 21 Nukleotiden deletiert, während bei den Mutationen mut17 bis mut24 eine ansteigende Anzahl von AAA-Triplets eingefügt wurde. In mut25 wurde die invertierte Wiederholung GGAGAGAGAGG unter Beibehaltung des Leserasters verdoppelt, was einer Insertion von 12 Nukleotiden entspricht (Abbildung 16A).

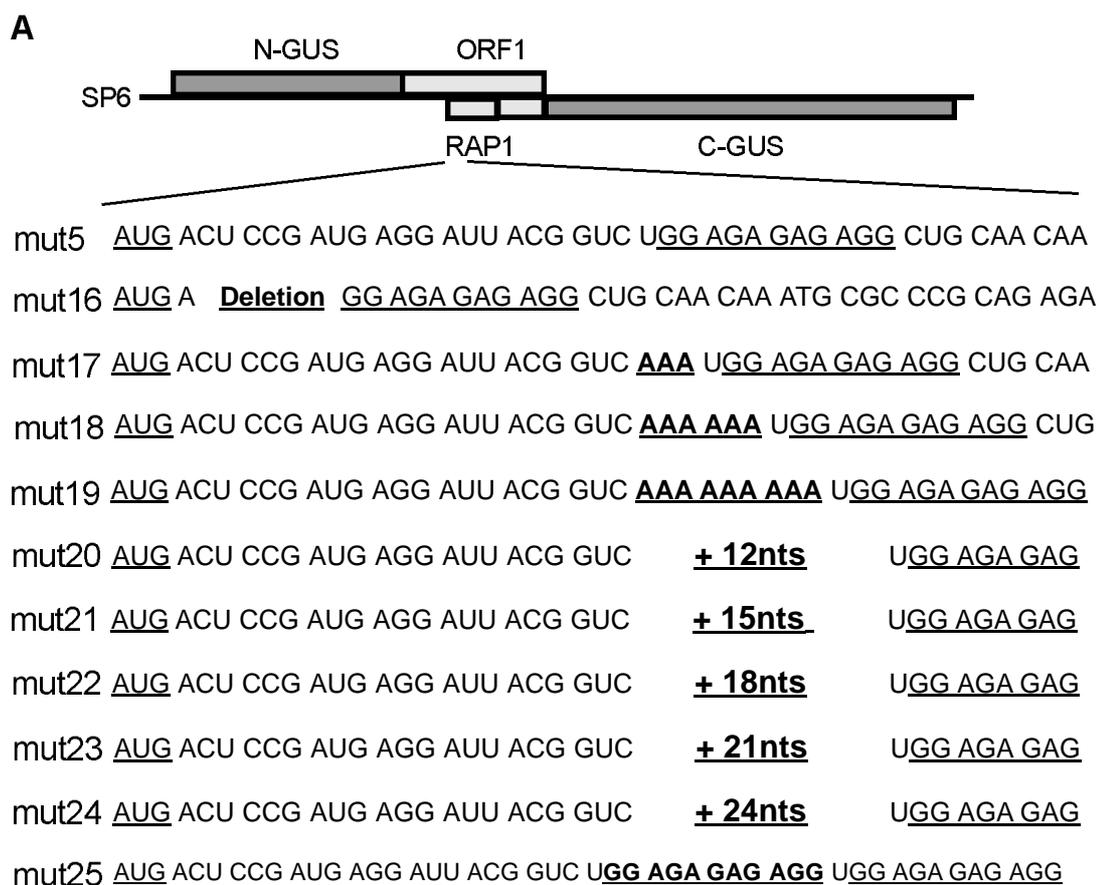


Abb. 16A: Ausschnitt der Sequenz mit den einzelnen Mutationen.

mut5: Ausgangskonstrukt mit der "Wildtypsequenz". mut16: Deletion von 21 Nukleotiden nach dem AUG₂. mut17-mut24: Insertionen einer ansteigenden Anzahl von AAA-Triplets. mut25: Insertion der 12 Nukleotide der invertierten Wiederholung.

Weiterhin wurde eine eventuelle Signifikanz der Region stromabwärts der invertierten Wiederholung GGAGAGAGAGG untersucht. Hierzu wurde bei mut26 die gesamte, für PLRV-codierende Region stromabwärts dieses Motivs deletiert (Abbildung 16B).

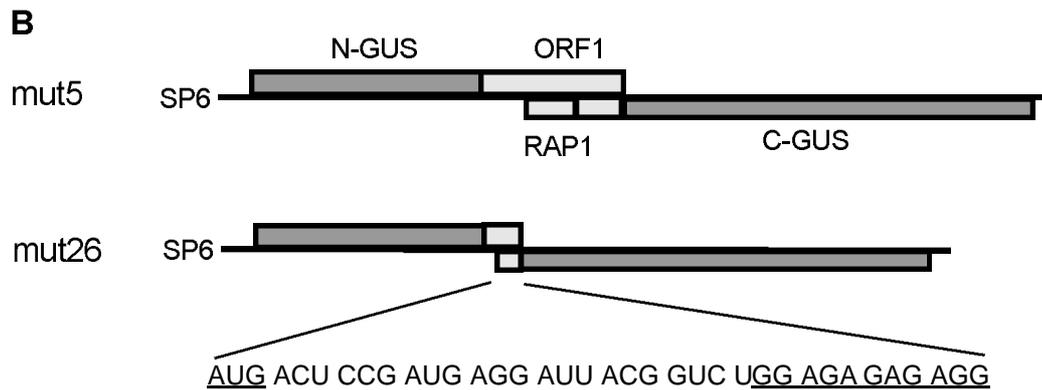


Abb. 16B: Konstrukt für die Deletionsmutante mut26.

Deletion der PLRV-Sequenz am 3'-Ende der invertierten Wiederholung GGAGAGAGAGG.

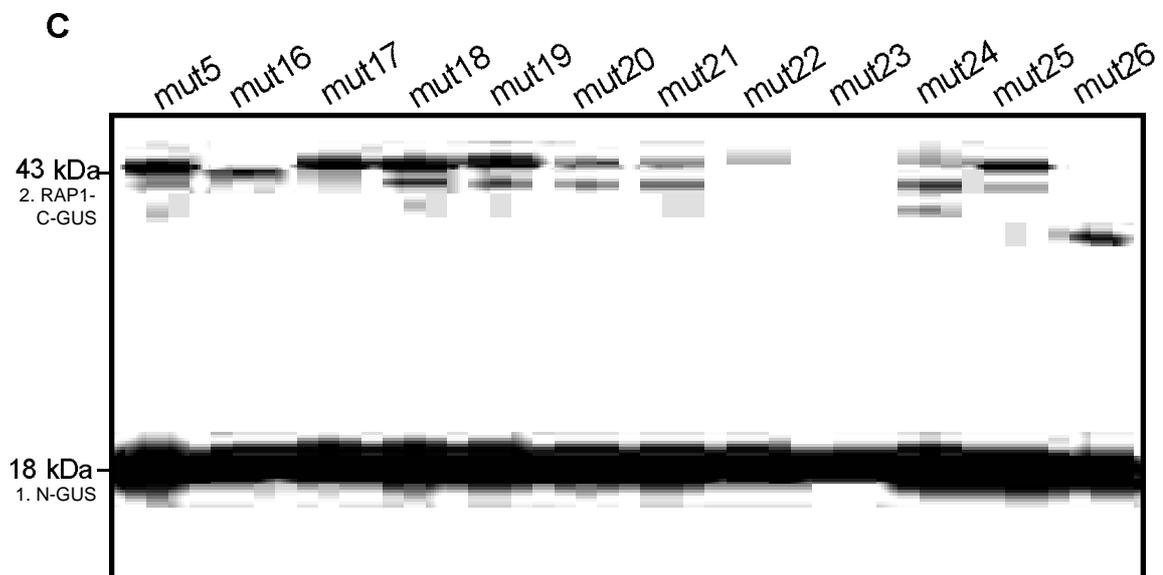


Abb. 16C: *In vitro*-Transkriptions-/Translationsexperimente der Konstrukte mut16 bis mut26.

SDS-PAGE Analyse der *in vitro*-Translationen der Mutanten. Die Initiationseffizienz ist bei den Insertionen ab 12 Nukleotiden (mut20) deutlich verringert. Die Deletion des Bereichs zwischen AUG2 und der invertierten Wiederholung (mut16), sowie die Deletion der PLRV-Sequenz stromabwärts (mut26) zeigen keinen großen Einfluss auf die Initiationseffizienz.

In vitro-Transkriptions- und Translationsanalysen (Abbildung 16) zeigten eine Abnahme um 50% bei der Deletionsmutante (mut16), bei den Insertionsmutanten mit mehr als neun Nukleotiden eine starke Abnahme (>90%) der Initiationseffizienz. Eine Verdopplung des GGAGAGAGAGG-Motivs (mut25) hatte keine signifikante Auswirkungen auf die Translationseffizienz. Die Deletion direkt am 3'-Ende des Motivs (mut26) zeigte ein kleineres, etwa 36 kDa großes, Fusionsprotein der ersten 12 Aminosäuren von RAP1 und dem C-GUS. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Sequenz GGAGAGAGAGG und ihr Abstand zum RAP1-Initiationscodon AUG2 eine wichtige Rolle für die effiziente interne Initiation *in vitro* spielen.

3.6. *In vitro*-Untersuchungen zur möglichen PLRV IRES-Region

Um diese Region auch *in vivo* zu untersuchen, wurde ein neues bicistronisches Konstrukt entwickelt. Hierbei wurde für das erste Cistron GUS als Marker verwendet. Als zweites Cistron wurde die zu untersuchende Region unter Berücksichtigung des Leserasters ans 5'-Ende des Carboxyterminus des ORF1 ligiert. Der Carboxyterminus des ORF1 codiert für das P1C25, das leicht durch monoklonale Antikörper im Western-Blot nachzuweisen ist (Prüfer *et al.*, 1999)

Für die zu untersuchende Region wurde sowohl das gesamte ORF von RAP1 (nt1520-1666), als auch Teile der cDNA-Sequenz verwendet. So wurden die ersten 46 Basen von RAP1 des kanadischen PLRV-Isolates mit dem gleichen Bereich aus dem australischen PLRV-Isolat verglichen. Weiterhin wurde auch ein ähnlicher Sequenzbereich aus CABYV (Cucurbit Aphid-Borne Yellow Virus, nt3097-3105) verwendet. Als Kontrolle wurde bei einem Konstrukt die GGAGAGAGAGG-Sequenz durch CTTCTGAGAGG (wie bei mut13) ersetzt (siehe Abbildung 17A).

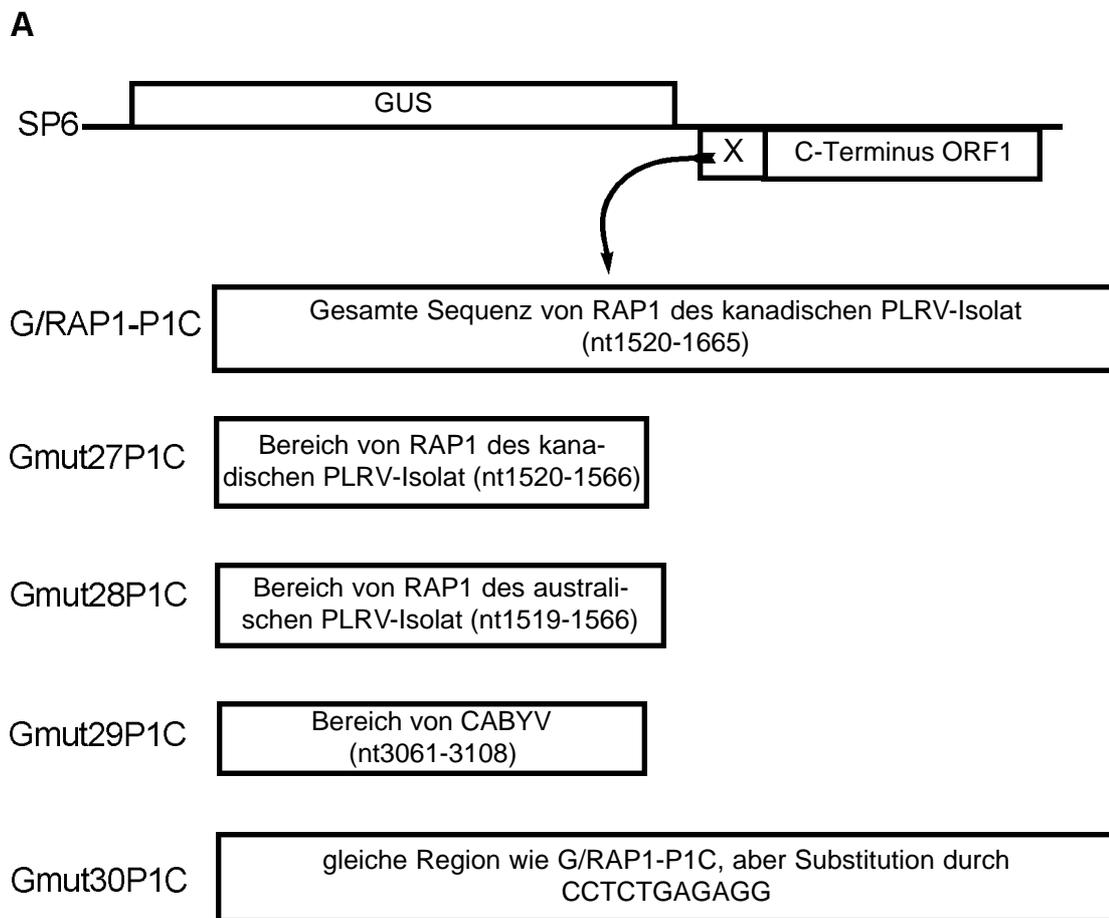


Abb. 17A: Chimäre GUS/PLRV-Konstrukte für die *in vitro*-Transkriptions-/Translations-experimente.

Im zweiten Cistron wurde der Carboxyterminus von ORF1 (PIC) im selben Leseraster zu RAP1, bzw. zu Sequenzmotiven ligiert.

Diese Konstrukte wurden zunächst nach *in vitro*-Transkription und Translation in Weizenkeimextrakt durch Western-Blot analysiert. Hierbei wurde als Kontrolle auch ein monocistronisches Konstrukt translatiert. Bei diesem wurde kein GUS, sondern direkt das RAP1-PIC Fusionsprotein am 5'-Ende der mRNA exprimiert.

Die Translationsprodukte wurden auf einem 16% SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Filter transferiert. Die Filter wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen PIC inkubiert und mit dem ECL-System sichtbar gemacht.

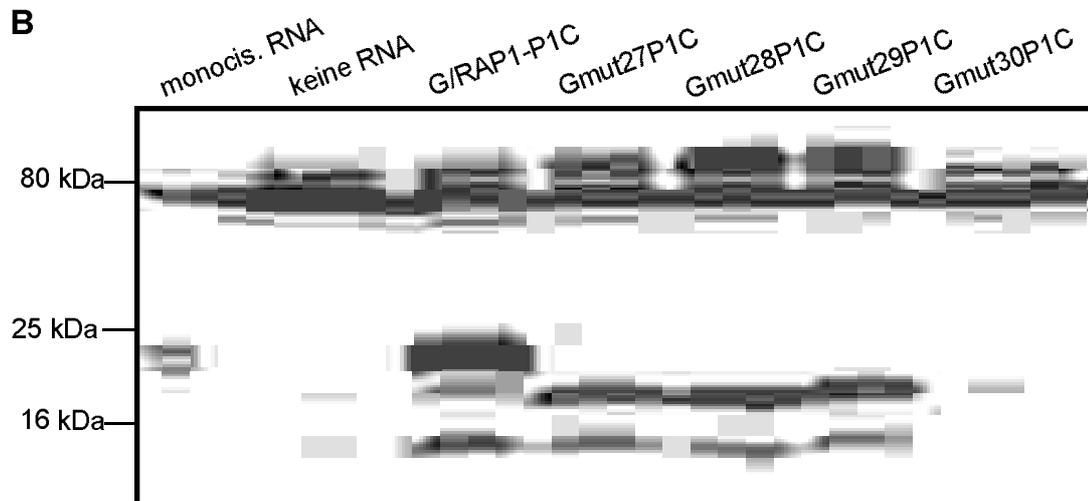


Abb. 17B: Western Blot-Analyse der Translationsprodukte aus Weizenkeimextrakt.

