

Protein vermittelte Tospoviren-Resistenzen:

Untersuchungen zur Nucleokapsidprotein vermittelten Resistenz
und
Etablierung eines Peptid vermittelten Resistenzmechanismus

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Christoph Rudolph

aus Schwalmstadt

Köln 2002

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Tospoviren.....	1
1.2	Virusresistenz bei Pflanzen.....	5
1.3	Virus gesteuerte Prozesse während der Infektion und pflanzliche Gegenmaßnahmen....	5
1.4	Molekularbiologisch hergestellte Virusresistenzen.....	6
1.5	Gentechnisch erzeugte Resistenz gegen TSWV.....	7
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	9
2	MATERIAL UND METHODEN.....	10
2.1	Material.....	10
2.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	10
2.1.2	Organismen.....	10
2.1.2.1	Viren.....	10
2.1.2.2	Bakterien.....	10
2.1.2.3	Hefen.....	11
2.1.2.4	Pflanzen.....	11
2.1.3	Vektoren.....	11
2.1.4	Oligonukleotide.....	12
2.1.4.1	Oligonukleotide zur Klonierung der Tospoviren N-Protein Sequenzen.....	12
2.1.4.2	Oligonukleotide zur Klonierung der mutierten β -Glucuronidase Sequenz.....	13
2.1.4.3	Oligonukleotide zur Klonierung der T-Pep und W-Pep Sequenz.....	14
2.1.4.4	Oligonukleotide zur Klonierung der M_1-, M_2- und der Art-Mutanten.....	15
2.1.4.5	Oligonukleotide für RT-PCR und Sequenzierungen.....	15
2.1.5	Verwendete Plasmide.....	16
2.1.5.1	Übernommene DNA Konstrukte.....	16
2.1.5.2	Klonierungen für das Hefe-Zwei-Hybrid-System:.....	16
2.1.5.3	Klonierung der T-Pep und W-Pep Sequenz.....	18
2.1.5.4	Mutation der β -Glucuronidase für N- und C-terminale Peptidfusionen.....	18
2.1.5.5	Klonierung von Gus-Peptidfusionen.....	19
2.1.5.6	Klonierung von Gus-Peptid Fusionen für das Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	19
2.1.5.7	Vektorklonierung für die Pflanzentransformation.....	20
2.1.6	Lösungen und Kulturmedien.....	20
2.1.6.1	Bakterienmedien.....	21
2.1.6.2	Hefemedien.....	21
2.1.6.3	Pflanzenmedien.....	22

2.2	Methoden.....	23
2.2.1	Nukleinsäuren.....	23
2.2.1.1	Sequenzanalysen.....	23
2.2.1.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	23
2.2.1.3	Erstellung einer Protein spezifischen Peptid Bibliothek durch DNase I Verdau	24