Spur 1: 0,5 µl Translationsprodukt von monocistronischer mRNA (RAP1-P1C). Spur 2: 20 µl Weizenkeimextrakt. Spur 3: 20 µl G/RAP1-P1C, bicistronische mRNA mit Fusion des ganzen RAP1 zum P1C im zweiten Cistron. Spur 4: 20 µl Gmut27P1C, bicistronische mRNA mit Bereich von RAP1 des kanadischen PLRV-Isolat zum P1C. Spur 5: 20 µl Gmut28P1C, bicistronische mRNA mit Bereich von RAP1 des australischen PLRV-Isolat zum P1C. Spur 6: 20 µl Gmut29P1C, bicistronische mRNA mit Bereich von CABYV zum P1C. Spur 7: 20 µl Gmut30P1C, bicistronische RNA mit Inversionsmutante zum P1C. Das erwartete Produkt von RAP1-P1C hat eine Größe von etwa 21 kDa, das der Deletionsmutanten ist etwa 4 kDa kleiner.

In Abbildung 17 kann man erkennen, dass bei allen vier Konstrukten (G/RAP1-P1C, Gmut27P1C, Gmut28P1C, Gmut29P1C) ein Fusionsprotein mit den monoklonalen Antikörper gegen das P1C detektiert werden konnte. Bei Gmut30P1, bei der die GGAGAGAGAGG-Sequenz durch CTTCTGAGAGG ersetzt wurde, konnte kein Fusionsprotein durch interne Initiation translatiert werden.

3.7. *In vivo*-Untersuchungen zur internen Initiation von RAP1

Zusätzlich zu den *in vitro*-Experimenten wurde die Funktion der IRES-Sequenz auch *in vivo* anhand transgener Tabak und Kartoffelpflanzen untersucht. Dazu wurden Pflanzen mit dem GUS-Gen, mit einem bicistronischen GUS/RAP1-P1C Konstrukt und mit dem monocistronischen RAP1-P1C transformiert. Zur Herstellung dieser Konstrukte wurde GUS/RAP1-P1C und RAP1-P1C in den Pflanzentransformationsvektor pBIN19 in die *Hind*III Schnittstelle kloniert. Das GUS und die viralen Gene wurden unter der Kontrolle des konstitutiven *cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S-Promotors exprimiert (Abbildung 18).

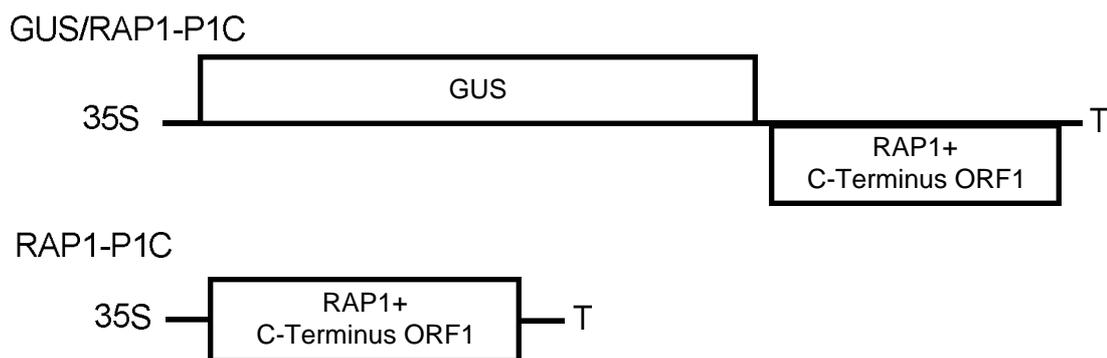


Abb. 18: Schematische Repräsentation der Konstrukte GUS/RAP1-P1C und RAP1-P1C für die Pflanzentransformation.

Diese Konstrukte wurden unter der Kontrolle des konstitutiven *cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S-Promotors exprimiert.

Das GUS-Gen wurde für eine schnelle Identifikation und Quantifizierung der Genexpression in transgenen Pflanzen gewählt. Als zweites Cistron wurde das gesamte RAP1 im selben Leseraster mit dem Carboxyterminus von P1 exprimiert, da dieser leicht durch Western Blot-Analysen mit P1C-Terminus-spezifischen monoklonalen Antikörpern nachzuweisen ist (Kapitel 3.6.). Die oben aufgeführten Konstrukte wurden durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten DNA-Transfer mit entsprechenden rekombinanten Klonen des Agrobakterien-Stamms LBA4404 stabil in das Genom von Kartoffel- und Tabakpflanzen integriert. Auf transgenes Pflanzengewebe wurde mit dem Antibiotikum Kanamycin selektiert. Die erfolgreiche Transformation der regenerierten Pflanzen wurde bei den mit GUS/RAP1-P1C transformierten Pflanzen durch einen GUS-Test bestätigt.

In Abbildung 19 ist ein repräsentativer Western Blot von zwei Pflanzen gezeigt, die das GUS-Enzym von der bicistronischen mRNA exprimieren. In beiden Pflanzen ist das Produkt des RAP1-P1C-Gens immunologisch nachweisbar (Spur 3 und 4). Das Translationsprodukt war dabei etwas kleiner als das der Kontrollpflanzen, die nur das RAP-P1C exprimierten (Spur 1). Dies kann durch verschiedene AUGs als Initiationscodons in den mono- und bicistronischen Konstrukten bedingt sein. Bei den Kontrollpflanzen, die nur das GUS-Enzym exprimierten, zeigten sich keine vergleichbaren immunoreaktiven Banden (Spur 2).

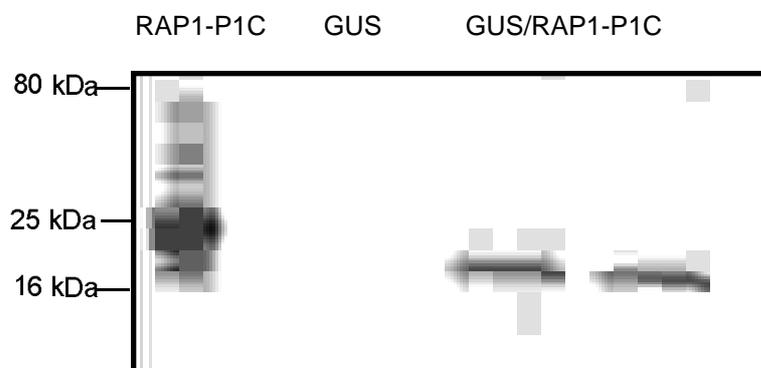


Abb. 19: Westen Blot-Analyse von transgenen Tabak-Pflanzen mit monoklonalen Antikörpern gegen P1C.

Proteine aus transgenen Tabakpflanzen wurden mit Aceton aufgereinigt und auf eine Endkonzentration von $4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ durch einen Bradford-Test eingestellt. Spur 1: $20\mu\text{g}$ Gesamtproteine von RAP1-P1C transgenen Pflanzen. Spur 2: $100\mu\text{g}$ Gesamtproteine von GUS transgenen Pflanzen (GUS). Spur 3: $100\mu\text{g}$ Gesamtproteine von GUS/RAP1-P1C transgenen Pflanzen. Spur 4: $100\mu\text{g}$ Gesamtproteine von GUS/RAP1-P1C transgenen Pflanze. Das erwartete Produkt von RAP1-P1C hat eine Größe von etwa 21 kDa.

Um sicherzustellen, dass das detektierte RAP1-P1C auch wirklich intern aus der bicistronischen mRNA translatiert wurde und kein Produkt eines eventuell degradierten oder unvollständigen mRNA-Moleküls ist, wurde die RNA anhand eines Northern Blots analysiert. Hierfür wurde die Gesamt RNA aus den Pflanzen mit einer Sonde gegen die RNA von RAP1 hybridisiert (Abbildung 20A). Auf dieser Sonde sind komplementäre Sequenzen zur 18S rRNA von *Solanum tuberosum* enthalten. Die schwachen Banden der RNA von GUS/RAP1-P1C auf Höhe der monocistronischen RAP1-P1C RNA kommen womöglich durch Kreuzhybridisierung mit dieser rRNA zustande. Deshalb wurde derselbe Blot, nach Abwaschen der RAP1-Sonde, auch noch mit einer Sonde gegen die ribosomale RNA hybridisiert (Abbildung 20B).

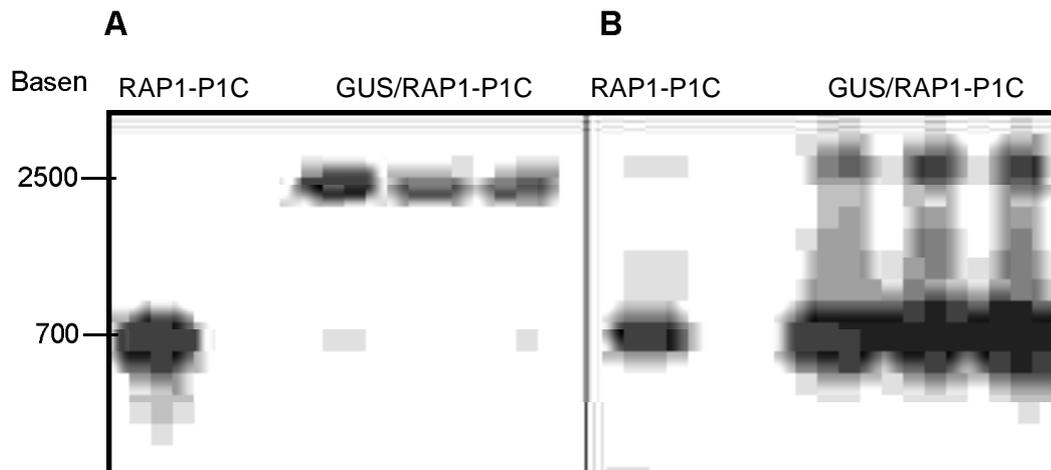


Abb. 20: Northern Blot-Analyse transgener Kartoffelpflanzen. Gesamt-RNA aus Blattmaterial wurde isoliert und unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Für die RAP1-P1C transformierten Pflanzen wurde 50 µg Gesamt-RNA eingesetzt, für die GUS/RAP1-P1C transformierten Pflanzen 200µg. Die RNA wurde auf Hybond N-Filter transferiert und mit den entsprechenden Sonden hybridisiert.

A: Mono- und bicistronische RNA wurde mit einer RAP1-spezifischen Sonde hybridisiert. Für die RAP1-P1C transformierten Pflanzen wurde ein Transkript in der Größe von 670 b und für die GUS/RAP1-P1C Pflanzen eines von etwa 2500 Basen erwartet .

B: Derselbe Blot wurde mit SDS gewaschen und erneut mit einer Sonde gegen die 18S rRNA hybridisiert. Hierfür wurde ein Oligonukleotid, das mit dem 3'-Ende der 18S rRNA hybridisiert, radioaktiv markiert.

3.8. *In vivo*-Untersuchungen zur IRES

Aus diesen *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Translation von RAP1 intern, in Abhängigkeit von einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES) initiiert wird. Die dafür benötigten Motive konnten auf den Bereich stromabwärts des Startcodons eingeschränkt werden. Zur Untersuchung der IRES-Sequenz *in vivo* wurde erwogen mit geeigneten bicistronischen Konstrukten stabil transformierte Pflanzen oder transfizierte Protoplasten durch Western Blot zu analysieren. Da Pflanzentransformationen mit mehreren verschiedenen Konstrukten sehr zeit-, arbeits- und platzaufwendig sind und für Western Blot-Analysen von bicistronischen Konstrukten in transfizierten Protoplasten mindestens 200µg Gesamtprotein von gut aufgearbeiteten und effizient transfizierten Zellen benötigt wird, wurde ein alternatives Untersuchungssystem verwendet (Ivanov unveröffentlicht). Hierfür eignet sich die in Kapitel 3.2. erwähnte Translationsblockierungssequenz (TBS).

Für die *in vivo*-Untersuchung der IRES-Motive wurde unter Verwendung dieser TBS ein neues System entwickelt, das sich bei Protoplastentransfektion anwenden lässt. (Abbildung 21). Durch die TBS sollte die 5' cap-abhängige Translation des GUS-Reportergens unterdrückt werden. Durch Einfügung einer IRES vor dieses GUS-Reportergen sollte seine Expression messbar sein; d.h. das N-terminal vergrößerte GUS kann nur exprimiert werden, wenn es zu einer internen Initiation an einem mit der IRES-Sequenz zusammen eingefügten AUG kommt.

Hierfür wurde der Vektor pFF35S *KpnI/XbaI* verdaut und mit einem *KpnI/SalI* Insert plus einem *SalI/XbaI* GUS (ohne AUG), unter Berücksichtigung des Leserasters, ligiert. Das Insert RAP1-P1C (siehe auch Kapitel 3.6. und 3.7.) beinhaltet die Sequenz von RAP1 -ohne Stopcodon- mit dem C-terminalen Teil des P1 (P1C) am 3'-Ende. Das P1C liegt in der cDNA von PLRV in einem anderen Leseraster direkt am 3'-Ende von RAP1. Die Kassette des zu untersuchenden Konstrukts (PLRV-Sequenz-GUS) wurde dann nach erfolgreicher Sequenzierung *KpnI/PstI* in den Vektor pFF35SHP transferiert. Zum Vergleich wurde eine EMCV-IRES (Encephalomyocarditis virus-IRES: Jang *et al.*, 1988) mit herangezogen. Das EMCV entstammt einem animalen System und sollte deshalb in Pflanzenzellen nicht aktiv sein (Plasmide, siehe Material und Methoden). Kartoffelprotoplasten wurden mit diesen Plasmiden transfiziert und am nächsten Tag einem GUS-Test unterzogen. Die Effizienz der internen Initiation wurde anhand der GUS-Aktivität gemessen.

Konstrukt		% Effizienz
35S	 RAP1-P1C-GUS	100%
35S	 HP-GUS	0%
35S	 HP-EMCV-IRES-GUS	1 - 4 %
35S	 HP-RAP1-P1C-GUS	11 - 38 %

Abb. 21: Effizienz der internen Initiation anhand von verschiedenen Konstrukten deren GUS-Aktivität in Kartoffelprotoplasten gemessen wurde.

Die TBS3 verhindert in transfizierten Protoplasten die cap-abhängige Translation des GUS-Reporterkonstruktes (HP-GUS). Zum Vergleich wurde eine EMCV-IRES mit herangezogen. Bei diesem Konstrukt konnte bei allen Wiederholungen eine geringe GUS-Expression festgestellt werden. Wegen der relativ großen Schwankungen bei den einzelnen Messungen wurde der Versuch mehrmals wiederholt. Bei der Berechnung der einzelnen Effizienzen wurde das Konstrukt ohne TBS (RAP1-P1C-GUS) als 100 % Standard gesetzt. Im Vergleich zur EMCV-IRES (HP-EMCV-IRES-GUS) ist die GUS-Aktivität bei RAP1+C-Terminus ORF1 (HP-RAP1-P1C-GUS) deutlich erhöht.

In Abbildung 21 ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der einzelnen Messungen dargestellt. Trotz der großen Schwankungen bei den Messungen der einzelnen Wiederholungen eignet sich dieses System eine relative IRES-Aktivität *in vivo* festzustellen. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in den mit dem bicistronischen Konstrukt (GUS/RAP1-P1C) transformierten Pflanzen festgestellt werden (Kapitel 3.7.).

Um die PLRV-Sequenz zu identifizieren, die *in vivo* für die interne Initiation nötig ist, wurde am 3'-Ende von RAP1-P1C verschiedene Deletionen durchgeführt und diese unter Berücksichtigung des Leserasters vor das GUS-Reportergen ligiert (Abbildung 22). Diese Deletionsmutanten wurden dann auf ihre Eignung zur internen Initiation in Kartoffelprotoplasten getestet.

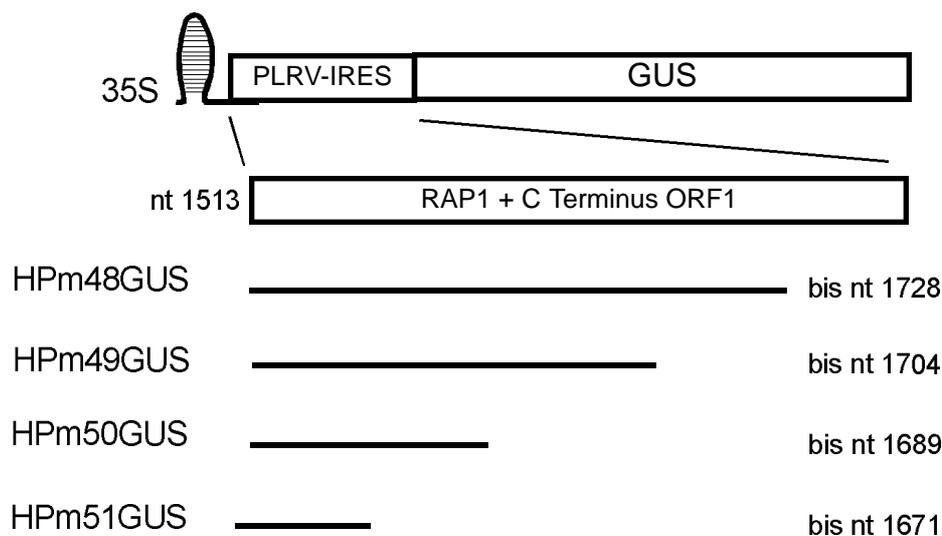


Abb. 22: Sequenzen der Deletionsmutanten.

In dem Konstrukt HP-RAP1-P1C-GUS wurden Deletionen am 3'-Ende der PLRV-Sequenz durchgeführt. PLRV-Sequenzen die in den einzelnen Konstrukten enthalten sind, wurden durch entsprechende Linien gekennzeichnet. Die Angaben der Nukleotide (nt) beziehen sich auf die Position der Sequenz im kanadischen PLRV-Isolat.

Die Ergebnisse dieser Versuche unterlagen aufgrund der unterschiedlichen Effizienzen bei der Transfektion, sowie unterschiedlicher Ergebnisse bei mehrmaligem Messen desselben Versuchsansatzes großen Schwankungen. Deshalb wurden die Versuche mehrmals und mit dreimaligen Messungen wiederholt. Bei der Berechnung der einzelnen GUS-Expressionseffizienzen wurde das jeweilige Konstrukt ohne TBS als 100% Standard gesetzt. Die einzelnen Effizienzen sind in Tabelle 3 dargestellt (siehe Anhang). Die Variationsbreite der einzelnen Messungen, die Standardabweichung (nach dem Multiplikationsverfahren), sowie der Mittelwert der Ergebnisse wurden laut Weber (1986) berechnet.

	Mittelwert mit Standardabweichung in %	Variationsbreite s in %
HPm48GUS	15,14 \pm 7,85 %	Messwert \pm 7 %
HPm49GUS	12,67 \pm 9,05 %	Messwert \pm 4,5 %
HPm50GUS	0	0
HPm51GUS	0	0

Tabelle 1: Expression der GUS-Aktivität in Kartoffelproplasten.

Der Genauigkeitsgrad der Messungen von HPm48GUS ist $s = 7\%$ und von HPm49GUS $s = 4,5\%$. Das heißt, es ist zu erwarten, dass für irgendeinen Messwert x der "wahre" Wert in etwa $2/3$ der Fälle im Bereich $x \pm s$ zu suchen ist. Trotz einer relativ großen Standardabweichung wird deutlich, dass die interne GUS-Expression bei den Deletionsmutanten abnimmt. Deletionen die den Bereich stromaufwärts von nt 1704 betrafen führten in keinem Versuch zu einer nachweisbaren internen GUS-Expression.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, konnten die ersten 36 Nukleotide von RAP1, die *in vitro* interne Initiation ermöglichten (mut26), *in vivo* zu keiner nachweisbaren Initiation führen. *In vivo* werden weitere Sequenzmotive stromabwärts des GGAGAGAGAGG-Motivs benötigt. Die Deletionen HPm50GUS und HP51GUS im Bereich vom C-Terminus von ORF1 führten zu keiner nachweisbaren internen Initiation. In diesem Bereich befindet sich eine RNA-Struktur von 52 Nukleotiden, die den ribosomalen Leserasterwechsel von ORF1/2 beeinflusst. Insgesamt lässt sich sagen, dass diese RNA-Struktur stromabwärts des Leserasters für RAP1 *in vivo* einen entscheidenden Einfluss auf die interne Initiation von RAP1 hat.

4. Diskussion

4.1. Expressionsanalyse des kleinen offenen Leseraster von RAP1

Die 5'-Hälfte des PLRV-Genoms enthält drei große offene Leseraster ORF0, ORF1 und ORF2, wobei ORF1 und ORF2 über einen Bereich von 582 Nukleotiden überlappen. In einem dritten Leseraster befinden sich drei kleine offene Leseraster. Es konnte durch *in vitro*- und *in vivo*-Experimente gezeigt werden, dass das kurz vor der Überlappungszone gelegene Gen für ein 5 kDa-Minimalprotein durch interne Initiation der Ribosomen exprimiert wird. Dieses 2min, bzw. RAP1, befindet sich etwa 1500 Nukleotide stromabwärts vom 5'-Ende der genomischen PLRV-RNA. Eine subgenomische RNA, die für die Translation dienen könnte, wurde nicht in PLRV-infizierten Pflanzen gefunden (Tacke *et al.*, 1990; Ashoub *et al.*, 1998). *In vitro*-Transkriptions- und Translationsexperimente sowie *in vivo*-Experimente konnten zeigen, dass RAP1 vom 2. AUG des ORFs translatiert wird und dass die invertierte Sequenzwiederholung GGAGAGAGAGG, sowie weitere PLRV-Sequenzmotive stromabwärts für die optimale Translationseffizienz *in vivo* notwendig sind.

Die identifizierte PLRV-IRES (interne Ribosomeneintrittsstelle) liegt innerhalb einer Region der PLRV-RNA, die durch unübliche Translationsmechanismen gekennzeichnet ist, wie z.B. einen -1 Leserasterwechsel für den u.a. eine RNA-Struktur von 52 Nukleotiden verantwortlich ist (Prüfer *et al.*, 1992; Kujawa *et al.*, 1993). Auf welche Art und Weise diese Struktur den ribosomalen Leserasterwechsel beeinflussen kann, ist letzten Endes unklar. In diesem Zusammenhang spekulierten Jacks *et al.* (1988b), dass Ribosomen an solchen stabilen RNA-Sekundärstrukturen verlangsamt werden, bzw. anhalten und somit den Leserasterwechsel erlauben. Diese Struktur, die sich etwa 100 Basen stromabwärts der invertierten Sequenzwiederholung GGAGAGAGAGG befindet, scheint *in vivo* einen entscheidenden Einfluss auf die interne Initiation der Translation von RAP1 zu haben (siehe Abbildung 23).

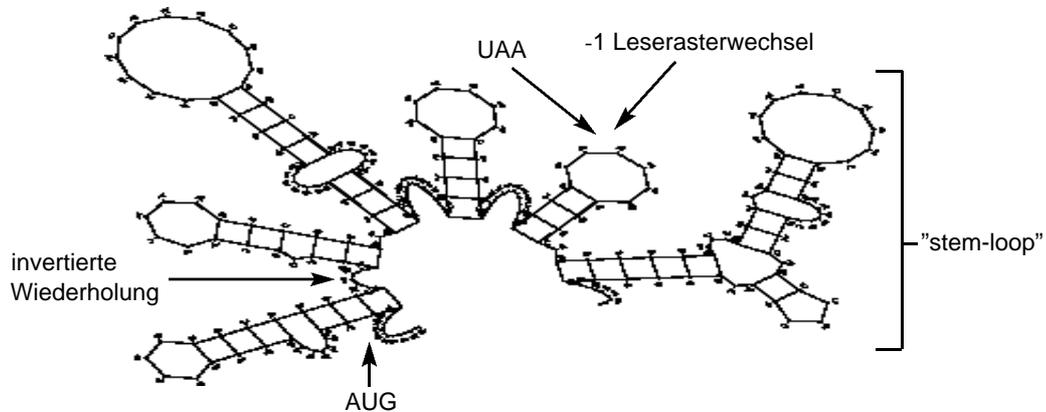


Abb. 23: Hypothetische RNA-Struktur der Region um den codierenden Bereich von RAP1 (nt1522-1740; Squiggle plot mit SeqLab erstellt, Wiskonsin package)

Die Pfeile verweisen auf das Start- und Stoppcodon für RAP1, die invertierte Wiederholung, den -1 Leserasterwechsel, sowie auf die RNA-Sekundärstruktur ("stem-loop").

4.2. Identifikation des RAP1 Proteins

Für die Analyse der Translation des Minimalproteins 2min, wurde auf die vorhandenen replizierenden cDNA-Klone voller Länge zurückgegriffen. Hierbei wurden neben der Wildtyp-Sequenz geeignete Mutanten konstruiert und ihre Expression in Kartoffelprotoplasten untersucht. Die Western- und Northernanalyse dieser transfizierten Kartoffelprotoplasten konnten zeigen, dass das Protein für die virale Replikation essentiell ist. Deshalb wurde das Protein mit RAP1 (RAP1 = Replikation assoziiertes Protein 1) bezeichnet.

Die RAP1-Defizit Mutanten konnten im Gegensatz zu den replizierenden cDNA Klonen voller Länge keine genomische- oder subgenomische Virus-RNA herstellen. Eine Protoplastentransfektion ist zum Teil sehr ineffizient, von einem mRNA-Molekül werden mehrere Proteine translatiert und diese Proteine sind stabiler als RNA. Auch ist die Virus RNA in den replizierenden Wildtypen durch Viruspartikel (Hüllproteine) geschützt. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die beim Wildtyp nachgewiesene genomische RNA durch virale Replikation entstanden ist. Das Vorhandensein des 70 kDa Proteins von ORF1 lässt darauf schließen, dass alle Transfektionen erfolgreich waren.

4.3. Mögliche Eigenschaften von RAP1

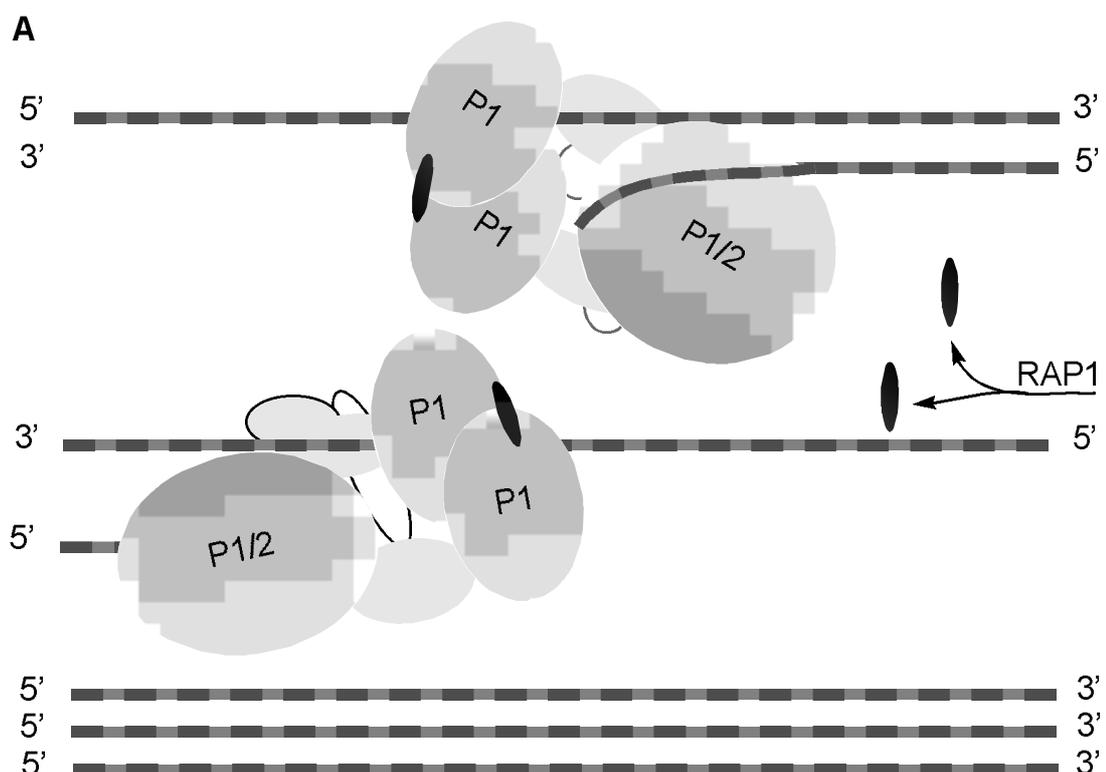
Für die Vermehrung und letztendlich Ausbreitung des PLRV ist die Replikation des Genoms eine essentielle Voraussetzung, wobei die 5883 bp große (+)-RNA (Mayo *et al.*, 1989) zunächst in einen (-)-Strang umgeschrieben wird. Dieser (-)-Strang wird dann als Matrize für die Synthese weiterer (+)-Stränge genutzt, um die virale genomische RNA zu vermehren. Hinweise auf diese replikative (-)-RNA Zwischenstufe lieferten Arbeiten mit verschiedenen (+)-ssRNA-Viren (brome mosaic virus (BMV), Miller *et al.*, 1985; alfalfa mosaic virus (AMV), Van der Kuyl *et al.*, 1990; turnip cinkle virus (TCV), Wang und Simon, 1997). Diese virale Replikation wird von spezifischen RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (Replikasen) katalysiert.

Für PLRV konnte der Aufbau des Replikationskomplexes bisher nicht aufgeklärt werden. Er setzt sich vermutlich aus mehreren Proteinuntereinheiten zusammen, wobei von den acht großen Leserastern des PLRV-Genoms die Genprodukte der zwei großen Leseraster ORF1 und ORF2 die Hauptkomponenten darstellen. Das kleine Leseraster von RAP1 liegt ebenfalls in diesem Bereich. Es wurde schon 1992 von Prüfer *et al.* diskutiert, dass die - innerhalb der für ORF1 codierenden Sequenz - drei Minimalproteine möglicherweise einen integralen Bestandteil des Replikationskomplexes darstellen. Bei Bindungsexperimenten mit bakteriell exprimierten P1-Proteinen, konnte eine starke Interaktion zwischen RAP1 und dem P1 festgestellt werden (Kierdorf, 1999).

Zwar wird durch die Annahme, dass diese Minimalproteine an der Replikation beteiligt sind, die Komplexität des Replikationsapparates erhöht, jedoch scheinen für einen funktionsfähigen Replikasekomplex auch wirtseigene Faktoren beteiligt zu sein. Bei BMV, zum Beispiel, sind neben den viralen Replikase-Proteinen mindestens sechs weitere Wirtsproteine am Aufbau des Replikationskomplexes beteiligt (Quadt und Jaspars, 1990).

Ein weiterer Aspekt, der in diesem Zusammenhang Berücksichtigung finden muss, besteht in der Beteiligung von multimeren Proteinkomplexen. Beispielsweise wurde für das Poliovirus angenommen, dass eine Oligomerisierung seiner 3D Polymerase für eine Funktionsfähigkeit stattfinden muss (Hope *et al.*, 1997; Pata *et al.*, 1995). Für das BMV konnte eine Dimerisierung des 1a-Proteins (Helikase-Motiv) mit Hilfe des "Two-Hybrid"-Systems bestätigt werden (O'Reilly *et al.*, 1998). Diese Dimerisierung ist laut O'Reilly die Voraussetzung für eine weitere Protein/Protein-Interaktion mit dem 2a-Protein (RNA-abhängige RNA-Polymerase), die ebenfalls mit dem "Two-Hybrid"-System nachgewiesen wurde. Somit ist anzunehmen, dass es sich auch bei der PLRV-Replikase um einen Multiproteinkomplex handelt.

Eine mögliche Darstellung des Replikationsapparates von PLRV basiert auf der Dimerisierung des P1. Daran könnten sich Minimalproteine und das RAP1 an je eine Einheit des P1-Proteins anlagern. Sowohl P1 als auch das P1/2 Fusionsprotein verfügen über unterschiedliche Nukleinsäure-bindende Domänen, die es ihnen ermöglichen könnte, mit der zu replizierenden RNA an verschiedenen Stellen zu interagieren (siehe Abbildung 24). In früheren *in vitro*-Experimenten konnten für das RAP1 trotz seiner hohen Basizität (Isoelektrischer Punkt = pH 12,98) keine Nukleinsäure-bindende Aktivität nachgewiesen werden (Prüfer, unveröffentlicht).



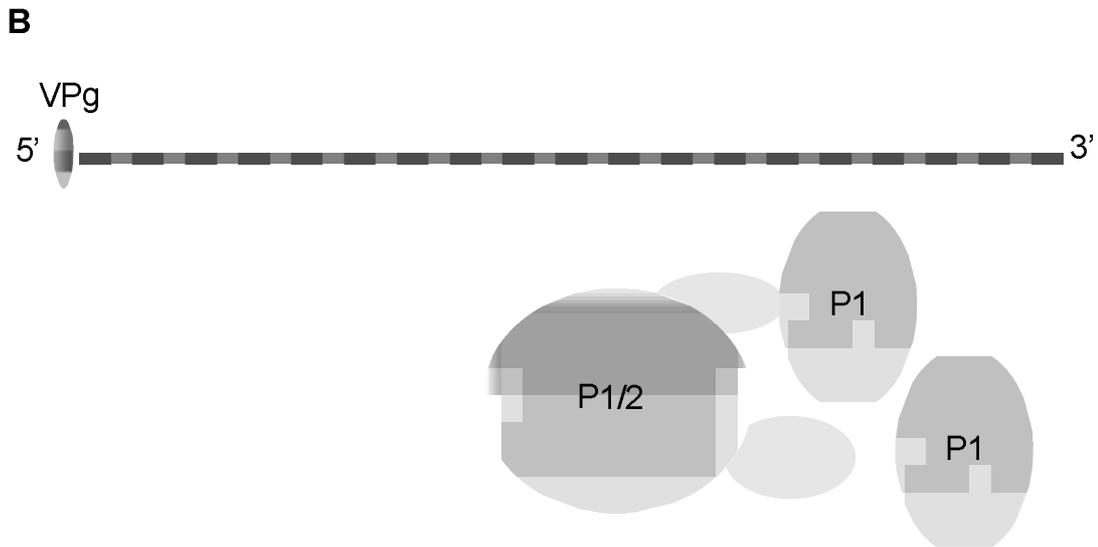


Abb. 24: Model eines möglichen Replikationskomplexes mit und ohne RAP1

A: Replikasekomplex mit RAP1. Die replikative (-) - RNA Zwischenstufe wird mit RAP1 eingeleitet. Dieser (-) - RNA-Strang wird dann als Matrize für die Synthese weiterer (+) - Stränge genutzt.

B: Replikasekomplex ohne RAP1. Die replikative (-) - RNA Zwischenstufe kann nicht eingeleitet werden.

Das vorgestellte Modell wird durch die Beobachtung von Prüfer *et al.* (1999) erweitert, dass ein 25 kDa großes Spaltprodukt des P1 an die PLRV-RNA binden kann. Dieses 25 kDa-P1-Produkt (P1-C25) wird zusammen mit dem VPg durch eine protolytische Spaltung freigesetzt. Durch eine mögliche Bindung an die PLRV-RNA, könnte dieses zusammen mit RAP1 den Startpunkt einer Replikation bzw. Transkription darstellen. Da das P1-C25 den carboxyterminalen Bereich des ORF1 umfasst, besteht die Möglichkeit, dass sich an diesen Komplex (P1-C25, RAP1) weitere Minimalproteine und das dimerisierte P1 anlagern.

Die spezifische Funktion des in dieser Arbeit untersuchten basischen 5kDa RAP1 für die virale Multiplikation ist unklar. In Bezug auf seine Größe und seine Lokalisierung innerhalb der Replikasegene, könnte RAP1 ein integraler Teil des PLRV Replikase Komplexes sein, das die Funktion der Replikation reguliert.

Zum Beispiel benutzen einige Bakterien und ihre Viren Strategien, die auf austauschbaren Untereinheiten der RNA-Polymerase beruhen. Die bakterielle RNA-Polymerase benötigt eine Sigma-Untereinheit um einen Promotor zu finden. Einige Bakterien stellen verschiedene Sigma-Untereinheiten her, von denen jede mit der RNA-Polymerase in Wechselwirkung treten und sie zu unterschiedlichen spezifischen Promotoren leiten kann. Dieses System erlaubt durch den Austausch einer Sigma-Untereinheit gegen eine andere in einfacher Weise eine umfangreiche Reihe von Genen auszuschalten und andere einzuschalten (Übersichtsartikel: Helmann und Chamberlin, 1988).

Zusätzlich zur Multiplikation der genomischen RNA, muss die PLRV Replikase auch für die Transkription für mindestens zwei subgenomische RNAs dienen (Mayo *et al.*, 1989; Tacke *et al.*, 1991; Ashoub *et al.*, 1998). Der Wechsel von der Replikation der genomischen RNA zu Aktivierung des subgenomischen Promotors könnte durch Faktoren wie RAP1 reguliert werden.

4.4. Expression von RAP1 durch interne Initiation der Ribosomen

4.4.1 Die Analyse verantwortlicher Signale *in vitro*

Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese des 5 kDa-RAP1 *in vitro* am zweiten AUG-Startcodon (nt 1529) beginnt. Der konkrete Mechanismus, der der internen Initiation an diesem Startcodon zugrunde liegt, muss noch geklärt werden. Die Daten liefern allerdings erste Hinweise auf den möglichen Mechanismus.

Durch das Einfügen einer stabilen Translationsblockierungssequenz konnte ein Mechanismus der Termination/Reinitiation ausgeschlossen werden, da hier nur das zweite Cistron translatiert wurde. Termination/Reinitiation konnte auch durch die Einfügung eines UAA-Stopcodons am 5'-Ende der bicistronischen RNA (mut6) ausgeschlossen werden, da die Rate der Termination/Reinitiation mit wachsendem Abstand zwischen Stopcodon und stromabwärts lokalisiertem Startcodon abnimmt (Gallie, 1993). Transkriptions- und Translationsanalysen dieser Konstrukte zeigten weder in Retikulozytenlysat noch in Weizenkeimextrakt einen Einfluss auf die Synthese des zweiten Cistrons.

Das kleine Leseraster von RAP1 liegt im Virus ca. 1500 Basen stromabwärts des 5'-Endes der genomischen RNA und enthält vor dem eigentlichen Startcodon 21 interne AUG-Codons, welche alle passiert werden müssten, bevor Initiation durch "Leaky Scanning" am RAP1-Startcodon stattfinden kann. All dies, und die Tatsache, dass die Synthese von RAP1 nicht cap-abhängig ist, spricht gegen einen "Leaky Scanning" oder "Ribosome shunting" Mechanismus (siehe Abbildung 2, Einleitung) und für das Vorhandensein einer internen Ribosomeneintrittsstelle (Ergebnisse Kapitel 3.2).

4.4.1.1. Identifizierung des RAP1 Startcodons

Zur Identifizierung des AUG-Initiationscodons konnte gezeigt werden, dass durch Insertionen stromabwärts nach dem zweiten möglichen AUG keine interne Translationsinitiation mehr stattfindet. Eine Insertion nach einem AUG drei Nukleotide stromaufwärts, als auch die Änderung von einem AUG zu AUC stromabwärts, hatten keinen Effekt auf die Translationseffizienz. Auch eine Deletion von 21 Nukleotiden stromabwärts von diesem Startcodons (mut16) führen zu internen Initiation am zweiten Cistron. Ein 10 kDa Fusionsprotein, das durch den +A Leserasterwechsel bei mut10 oder mut11 durch interne Initiation hätte entstehen sollen, konnte nicht detektiert werden. Diese Transkriptions- und Translationsexperimente konnten zeigen, dass das Startcodon (nt 1529-1531) in Bezug zu bestimmten Signalen stromabwärts in einem bestimmten Leseraster stehen muss, damit es zur internen Initiation kommt.

Des weiteren scheinen die AUG-flankierenden Sequenzen einen Einfluss auf die Expression von RAP1 zu haben. Die Sequenz AACAAUGGC (Lütcke *et al.*, 1987) oder UAAACAAUGGCU (Joshi *et al.*, 1987) gelten als die optimalen Kontexte für Initiationscodons in Pflanzen.

Konsensus-Sequenz (Joshi)	UAA ACA <u>AUG</u> GCU
AUG ₁ von ORF-RAP1	GGG CUG <u>AUG</u> <u>AUU</u>
AUG ₂ von ORF-RAP1	AU G <u>AUU</u> <u>AUG</u> <u>ACU</u>
AUG ₃ von ORF-RAP1	AC U <u>CCG</u> <u>AUG</u> AGG
AUG ₄ von ORF-RAP1	CA <u>A</u> CA <u>A</u> <u>AUG</u> CGC

Abb.25: Vergleich der AUG-flankierenden Sequenzen mit der Konsensus-Sequenz nach Lütcke *et al.* (1987).

Der Vergleich zeigt, dass vom AUG₂ drei Basen einem Kontext zur Konsensus-Sequenz stehen. Kein Codon steht aber in einem optimalen Kontext zur Konsensus-Sequenz. All dies führte zu der Annahme, dass weitere Motive stromabwärts für eine interne Initiation am AUG₂ benötigt werden.

4.4.1.2. Untersuchungen zur invertierten Sequenz-Wiederholung

Deletions- und Insertionsmutanten im Bereich von RAP1 zeigten, dass der Bereich für mögliche IRES auf die invertierte Wiederholung GGAGAGAGAGG, 22 Nukleotide stromabwärts vom Startcodon *in vitro* eingegrenzt werden konnte. Das Startcodon musste im Bezug zur invertierten Wiederholung im richtigen Leseraster stehen. Bei den Insertionsmutanten (mut17-mut24) konnte gezeigt werden, dass der Abstand zwischen der invertierten Wiederholung und dem Startcodon eine Rolle spielte. So zeigte eine Insertion von sechs oder mehr Nukleotiden, dass hier das AUG stromabwärts vom eigentlichen Startcodon zur Synthese benutzt wurde. Ab einer Insertion von mehr als 12 Nukleotiden hat die interne Initiation deutlich nachgelassen. Im Gegensatz hierzu führte die Verdopplung der invertierten Wiederholung, die ja gleichzusetzen wäre mit einer Insertion von 12 Nukleotiden, zur gleichen Translationseffizienz wie beim "Wildtyp" mut5. Eine Deletion des gesamten Bereichs der PLRV-Sequenz stromabwärts der invertierten Wiederholung, zeigte nur geringe Auswirkungen auf die Translationseffizienz. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die ersten 30 Basen des RAP1 für interne Initiation der Translation *in vitro* ausreichend sind. Dies deckt sich mit neueren Untersuchungen wonach ein Einfluss der codierenden Region auf die interne Ribosomenbindung für das Hepatitis C Virus und andere Flavivirus RNAs nachgewiesen werden konnte (Rijnbrand *et al.*, 2001).

4.4.1.3. Untersuchungen zur PLRV IRES-Region

Bei weiteren Konstrukten wurde durch die Deletion eines einzigen Nukleotides der C-Terminus von ORF1 hinter das Leseraster von RAP1 fusioniert. Dieses Fusionsprotein konnte leicht mit monoklonalen Antikörpern gegen den Carboxyterminus nachgewiesen werden. In Transkriptions- /Translations-experimenten in Weizenkeimextrakt wurde dieses Fusionsprotein durch Western Blot-Analyse nachgewiesen. Anhand dieses Systems konnten verschiedene IRES-Elemente, auf ihre Translationseffizienz im zweiten Cistron, getestet werden.

Bei dem monocistronischen Konstrukt (RAP1-P1C) als auch bei dem bicistronischen Konstrukt G/RAP1-P1C konnten jeweils zwei Fusionsproteine detektiert werden. Möglicherweise wurden hier zwei verschiedene AUG-Codons als Startcodon benutzt. Bei den Deletionsmutanten wurde ein Fusionsprotein (mut27P1C, mut28P1C und mut29P1C) in der Größe von 16 kDa als internes Translationsprodukt vom zweiten Cistron detektiert. Eine ähnliche Sequenzwiederholung von CABYV (nt 3094-3105) zeigte in Fusion zum C-Terminus von ORF1 ebenfalls interne Translationsinitiation (siehe Abbildung 17, Ergebnisse).

Zur Zeit wird eine mögliche Komplementarität der 18S rRNA zu IRES-Strukturen diskutiert (Geoffrey *et al.*, 2000; Chappell *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 1999). So konnte von Hu *et al.* (1999) gezeigt werden, dass die Komplementarität zwischen dem 5' UTR der Gtx Homeodomain Protein mRNA und 18S rRNA die Translation beeinflusst. Jedoch wird hierbei von einer Basenpaarung der 18S rRNA mit dem möglichen IRES-Signal ausgegangen. Bei der Sequenz von RAP1 von PLRV liegt keine Basenpaarung mit der 18S rRNA vor, sondern eine eventuelle Homologie (siehe Abbildung 26).

RAP1 nt1537-1666	AUG AGG AUU ACG GUC UGG AGA GAG AGG CUG
18S rRNA nt370-399	AUU AGG GUU CGA UUC CGG AGA GGG AGC CUG

Abb. 26: Vergleich der 18S rRNA mit dem ORF von RAP1

Von den ersten 30 Nukleotiden in der Sequenz von RAP1 sind 21 Nukleotide auch in der Sequenz von 18S rRNA (nt370-399) enthalten.

Es ist bekannt, dass eIF-4B zwei RNA-bindende Regionen hat. Eine davon ist spezifisch zu der 18S rRNA (Methot *et al.*, 1996a). Die Wanderung der 40S Untereinheit auf der mRNA erfolgt durch transiente Bindung der 18S rRNA mit der mRNA durch das eIF-4B Homodimer (Altmann *et al.*, 1995). Dieses eIF-4B ist Teil des Initiationskomplex (eIF-4A, 4B, 4F) der für eine optimale Bindung des 43S-Komplex an die mRNA benötigt wird (Übersichtsartikel: Merrick, 1992). Eine mögliche Darstellung der internen Initiation am AUG2 wäre demnach die Bindung dieses eIF-4B an der RNA von RAP1 (siehe Abbildung 27). Der eIF-4B bindet an eIF-4F und eIF-3 (Grifo *et al.*, 1983, Methot *et al.*, 1996b), wobei für eIF-4F bekannt ist eine cap-unabhängige Translation zu fördern (Gallie und Browning, 2001).

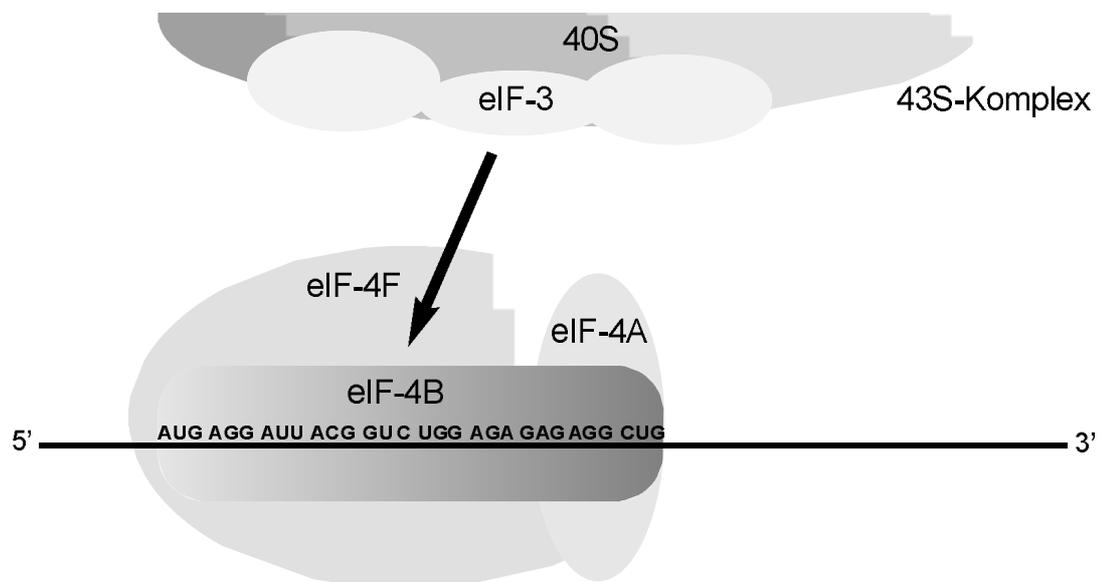


Abb. 27: Mögliche RNA-Protein Interaktion der Sequenz von RAP1 und eIF-4B

Der eIF-4B bindet an die Nukleotide von RAP1. Zwischen eIF-4B und -4F besteht eine starke Bindung (Grifo *et al.*, 1983). An den Initiationskomplex bindet der 43S-Komplex und die interne Translation wird eingeleitet.

Eine andere mögliche Hypothese kann auch sein, dass die IRES-Signale direkt mit der 40S Untereinheit binden. Die PLRV-IRES weist zu anderen IRES-Elementen -und auch die bis jetzt beschriebenen zueinander - keine größeren Ähnlichkeiten auf. Dies lässt vermuten, dass eine große Variation an Nukleotidsequenzen als IRES dienen kann und dass verschiedene Sequenzen die einzelnen Initiationsfaktoren und 40S mit verschiedenen Mechanismen rekrutieren können (Jackson 2000).

4.4.2. Die Analyse verantwortlicher Signale *in vivo*

Die *in vitro* Ergebnisse wurden anhand von geeigneten Konstrukten auch *in vivo* untersucht. Anhand von transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen, sowie transienten Expressionen in Kartoffelprotoplasten konnte auch *in vivo* eine interne Initiation nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den *in vitro* - Ergebnissen scheinen jedoch *in vivo* weitere Sequenzmotive stromabwärts des GGAGAGAGAGG-Motivs benötigt zu werden. Die RNA-Struktur von 52 Nukleotiden, die auch den ribosomalen -1 Leserasterwechsel von ORF1/2 beeinflusst, scheint auch eine Rolle für die interne Initiation zu spielen. Nur die Sequenz von RAP1, die *in vitro* für interne Initiation ausreichend war (mut26), ermöglichte *in vivo* keine nachweisbare Initiation.

4.4.2.1. Expression der IRES-Sequenz in transgenen Pflanzen

Kartoffel- und Tabakpflanzen wurden transformiert, um das virale Fusionsprotein (RAP1-P1C) von einer bicistronischen mRNA als zweites Cistron in der Pflanze zu exprimieren. Alle Pflanzen die eine starke Expression des 1. Cistrons (gemessen als GUS-Aktivität) aufwiesen, exprimierten auch das vom 2. Cistron codierte Fusionsprotein durch interne Translationsinitiation. Die Expression durch interne Initiation war um einiges geringer, als die cap-abhängige Translation. So genügte von der Kontrollpflanze, die mit dem monocistronischen Konstrukt (RAP1-P1C) transformiert wurde 20 µg Gesamtproteine für eine Western Blot-Analyse. Aus Pflanzen die mit dem bicistronischen Konstrukt (G/RAP1-P1C) transformiert wurden, musste mindestens 100 µg gut aufgereinigte Gesamtproteine eingesetzt werden, um das Fusionsprotein zu detektieren. Das Translationsprodukt der mit dem bicistronischen Konstrukt transformierten Pflanzen war dabei etwas kleiner als das der Kontrollpflanzen, die nur das RAP1-P1C exprimierten.

Da bei der monocistronischen mRNA das erste mögliche AUG als Startcodon genutzt wurde, bei der bicistronischen mRNA aber intern am RAP1 Startcodon initiiert wurde, war dieses Ergebnis zu erwarten. Es wurden vermutlich verschiedene AUGs als Initiationscodons in den mono- und bicistronischen Konstrukten genutzt.

Um sicherzustellen, dass das detektierte RAP1-PIC kein Produkt eines eventuell degradierten oder unvollständigen mRNA-Moleküls war, wurde die RNA anhand eines Northern Blots analysiert. Die etwa 2500 nt große, bicistronische mRNA konnte mit einer RAP1 spezifischen Sonde durch Northern Blot nachgewiesen werden. Wegen der, wie in Kapitel 4.4.3.1. besprochenen, Homologien zwischen der Sequenz von RAP1 und der 18S rRNA konnten Kreuzhybridisierungen mit der 18S rRNA festgestellt werden. Eine erneute Hybridisierung des selben Blots mit einer spezifischen Sonde gegen die 18S rRNA bestätigte dies. So konnte 18S rRNA in der Größe von etwa 750 Basen, als auch etwas größer als 2600 Basen detektiert werden. Die eingesetzten Mengenverhältnisse der Gesamt RNA kommt hierbei deutlich zum Ausdruck.

Diese Ergebnisse bestätigten auch *in vivo* die bereits besprochenen Folgerungen.

4.4.2.2. Transiente Expressionsanalyse zur PLRV-IRES Region

Durch eine Translationsblockierungssequenz (TBS) wurde die 5' cap-abhängige Translation in einem monocistronischen Konstrukt unterdrückt. Die zu untersuchende PLRV-IRES Region konnte als translationale Fusion zum GUS-Reportergen in transfizierten Kartoffelprotoplasten untersucht werden. Die *in vivo*-Studien der transienten Expression des GUS-Gens in Kartoffelprotoplasten unterlagen vielen experimentellen Schwierigkeiten, so dass die erhaltenen Ergebnisse nicht alle im Ergebnisteil der Arbeit aufgenommen wurden. Wie in Abbildung 22 und Tabelle 1 ersichtlich, waren außer der invertierten Wiederholung auch die 52 Nukleotide im C-Terminus von ORF1 für eine interne Translationsinitiation unentbehrlich. Bei diesen 52 Nukleotiden handelt es sich um einen "stem-loop" (Prüfer *et al.*, 1992) oder "pseudoknot" (Kim *et al.*, 2000) (siehe Abbildungen 28A und 28B), der auch für den -1 Leserasterwechsel von ORF1/2 verantwortlich ist. Es wird spekuliert, dass Ribosomen an solchen stabilen RNA-Strukturen verlangsamt werden, bzw. anhalten (Jacks *et al.* 1988b).

Diese RNA-Struktur war *in vitro*, außer bei mut26, und *in vivo* bei allen Konstrukten vorhanden, wenn es zur internen Initiation kam. Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass sich auch bei dem *in vitro* Konstrukt mut26 eine eventuell ähnliche RNA-Sekundärstruktur (nt877-950 vom GUS), ebenfalls etwa 100 Nukleotide stromabwärts von der invertierten Wiederholung, befindet.

A HPm48GUS

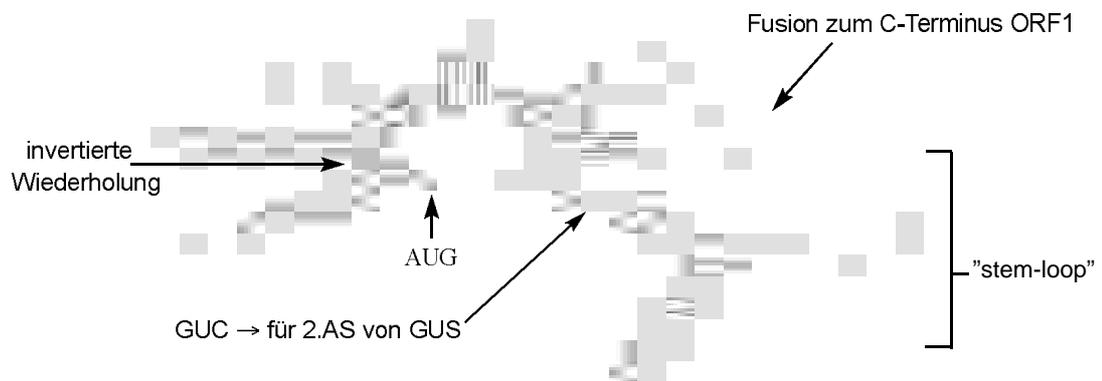


Abb. 28A: Hypothetische RNA-Struktur von HPm48GUS.

Diese Struktur führt in transfizierten Protoplasten zu einer internen Translationsinitiation von $15 \pm 8 \%$ in Bezug zu einer 5' cap-abhängigen Translation. Die Pfeile verweisen auf das Startcodon für RAP1, die invertierte Wiederholung, den Bereich der Fusion zum C-Terminus von ORF1, den "stem-loop" sowie auf das Codon für die zweite Aminosäure (AS) von GUS.

B HPm49GUS

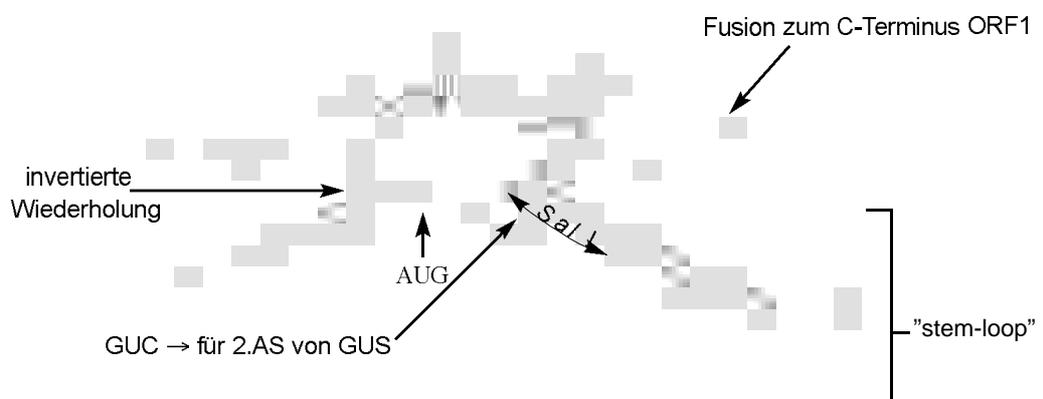


Abb. 28B: Hypothetische RNA-Struktur von HPm49GUS.

Diese Struktur führt in transfizierten Protoplasten zu einer internen Translationsinitiation von $13 \pm 9 \%$ in Bezug zu einer 5' cap-abhängigen Translation. Die Pfeile verweisen auf das Startcodon für RAP1, die invertierte Wiederholung, den Bereich der Fusion zum C-Terminus von ORF1, den "stem-loop", die *SalI* -Schnittstelle sowie auf das Codon für die zweite Aminosäure (AS) von GUS.

C
HPm50GUS

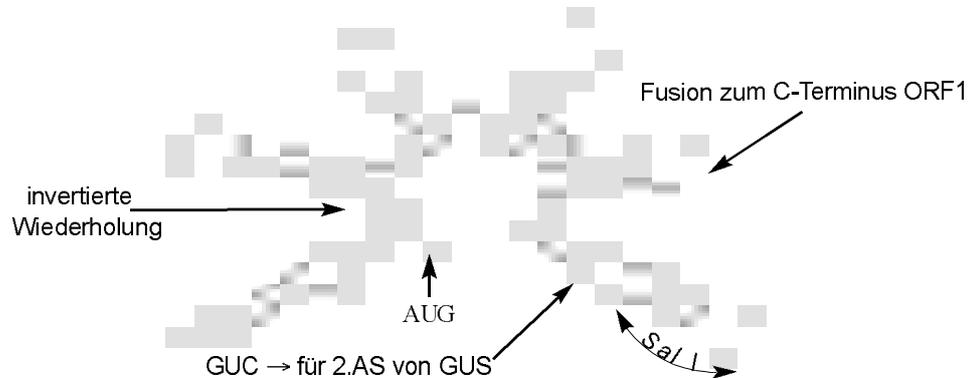


Abb. 24C: Hypothetische RNA-Struktur von HPm50GUS.

Diese Struktur führt in transfizierten Protoplasten zu keiner internen Translationsinitiation mehr. Der "stem-loop" fehlt vollständig. Die Pfeile verweisen auf das Startcodon für RAP1, die invertierte Wiederholung, den Bereich der Fusion zum C-Terminus von ORF1, die *Sal I*-Schnittstelle, sowie auf das Codon für die zweite Aminosäure (AS) von GUS.

Bei den bis jetzt beschriebenen IRES-Elementen spielen RNA-Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen im 5' UTR (5' nicht translatierte Region) eine große Rolle. Mutationen die diese Strukturen zerstörten, führten immer zu einem Verlust der internen Ribosomenbindung (Übersichtartikel Martinez-Salas, 2001). In neueren Untersuchungen wird ein Einfluss der codierenden Region auf die interne Ribosomenbindung bei einer Reihe von viralen Proteinen diskutiert (Reynolds *et al.*, 1995; Honda *et al.*, 1996; Lu und Wimmer, 1996; Rijnbrand *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den bis jetzt beschriebenen IRES-Elementen werden für die hier beschriebene PLRV-IRES keine Sequenzmotive im 5'-UTR benötigt, sondern Signale stromabwärts des Startcodons von RAP1 (dessen Translation sie reguliert). Die sekundäre, bzw. tertiäre RNA-Struktur befindet sich in diesem Fall interessanter Weise ca. 150 Nukleotide stromabwärts des Startcodons.

Die relativ großen Standardabweichungen, sowie Variationsbreiten lassen sich auf die Schwierigkeiten bei einer genauen GUS-Aktivitäts-Messung zurückführen. Da die Protoplasten mit DNA transfiziert wurden, hängt bei der anschließenden Messung viel von der DNA-Reinheit, der eingesetzten Menge und der Transfektionseffizienz ab. Zur genaueren Untersuchung, welche Nukleotide und welche RNA-Sekundär bzw. -Tertiärstrukturen zur internen Initiation führen, müssten die Protoplasten mit RNA transfiziert und mit noch mehr unterschiedlichen Konstrukten untersucht werden.

4.5. Ausblick

Genauere Aussagen zu der Funktion von RAP1 bei der viralen Replikation sind bisher nicht möglich. Ebenso ist der Aufbau des Replikationskomplexes, und alle dabei beteiligten Proteine, von PLRV nicht bekannt. Da es sich hierbei um einen Proteinkomplex handelt, der durch Wechselwirkungen von möglicherweise vielen verschiedenen Proteinen zusammengehalten wird, führten Untersuchungen mit dem "Two-Hybrid"-System bisher zu keinen Ergebnissen (Kierdorf, 1999). Die Methode der bakteriellen Überexpression von Fusionsproteinen und anschließende Interaktionsstudien, ein bakterielles Zweikomponenten-Expressionssystem zum Studium von RNA/Protein-Interaktionen (Nickel, 2000), sowie weitere Untersuchungen anhand von Mutanten voller Länge könnten den Aufbau des Replikationskomplexes genauer beschreiben.

Der konkrete Mechanismus, der der internen Initiation am Startcodon von RAP1 zugrunde liegt, muss noch geklärt werden. Hierfür eignen sich enzymatische "Footprints", bei denen aufgereinigte Initiationsfaktoren und 40S Untereinheiten auf ihre Bindungseignung zur IRES-Sequenz untersucht werden. Bei einer Bindung der 40S Untereinheit an die RNA wäre diese vor einem Verdau von RNaseT1 (Verdauung der RNA stromabwärts ungepaarter G-Nukleotide) oder RNaseV1 (Verdauung der doppelsträngigen RNA) geschützt. Weiter könnten "Primer extension inhibition" Analysen ("Toeprints") mit dem IRES/40S-Komplex durchgeführt werden. Die Fraktionierung der eukaryontischen Initiationsfaktoren und ribosomalen Untereinheiten (ribosomal salt wash -RSW-) und die anschließende Untersuchung einer Komplexbildung der RSW an der IRES-Sequenz mit Hilfe von Saccharose-Dichtegradienten wird bei Pestova *et al.*, 1996 beschrieben.

Zur genauen Untersuchung, welche Nukleotide und welche RNA-Sekundär, bzw. Tertiärstruktur zu internen Initiation *in vivo* führen, eignen sich transiente Expressionsanalysen in Kartoffelprotoplasten. Hierfür müssten eine Reihe weitere Mutanten auf ihre GUS-Expression untersucht werden. Zur Standardisierung dieser Analyse wäre eine Transfektion der Protoplasten mit RNA vorzuziehen. Unter diesen Voraussetzungen wäre eine genaue Bestimmung der PLRV-IRES möglich.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression und Funktion eines intern gelegenen offenen Leserasters *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dabei konnten folgende Ergebnisse gewonnen werden:

ORF 2min codiert für ein an der PLRV Replikation beteiligtes Protein (RAP1; Replikation assoziiertes Protein 1). Mittels infektiöser "volle Länge" PLRV cDNA Klone konnte gezeigt werden, dass die virale Replikation nach Mutagenese des 2min Leserasters (Einführung eines Stopcodons) spezifisch ausblieb. Für RAP1 wurde eine mögliche Regulatorfunktion in der viralen Replikation (Umschalten von Transkription nach Replikation oder *vice versa*) angenommen.

Für die Translation von RAP1 konnte eindeutig ein interner Ribosomeneintritt identifiziert werden. Verantwortlich hierfür ist eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES, Internal Ribosomal Entry Site), die auf Grund ihrer Lage (~1600 Basen vom genomischen 5' Ende) sowie der einfachen Struktur einzigartig ist. Neu ist zudem, dass diese IRES den gesamten codierenden Bereich von RAP1 beinhaltet.

Kernelemente der PLRV IRES sind das zweite AUG und die invertierte Sequenzwiederholung GGAGAGAGAGG, die in einem definierten Abstand voneinander angeordnet sein müssen. Mutationen, die entweder den Abstand zwischen dem zweiten AUG und der invertierten Sequenzwiederholung oder die invertierte Sequenzwiederholung direkt änderten, führten stets zum Ausbleiben der Translation von RAP1 *in vitro*. *In vivo* hingegen sind noch weitere, zur Zeit noch nicht identifizierte Signale notwendig.

Auf Grund einer signifikanten Homologie der PLRV IRES zur eukaryontischen 18S rRNA wurde eine mögliche Wechselwirkung zwischen Ribosomen bzw. eukaryontischen Initiationsfaktoren und IRES angenommen.

Mittels der identifizierten IRES konnte die Expression beider Proteine einer bicistronischen mRNA *in planta* erreicht werden. In transgenen Kartoffel- und Tabakpflanzen, die mit entsprechenden bicistronischen Konstrukten transformiert wurden, konnte neben dem ersten Cistron (GUS Reporterenzym) auch das zweite Cistron (P1 Carboxyterminus) eindeutig in Western-Blot Experimenten nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

- Altmann, M., Wittmer, B., Methot, N., Sonenberg, N. und Trachsel, H. (1995).** "The *Saccharomyces cerevisiae* translation initiation factor Tif3 and its mammalian homologue, eIF-4B, have RNA annealing activity." *Embo J* 14(15): 3820-3827.
- Ashoub, A., Rohde, W. und Prüfer, D. (1998).** "In planta transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome." *Nucleic Acids Res* 26(2): 420-426.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Stuhl, K. (1994).** "Current Protocols in Molecular Biology." Wiley, New York.
- Bahner, I., Lamb, J., Mayo, M. A. und Hay, R. T. (1990).** "Expression of the genome of potato leafroll virus: readthrough of the coat protein termination codon in vivo." *J Gen Virol* 71(Pt 10): 2251-2256.
- Basso, J., Dallaire, P., Charest, P. J., Devantier, Y. und Laliberte, J. F. (1994).** "Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of turnip mosaic potyvirus RNA." *J Gen Virol* 75(Pt 11): 3157-3165.
- Belsham, G. J. und Sonenberg, N. (1996).** "RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation." *Microbiol Rev* 60(3): 499-4511.
- Belsham, G. J. und Brangwyn, J. K. (1990).** "A region of the 5' noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control." *J Virol* 64(11): 5389-5395.
- Berlioz, C. und Darlix, J. L. (1995).** "An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polyprotein precursors." *J Virol* 69(4): 2214-2222.
- Berlioz, C., Torrent, C. und Darlix, J. L. (1995).** "An internal ribosomal entry signal in the rat VL30 region of the Harvey murine sarcoma virus leader and its use in dicistronic retroviral vectors." *J Virol* 69(10): 6400-6407.
- Bevan, M. (1984).** "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation." *Nucleic Acids Res* 12(22): 8711-8721.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979).** "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L. und Boyer, H. W. (1977).** "Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system." *Gene* 2(2): 95-113.

- Bradford**, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brault**, V. und Miller, W. A. (1992). "Translational frameshifting mediated by a viral sequence in plant cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(6): 2262-2266.
- Brown**, C. M., Dinesh-Kumar, S. P. und Miller, W. A. (1996). "Local and distant sequences are required for efficient readthrough of the barley yellow dwarf virus PAV coat protein gene stop codon." *J Virol* 70(9): 5884-5892.
- Casadaban**, M. J. und Cohen, S. N. (1980). "Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*." *J Mol Biol* 138(2): 179-207.
- Chappell**, S. A., Edelman, G. M. und Mauro, V. P. (2000). "A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4): 1536-1541.
- Citovsky**, V., Knorr, D., Schuster, G. und Zambryski, P. (1990). "The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein." *Cell* 60(4): 637-647.
- David**, M. und Larner, A. C. (1992). "Activation of transcription factors by interferon-alpha in a cell-free system." *Science* 257(5071): 813-815.
- Devereux**, J., Haeberli, P. und Smithies, O. (1984). "A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX." *Nucleic Acids Res* 12(1 Pt 1): 387-395.
- Dotto**, G. P., Enea, V. und Zinder, N. D. (1981). "Gene II of phage f1: its functions and its products." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(9): 5421-524.
- Dotto**, G. P. und Zinder, N. D. (1983). "The morphogenetic signal of bacteriophage f1." *Virology* 130(1): 252-256.
- Dotto**, G. P., Horiuchi, K. und Zinder, N. D. (1984). "The functional origin of bacteriophage f1 DNA replication. Its signals and domains." *J Mol Biol* 172(4): 507-521.
- Francki**, R. I. (1985). "Plant virus satellites." *Annu Rev Microbiol* 39: 151-174.
- Franco-Lara**, L. F., McGeachy, K. D., Commandeur, U., Martin, R. R., Mayo, M. A. und Barker, H. (1999). "Transformation of tobacco and potato with cDNA encoding the full-length genome of potato leafroll virus: evidence for a novel virus distribution and host effects on virus multiplication." *J Gen Virol* 80(Pt 11): 2813-2822.
- Fütterer**, J., Gordon, K., Sanfacon, H., Bonneville, J. M. und Hohn, T. (1990). "Positive and negative control of translation by the leader sequence of cauliflower mosaic virus pre-genomic 35S RNA." *Embo J* 9(6): 1697-1707.

- Fütterer, J. und Hohn, T. (1996).** "Translation in plants--rules and exceptions." *Plant Mol Biol* 32(1-2): 159-189.
- Gallie, D. R., Lucas, W. J. und Walbot, V. (1989).** "Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: factors influencing efficient mRNA uptake and translation." *Plant Cell* 1(3): 301-311.
- Gallie, D. R. und Walbot, V. (1992).** "Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation." *Nucleic Acids Res* 20(17): 4631-4638.
- Gallie, D. R. (1993).** "Posttranscriptional regulation of gene expression in plants." *Anna. Rev. Plant Physiol. Plan Mol. Biol.* 44, 77-105.
- Gallie, D. R. und Young, T. E. (1994).** "The regulation of gene expression in transformed maize aleurone and endosperm protoplasts. Analysis of promoter activity, intron enhancement, and mRNA untranslated regions on expression." *Plant Physiol* 106(3): 929-939.
- Gallie, D. R. und Browning, K. S. (2001).** "eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, Cap-independent translation, and translation of structured mRNAs." *J Biol Chem* 1: 1.
- Gan, W. und Rhoads, R. E. (1996).** "Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the mRNA for eIF4G, a factor involved in the picornavirus-induced switch from cap-dependent to internal initiation." *J Biol Chem* 271(2): 623-626.
- Garcia, A., van Duin, J. und Pleij, C. W. (1993).** "Differential response to frameshift signals in eukaryotic and prokaryotic translational systems." *Nucleic Acids Res* 21(3): 401-406.
- Grifo, J. A., Tahara, S. M., Morgan, M. A., Shatkin, A. J. und Merrick, W. C. (1983).** "New initiation factor activity required for globin mRNA translation." *J Biol Chem* 258(9): 5804-5810.
- Hames, B. D. und Rickwood, D. (1987).** "Gel electrophoresis of protein." IRL Press
- Hanahan, D. (1983).** "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J. Mol. Biol.* 199, 557-580.
- Helmann, J. D. und Chamberlin, M. J. (1988).** "Structure and function of bacterial sigma factors." *Annu Rev Biochem* 57: 839-872.
- Hoekema, A., Hirsch, P., Hooykaas, P., Schileroort, R. A. (1983).** "A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T- region of *A. tumefaciens*. *Nature* 303, 179-180.
- Hogenhout, S. A., van der Wilk, F., Verbeek, M., Goldbach, R. W. und van den Heuvel, J. F. (2000).** "Identifying the determinants in the equatorial domain of Buchnera GroEL

- Honda**, M., Brown, E. A. und Lemon, S. M. (1996). "Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA." *Rna* 2(10): 955-968.
- Hope**, D. A., Diamond, S. E. und Kirkegaard, K. (1997). "Genetic dissection of interaction between poliovirus 3D polymerase and viral protein 3AB." *J Virol* 71(12): 9490-9498.
- Hu**, M. C., Tranque, P., Edelman, G. M. und Mauro, V. P. (1999). "rRNA-complementarity in the 5' untranslated region of mRNAspecifying the Gtx homeodomain protein: evidence that base- pairing to 18S rRNA affects translational efficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4): 1339-1344.
- Ivanov**, P. A., Karpova, O. V., Skulachev, M. V., Tomashevskaya, O. L., Rodionova, N. P., Dorokhov Yu, L. und Atabekov, J. G. (1997). "A tobamovirus genome that contains an internal ribosome entry site functional in vitro." *Virology* 232(1): 32-43.
- Jacks**, T., Madhani, H. D., Masiarz, F. R. und Varmus, H. E. (1988a). "Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region." *Cell* 55(3): 447-458.
- Jacks**, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J. und Varmus, H. E. (1988b). "Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression." *Nature* 331(6153): 280-283.
- Jackson**, R. J., Howell, M. T. und Kaminski, A. (1990). "The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation." *Trends Biochem Sci* 15(12): 477-483.
- Jackson**, R. J. (1991). "mRNA translation. Initiation without an end." *Nature* 353(6339): 14-15.
- Jackson**, R. J. (2000). "In Translational control of Gene Expression". Ed. Sonenberg, N., Hershey, J. W. B. and Mathews, M. B. Cold Spring Harbor Lab. Press, pp.127-183.
- Jang**, S. K., Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C. und Wimmer, E. (1988). "A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation." *J Virol* 62(8): 2636-2643.
- Jang**, S. K. und Wimmer, E. (1990). "Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein." *Genes Dev* 4(9): 1560-1572.
- Jefferson**, R. A., Burgess, S. M. und Hirsh, D. (1986). "beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(22): 8447-8451.
- Jefferson**, R. A., Kavanagh, T. A. und Bevan, M. W. (1987). "GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants." *Embo J* 6(13): 3901-3907.
- Joshi**, C. P., Zhou, H., Huang, X. und Chiang, V. L. (1997). "Context sequences of translation initiation codon in plants." *Plant Mol Biol* 35(6): 993-1001.

- Kadare, G. und Haenni, A. L. (1997).** "Virus-encoded RNA helicases." *J Virol* 71(4): 2583-2590.
- Kaminski, A., Howell, M. T. und Jackson, R. J. (1990).** "Initiation of encephalomyocarditis virus RNA translation: the authentic initiation site is not selected by a scanning mechanism." *Embo J* 9(11): 3753-3759.
- Keese, P., Martin, R. R., Kawchuk, L. M., Waterhouse, P. M. und Gerlach, W. L. (1990).** "Nucleotide sequences of an Australian and a Canadian isolate of potato leafroll luteovirus and their relationships with two European isolates." *J Gen Virol* 71(Pt 3): 719-724.
- Kierdorf, M. (1999).** "Etablierung eines Yeast Two-Hybrid - Systems für das Studium Replikase-assoziiierter Pflanzenproteine im Pathosystem Blattrollvirus/Kartoffel." Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität zu Köln.
- Kim, Y. G., Maas, S., Wang, S. C. und Rich, A. (2000).** "Mutational study reveals that tertiary interactions are conserved in ribosomal frameshifting pseudoknots of two luteoviruses." *Rna* 6(8): 1157-1165.
- Koonin, E. V. (1991).** "The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses." *J Gen Virol* 72(Pt 9): 2197-2206.
- Kozak, M. (1987a).** "At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells." *J Mol Biol* 196(4): 947-950.
- Kozak, M. (1987b).** "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs." *Nucleic Acids Res* 15(20): 8125-8148.
- Kozak, M. (1987c).** "Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes." *Mol Cell Biol* 7(10): 3438-3445.
- Kozak, M. (1989).** "The scanning model for translation: an update." *J Cell Biol* 108(2): 229-241.
- Kozak, M. (1990).** "Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(21): 8301-8305.
- Kozak, M. (1995).** "Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(15): 7134.
- Kozak, M. (1999).** "Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes." *Gene* 234(2): 187-208.
- Kozak, M. (2000).** "Do the 5'untranslated domains of human cDNAs challenge the rules for initiation of translation (or is it vice versa)?" *Genomics* 70(3): 396-406.
- Kozak, M. (2001).** "New ways of initiating translation in eukaryotes?" *Mol Cell Biol* 21(6): 1899-907. dependent RNA polymerase of potato leafroll virus." *Nucleic Acids Res* 21(9): 2165-2171.

- Krieg**, P. A. und Melton, D. A. (1987). "In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase." *Methods Enzymol* 155: 397-415.
- Kühn**, R., Luz, N., Beck, E., (1990). "Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus." *J. Virol.* 64, 4625-4631.
- Kujawa**, A. B., Dugeon, G., Hulanicka, D. und Haenni, A. L. (1993). "Structural requirements for efficient translational frameshifting in the synthesis of the putative viral RNA-dependent RNA polymerase of potato leafroll virus." *Nucleic Acids Res* 21(9): 2165-2171.
- Laemmli**, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(259): 680-685.
- Le**, S. Y., Sonenberg, N. und Maizel, J. V. (1994). "Distinct structural elements and internal entry of ribosomes in mRNA3 encoded by infectious bronchitis virus." *Virology* 189, 405-411.
- Leiser**, R. M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Lemaire, O., Guilley, H., Richards, K. und Jonard, G. (1992). "Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(19): 9136-9140.
- Levis**, C. und Astier-Manifacier, S. (1993). "The 5' untranslated region of PVY RNA, even located in an internal position, enables initiation of translation." *Virus Genes* 7(4): 367-379.
- Liu**, D. X. und Inglis, S. C. (1992). "Internal entry of ribosomes on a tricistronic mRNA encoded by infectious bronchitis virus." *J Virol* 66(10): 6143-6154.
- Lu**, H. H. und Wimmer, E. (1996). "Poliovirus chimeras replicating under the translational control of genetic elements of hepatitis C virus reveal unusual properties of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(4): 1412-1417.
- Lutcke**, H. A., Chow, K. C., Mickel, F. S., Moss, K. A., Kern, H. F. und Scheele, G. A. (1987). "Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals." *Embo J* 6(1): 43-48.
- Macejak**, D. G. und Sarnow, P. (1991). "Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA." *Nature* 353(6339): 90-94.
- Maniatis**, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982). "Molecular cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Maliga**, P., Sz-Breznovits, A. und Marton, L. (1973). "Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco." *Nat New Biol* 244(131): 29-30.
- Martinez-Salas**, E. (1999). "Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors." *Curr Opin Biotechnol* 10(5): 458-464.

- Martinez-Salas, E., Ramos, R., Lafuente, E. und Lopez de Quinto, S. (2001).** "Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements." *J Gen Virol* 82(Pt 5): 973-984.
- Mayo, M. A., Barker, H., Robinson, D. J., Tamada, T., Harrison, B. D. (1982).** "Evidence that potato leafroll virus RNA is positive-stranded, is linked to a small protein and does not contain polyadenylate." *J. Gen. Virol.* 59, 163-167.
- Mayo, M. A., Robinson, D. J., Jolly, C. A. und Hyman, L. (1989).** "Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA." *J Gen Virol* 70(Pt 5): 1037-1051.
- Mayo, M. A. und Jolly, C. A. (1991).** "The 5'-terminal sequence of potato leafroll virus RNA: evidence of recombination between virus and host RNA." *J Gen Virol* 72(Pt 10): 2591-2595.
- Mayo, M. A. und Ziegler-Graff, V. (1996).** "Molecular biology of luteoviruses." *Adv Virus Res* 46: 413-460.
- Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M. R. (1984).** "Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter." *Nucleic Acids Res* 12(18): 7035-7056.
- Methot, N., Pickett, G., Keene, J. D. und Sonenberg, N. (1996a).** "In vitro RNA selection identifies RNA ligands that specifically bind to eukaryotic translation initiation factor 4B: the role of the RNA motif." *Rna* 2(1): 38-50.
- Methot, N., Song, M. S. und Sonenberg, N. (1996b).** "A region rich in aspartic acid, arginine, tyrosine, and glycine (DRYG) mediates eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B) self-association and interaction with eIF3." *Mol Cell Biol* 16(10): 5328-5334.
- Miller, J. S. und Mayo, M. A. (1991).** "The location of the 5' end of the potato leafroll luteovirus subgenomic coat protein mRNA." *J Gen Virol* 72(Pt 11): 2633-2638.
- Miller, W. A., Dreher, T. W. und Hall, T. C. (1985).** "Synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA in vitro by internal initiation on (-)-sense genomic RNA." *Nature* 313(5997): 68-70.
- Miller, W. A., Waterhouse, P. M., Kortt, A. A. und Gerlach, W. L. (1988).** "Sequence and identification of the barley yellow dwarf virus coat protein gene." *Virology* 165(1): 306-309.
- Molinari, P., Marusic, C., Lucioli, A., Tavazza, R. und Tavazza, M. (1998).** "Identification of artichoke mottled crinkle virus (AMCV) proteins required for virus replication: complementation of AMCV p33 and p92 replication-defective mutants." *J Gen Virol* 79(Pt 3): 639-647.
- Monecke, M. (1999).** "Immunologische Untersuchungen zur Expression von Nicht-Strukturproteinen des Kartoffel-Blattrollvirus (PLRV) mit spezifischen Antikörpern. RWTH Aachen, Dissertation.

- Nickel, H.** (2000). "Etablierung eines bakteriellen Zweikomponenten-Expressionssystem zum Studium von RNA/Protein-Interaktionen am Beispiel des Kartoffel-Blattrollvirus (PLRV). Universität zu Köln, Diplomarbeit.
- O'Reilly, E. K., Wang, Z., French, R. und Kao, C. C.** (1998). "Interactions between the structural domains of the RNA replication proteins of plant-infecting RNA viruses." *J Virol* 72(9): 7160-7169.
- Oh, S. K., Scott, M. P. und Sarnow, P.** (1992). "Homeotic gene Antennapedia mRNA contains 5'-noncoding sequences that confer translational initiation by internal ribosome binding." *Genes Dev* 6(9): 1643-1653.
- Owens, G. C., Chappell, S. A., Mauro, V. P. und Edelman, G. M.** (2001). "Identification of two short internal ribosome entry sites selected from libraries of random oligonucleotides." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 1471-1476.
- Pata, J. D., Schultz, S. C. und Kirkegaard, K.** (1995). "Functional oligomerization of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase." *Rna* 1(5): 466-477.
- Pelletier, J. und Sonenberg, N.** (1985). "Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency." *Cell* 40(3): 515-526.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N. und Hellen, C. U.** (1996). "Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes." *Mol Cell Biol* 16(12): 6870-6878.
- Pilipenko, E. V., Blinov, V. M., Romanova, L. I., Sinyakov, A. N., Maslova, S. V. und Agol, V. I.** (1989). "Conserved structural domains in the 5'-untranslated region of picornaviral genomes: an analysis of the segment controlling translation and neurovirulence." *Virology* 168(2): 201-209.
- Prüfer, D.** (1992). "Potato leafroll virus (PLRV) als Modellsystem für Translationsmechanismen in Pflanzen: Interne Initiation, ribosomaler Leserasterwechsel und UAG-Suppression steuern die Translation viraler Gene. Universität zu Köln, Dissertation.
- Prüfer, D., Tacke, E., Schmitz, J., Kull, B., Kaufmann, A. und Rohde, W.** (1992). "Ribosomal frameshifting in plants: a novel signal directs the -1 frameshift in the synthesis of the putative viral replicase of potato leafroll luteovirus." *Embo J* 11(3): 1111-1117.
- Prüfer, D., Wipf-Scheibel, C., Richards, K., Guilley, H., Lecoq, H. und Jonard, G.** (1995). "Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses." *Virology* 214(1): 150-158.
- Prüfer, D., Schmitz, J., Tacke, E., Kull, B. und Rohde, W.** (1997). "In vivo expression of a full-length cDNA copy of potato leafroll virus (PLRV) in protoplasts and transgenic plants." *Mol Gen Genet* 253(5): 609-614.

- Prüfer, D., Kawchuk, L., Monecke, M., Nowok, S., Fischer, R. und Rohde, W. (1999).** "Immunological analysis of potato leafroll luteovirus (PLRV) P1 expression identifies a 25 kDa RNA-binding protein derived via P1 processing." *Nucleic Acids Res* 27(2): 421-425.
- Quadt, R. und Jaspars, E. M. (1990).** "Purification and characterization of brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase." *Virology* 178(1): 189-194.
- Reutenauer, A., Ziegler-Graff, V., Lot, H., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K. und Jonard, G. (1993).** "Identification of beet western yellows luteovirus genes implicated in viral replication and particle morphogenesis." *Virology* 195(2): 692-699.
- Reynolds, J. E., Kaminski, A., Kettinen, H. J., Grace, K., Clarke, B. E., Carroll, A. R., Rowlands, D. J. und Jackson, R. J. (1995).** "Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation." *Embo J* 14(23): 6010-6020.
- Rijnbrand, R., Bredenbeek, P., van der Straaten, T., Whetter, L., Inchauspe, G., Lemon, S. und Spaan, W. (1995).** "Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation." *FEBS Lett* 365(2-3): 115-119.
- Rijnbrand, R., Bredenbeek, P. J., Haasnoot, P. C., Kieft, J. S., Spaan, W. J. und Lemon, S. M. (2001).** "The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs." *Rna* 7(4): 585-597.
- Rohde, W., Gramstat, A., Schmitz, J., Tacke, E. und Prüfer, D. (1994).** "Plant viruses as model systems for the study of non-canonical translation mechanisms in higher plants." *J Gen Virol* 75(Pt 9): 2141-2149.
- Sachs, A. B. (2000).** "Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail." *Cell* 101(3): 243-245.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989).** "Molecular Cloning - A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd edition.
- Schmitz, J., Prüfer, D., Rohde, W. und Tacke, E. (1996).** "Non-canonical translation mechanisms in plants: efficient in vitro and in planta initiation at AUU codons of the tobacco mosaic virus enhancer sequence." *Nucleic Acids Res* 24(2): 257-263.
- Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prüfer, D., Rohde, W. und Rohfritsch, O. (1997).** "In situ localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants." *Virology* 235(2): 311-322.
- Sizova, D. V., Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., Shatsky, I. N. und Hellen, C. U. (1998).** "Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs." *J Virol* 72(6): 4775-4782.
- Sokolova, M., Prüfer, D., Tacke, E. und Rohde, W. (1997).** "The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C." *FEBS Lett* 400(2): 201-205.

- Sonenberg, N.** und Pelletier, J. (1989). "Poliovirus translation: a paradigm for a novel initiation mechanism." *Bioessays* 11(5): 128-132.
- Tacke, E., Prüfer, D., Salamini, F. und Rohde, W.** (1990). "Characterization of a potato leafroll luteovirus subgenomic RNA: differential expression by internal translation initiation and UAG suppression." *J Gen Virol* 71(Pt 10): 2265-2272.
- Tacke, E., Prüfer, D., Schmitz, J. und Rohde, W.** (1991). "The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein." *J Gen Virol* 72(Pt 8): 2035-2038.
- Tacke, E., Sarkar, S., Salamini, F. und Rohde, W.** (1989). "Cloning of the gene for the capsid protein of potato leafroll virus." *Arch Virol* 105(3-4): 153-163.
- Tacke, E., Schmitz, J., Prüfer, D. und Rohde, W.** (1993). "Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions." *Virology* 197(1): 274-282.
- Thomas, A. A., ter Haar, E., Wellink, J. und Voorma, H. O.** (1991). "Cowpea mosaic virus middle component RNA contains a sequence that allows internal binding of ribosomes and that requires eukaryotic initiation factor 4F for optimal translation." *J Virol* 65(6): 2953-299.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J. und Steinbiss, H. H.** (1987). "A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions." *Nucleic Acids Res* 15(14): 5890.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. und Nomoto, A.** (1992). "Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA." *J Virol* 66(3): 1476-1483.
- Vagner, S., Gensac, M. C., Maret, A., Bayard, F., Amalric, F., Prats, H. und Prats, A. C.** (1995a). "Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes." *Mol Cell Biol* 15(1): 35-44.
- Vagner, S., Waysbort, A., Marena, M., Gensac, M. C., Amalric, F. und Prats, A. C.** (1995b). "Alternative translation initiation of the Moloney murine leukemia virus mRNA controlled by internal ribosome entry involving the p57/PTB splicing factor." *J Biol Chem* 270(35): 20376-20383.
- van der Kuyl, A. C., Langereis, K., Houwing, C. J., Jaspars, E. M. und Bol, J. F.** (1990). "cis-acting elements involved in replication of alfalfa mosaic virus RNAs in vitro." *Virology* 176(2): 346-354.
- van der Wilk, F., Huisman, M. J., Cornelissen, B. J., Huttinga, H. und Goldbach, R.** (1989). "Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic RNA." *FEBS Lett* 245(1-2): 51-6.

- van der Wilk, F., Houterman, P., Molthoff, J., Hans, F., Dekker, B., van den Heuvel, J., Huttinga, H. und Goldbach, R. (1997a).** "Expression of the potato leafroll virus ORF0 induces viral-disease-like symptoms in transgenic potato plants." *Mol Plant Microbe Interact* 10(2): 153-159.
- van der Wilk, F., Verbeek, M., Dullemans, A. M. und van den Heuvel, J. F. (1997b).** "The genome-linked protein of potato leafroll virus is located downstream of the putative protease domain of the ORF1 product." *Virology* 234(2): 300-3.
- Veidt, I., Lot, H., Leiser, M., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K. und Jonard, G. (1988).** "Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA." *Nucleic Acids Res* 16(21): 9917-9932.
- Vittorioso, P., Carattoli, A., Londei, P. und Macino, G. (1994).** "Internal translational initiation in the mRNA from the *Neurospora crassa* albino-3 gene." *J Biol Chem* 269(43): 26650-26654.
- Wang, C., Le, S. Y., Ali, N. und Siddiqui, A. (1995).** "An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region." *Rna* 1(5): 526-537.
- Wang, C., Sarnow, P. und Siddiqui, A. (1993).** "Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism." *J Virol* 67(6): 3338-3344.
- Wang, J. Y., Chay, C., Gildow, F. E. und Gray, S. M. (1995).** "Readthrough protein associated with virions of barley yellow dwarf luteovirus and its potential role in regulating the efficiency of aphid transmission." *Virology* 206(2): 954-962.
- Wang, S., Browning, K. S. und Miller, W. A. (1997).** "A viral sequence in the 3'-untranslated region mimics a 5' cap in facilitating translation of uncapped mRNA." *Embo J* 16(13): 4107-4116.
- Wang, S. und Miller, W. A. (1995).** "A sequence located 4.5 to 5 kilobases from the 5' end of the barley yellow dwarf virus (PAV) genome strongly stimulates translation of uncapped RNA." *J Biol Chem* 270: 13446-13452.
- Weber, E. (1986).** "Grundriss der Biologischen Statistik." Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

7. Anhang

7.1. Liste verwendeter Oligonukleotide

18SBW	CAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTCTCCTTCCTC- TAAATGATAAG
RAP1BW	AGAGATATCAAGGCTTGTGGTTGGAGCAGTTT
RAP1FW	AGACTCGAGGAAGTGGGCTGATGATTATGACTC
3`BW	ACTACACAACCCTGTAAGAGG
5`FW	ACAAAAGAATACCAGGAGAAA
mut6	CCCCACCCGTTAAGAAATCAAAAACTC
mut9	ACTGGGCTGATGAATTATGACTCCG
mut10	CTGATGATTATGAACTCCGATGAGG
mut11	ATGACTCCGATGAAGGATTACGGTC
mut12	CTGCAACAAATCCGCCCGCAGAG
mut13	TGAGGATTACGGTCTCCTCTGAGAGGCTGCAA
mut14	CGGTCTGGAGAGTCTCCCTGCAACAAATGCGC
mut15	TGAGGATTACGGTCTCCTCTCTCCTGCAACAAATGCGC
mut16	GGGCTGATGATTATGAGGAGAGAGAGGCTGCAA
mut17	ATGAGGATTACGGTCAAATGGAGAGAGAGGCTGCAA
mut18	ATGAGGATTACGGTCAAAAAATGGAGAGAGAGGCTGCAA
mut19	ATGAGGATTACGGTCAAAAAAATGGAGAGAGAGGCTGCAA
mut20	ATGAGGATTACGGTCAAAAAAATGGAGAGAGAGGCTG
mut21	ATGAGGATTACGGTCAAAAAAATGGAGAGAGAGGCTG
mut22	ATGAGGATTACGGTCAAAAAAATGGAGAGAGAGGCTG
mut23	ATGAGGATTACGGTCAAAAAAATGGAGAGAGAGGCTG
mut24	ATGAGGATTACGGTCAAAAAAATGGAGAGAGAGGCTG
mut25	ATGAGGATTACGGTCTGGAGAGAGAGGTTGGAGAGAGAGGCTGCAA
m43FW	CATTGGTACCACTGGGCTGATGATTATGACT
m44BW	CACTGTCGACTGCTCACTATCTTCTCCTCTATCTC
m48BW	CACTGTCGACTAGCGACGTCGGGATGTCGGA
m49BW	CACTGTCGACTGCCGTTTGTGGCGGA
m50BW	CACTGTCGACTGGACGGCGCCGCTTGCCCAT
m51BW	CACTGTCGACTTTGCCCATTTAAAGGCTTG
TBS1	CATGGGATCCGGATCCGGATCCGGATCCGGATCCGGATCCGGATCCGGATCCG- GATCCGGATCC
TBS2FW	CGATCCATGGGCGTTAAGGGTACCG-GGCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGA- TAA
TBS2BW	TATCGCCATGGCCAGAAACAGGGCGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGG- CATGCAAGCTTATCGATA
T38BW	CGCGAATTCGCCTTCCGCGCTTCTTTTGTGGGCT
T38FW	CTTCTCGGATGAAGCTGTGAAAGAGCTAGA
Mut34	TGAGGATTACGGTCTCCTCTGAGAGGCTGCAA
Mut41	TCCTCTATCTCCTAGAGATTGATTCTCCCC
Gmut27BW	TTGCAGCCTCTCTCCACATCGGAGTCATAATG
Gmut28BW	CTGCCTTCTTCTCATTCTCATCGTACTCATAATG
Gmut29BW	CGAGGTCCTCTTCTCAACATCGGAGTCATAATG

7.2. Tabelle der GUS-Expressionseffizienzen

Konstrukt	Effizienz in % zum Standard				Mittelwert	Varianz	w*w	s*s	Variationsbreite
	Versuch	1. Messung	2. Messung	3. Messung					
HP-EMCV-IRES/GUS	1	3	5	3	3,67	2	4		
	2	2	4	1	2,33	3	9		
	3	0	1	0	0,33	1	1		
	4	3	1	0	1,33	3	9		
	5	4	2	2	2,67	2	4		
	6	2	0	4	2,00	4	16		
	7	3	2	3	2,67	1	1		
				2,14	16	44	3,14	1,77	
HP-m48GUS	1	15	18	16	16,33	3	9		
	2	12	32	29	24,33	20	400		
	2	8	9	7	8,00	2	4		
	4	15	18	10	14,33	8	64		
	5	20	27	24	23,67	7	49		
	6	5	15	16	12,00	11	121		
	7	8	4	10	7,33	6	36		
				15,14	57	683	48,79	6,98	
HP-m49GUS	1	14	16	12	14,00	4	16		
	2	5	6	7	6,00	2	4		
	3	4	7	3	4,67	4	16		
	4	14	12	16	14,00	4	16		
	5	31	39	24	31,33	15	225		
	6	11	12	13	12,00	2	4		
	7	5	7	8	6,67	3	9		
				12,67	34	290	20,71	4,55	

	Ergebnis	Häufigkeiten	Abweichungen	Quadrate	Produkte	Quadrate	Standartabweichung
HP-EMCV-IRES/GUS	0	4	-2,14	4,59	- 8,57	18,37	
	1	3	-1,14	1,31	- 3,43	3,92	
	2	5	-0,14	0,02	- 0,71	0,10	
	3	5	0,86	0,73	4,29	3,67	
	4	3	1,86	3,45	5,57	10,35	
	5	1	2,86	8,16	2,86	8,16	
	21			-	44,57		1,49
					-	2,23	
HP-m48GUS	4	1	-11,14	124,16	-11,14	124,16	
	5	1	-10,14	102,88	-10,14	102,88	
	7	1	-8,14	66,31	- 8,14	66,31	
	8	2	-7,14	51,02	-14,29	102,04	
	9	1	-6,14	37,73	- 6,14	37,73	
	10	2	-5,14	26,45	-10,29	52,90	
	12	1	-3,14	9,88	- 3,14	9,88	
	15	3	-0,14	0,02	- 0,43	0,06	
	16	2	0,86	0,73	1,71	1,47	
	18	2	2,86	8,16	5,71	16,33	
	20	1	4,86	23,59	4,86	23,59	
	24	1	8,86	78,45	8,86	78,45	
	27	1	11,86	140,59	11,86	140,59	
	29	1	13,86	192,02	13,86	192,02	
32	1	16,86	284,16	16,86	284,16		
	21			-	1.232,57		7,85
					-	61,63	
HP-m49GUS	3	1	-9,67	93,44	- 9,67	93,44	
	4	1	-8,67	75,11	- 8,67	75,11	
	5	2	-7,67	58,78	-15,33	117,56	
	6	1	-6,67	44,44	- 6,67	44,44	
	7	3	-5,67	32,11	-17,00	96,33	
	8	1	-4,67	21,78	- 4,67	21,78	
	11	1	-1,67	2,78	- 1,67	2,78	
	12	3	-0,67	0,44	- 2,00	1,33	
	13	1	0,33	0,11	0,33	0,11	
	14	2	1,33	1,78	2,67	3,56	
	16	2	3,33	11,11	6,67	22,22	
	24	1	11,33	128,44	11,33	128,44	
	31	1	18,33	336,11	18,33	336,11	
	39	1	26,33	693,44	26,33	693,44	
	21			- 0,00	1.636,67		9,05
				0,00	81,83		

7.3. Abkürzungen

5'-UTR	5'-nicht translatierte Region
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure (n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BMV	brome mosaic virus
bp	Basenpaar (e)
BMYV	beet western yellows virus
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
C-terminal	carboxyterminal
D	Dalton
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
eIF	eukaryontischer Initiationsfaktor
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
engl.	englisch
EtOH	Ethanol
G	Guanin
g	Gramm
gRNA	genomische RNA
GUS	β-Glukuronidase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
Li	Lithium
LB	Luria-Broth
	Phage Lambda

M	Molar
μ	micro
mA	Milli-Ampere
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl-Glukuronid
n	nano
NAA	Napthylelessigsäure
Nt	Nukleotide
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster (engl.: open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLRV	potato leafroll virus
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RdRP	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Elektrophorese
sgRNA	subgenomische RNA
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Uracil
u	Unit (funktionelle Enzymeinheit)
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Rohde und Prof. Dr. F. Salamini für die Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel zur Durchführung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Doktor Dirk Prüfer (g*) bedanken: Seine Arbeit stellte die Grundlage für alle meine Experimente dar. Er stand mir mit Rat, Tat und Ideen jederzeit zur Seite; sein Beistand hat auch nach dem Stellenwechsel und durch unzählige Aufgaben beim Fraunhofer Institut nie nachgelassen. Vor allem hat er mir - unter vielem anderem - einen, durch das Fraunhofer Institut finanzierten Forschungsaufenthalt in Kanada ermöglicht. Danke, dass die Prophezeiung von kmueller nie eingetreten ist!

Vielen Dank an Prof. Dr. Larry Kawchuk und dessen Arbeitsgruppe am Agriculture Research Centre in Lethbridge. Dort konnte ich drei Monate lang Tag und Nacht in meinen "full-length"- Experimenten, mit allen erdenklichen Hilfen, schwelgen. Vielen Dank an Larry und seine Familie, die mir die Schönheiten Albertas jenseits des "labs" zeigten und der jederzeit bereit war mit mir über das PLRV und merkwürdige Ergebnisse zu philosophieren.

Dr. Peter Ivanov von der Moscow State University danke ich für seine guten Ideen, seine Diskussionsbereitschaft, seine Plasmide und seine herzliche Freundschaft.

Vielen Dank auch an Dr. Judith Müller für ihre Freundschaft und ihre unendliche Geduld mit meinem Wortschwall und überhaupt.

Außerdem ein dickes Dankeschön an alle ehemaligen Mitglieder des ehemaligen "underlab" der Gruppe Rohde für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit; speziell an Sabine Brück und Alice Kaufmann für die "wunderherrlichen" Pflanzen. Danke Ahmed, Mervat, Rainer, Tamara, YaMei, Holger, Vladimir, Massimo, Pjotr, Dieter, Brigitte, Adriane, Ti Ha, Jürgen und besonders Mike: Ihr habt sowohl wissenschaftlich als auch privat eine wichtige Rolle während der letzten Jahre gespielt.

Am allermeisten möchte ich mich bei bei meinen Eltern bedanken, die mich, wie bisher bei jeder meiner Eskapaden, auch während dieser Arbeit bedingungslos unterstützt haben. Meinem "armen" Gatten Thomas danke ich, dass er (fast) nie die Nerven verloren hat; ebenso wie meine Freunden Sarah, Vivien, Jutta, Barbara, Bianka, Viola, Hanne, Lawrence, *et al.*

O Kriton wir sind dem Asklepios einen Hahn schuldig: entrichtet ihm den und versäumt es ja nicht! >Sokrates<

Abstract

Potato leafroll virus (PLRV) genomic RNA acts as a polycistronic mRNA for the production of the three large proteins P0, P1 and P2 encoded by the 5' proximal half of the PLRV genome. This Ph.D. thesis addresses a small open reading frame coding for an approximately 5kDa replication associated protein I (RAP1) for which an absolute requirement for efficient PLRV multiplication could be demonstrated *in vivo* by "reverse genetics".

A single base substitution within the RAP1 reading frame altering a UGG codon to a UAG stop codon resulted in the complete loss of PLRV replication in protoplasts. *In vitro*-translation experiments identified the AUG codon which - in conjunction with the inverted sequence motif GGAGAGAGAGG located 22 nucleotides downstream - served as a potential internal ribosome entry site (IRES) for efficient RAP1 translation. Changes in the spacing region between this AUG and the downstream motif as well as changing the GGAGAGAGAGG motif to its complementary sequence resulted in a dramatic reduction of RAP1 expression. Transient expression of appropriate reporter gene constructs confirmed the internal ribosome entry function of this motif in potato protoplasts.

In contrast to known IRES signals, the PLRV motif is the first example of a centred IRES on a naturally viral RNA, which makes alternative translation mechanisms, like leaky scanning to be involved in RAP1 expression most unlikely.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit -einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen-, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. F. Salamini betreut worden.

Köln, den 05.12.2001

Veröffentlichungen

Jaag, H.M., Kawchuk, L., Rohde, W., Fischer, R., Emans, N., Prüfer, D. (2001): An unusual internal ribosomal entry site with a sequence-specific motif of inverted symmetry directs the in vitro and in vivo expression of the replication associated protein 1 (RAP 1) of potato leafroll virus (PLRV). *Nucleic Acids Res* (eingereicht).

Jaag, H.M., Kawchuk, L., Rohde, W., Prüfer, D. (2001): An unusual Internal Ribosome Entry Site directs the Expression of the Replication-Associated Protein (RAP1) of Potato Leafroll Virus (PLRV), Poster, 6th International Symposium on Positive Strand RNA Viruses, P1-153.

Rohde, W., Jaag, H.M., Paap, B., Tacke, E., Schmitz, J., Kierdorf, M., Ashoub, A., Günther, S., van Bel, Prüfer, D. (2000): Genetic Engineering of Potato for Tolerance to Biotic and Abiotic Stress, *Plant Genetic Engineering: Towards the Third Millennium*, 177-181.

Jaag, H.M., Langsdorf, A., Snowdon, R.J., Köhler, W., Hartmann, H.D. (1998): Random amplified polymorphic DNA variation among German and Dutch asparagus cultivars, *Plant Breeding* 117, 290-292.

Hannah Miriam Jaag
Mauerwiese 3
55444 Dörrebach
E-mail: hannah_jaag@yahoo.com

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Hannah Miriam Jaag
Geburtsdatum: 15.12.1967
Geburtsort: Villingen, Schwarzwald-Baar-Kreis
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul- und Berufsausbildung:

1974-1978 Grundschule in Villingen
1978-1984 Gymnasium am Hoptbühl in Villingen bis zur Mittleren Reife
1984-1985 Berufskolleg I in Schwenningen
1985-1987 Ausbildung zur Industriekauffrau
1987-1990 Vorbereitung zum Abitur und diverse Jobs im Ausland
05.1990 Abiturprüfung für Schulfremde in Freiburg
1991-1997 Studium der Agrarwissenschaften an der Justus-Liebig-
 Universität Giessen
1995-1996 Diplomarbeit bei Prof. Dr. W. Köhler am Institut für
 Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung II, Giessen.
1997 Diplom Agraringenieurin
seit 1998 Promotionsstudiengang Biologie an der Universität Köln und
 Dissertation am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung

Köln, den 01.09.2001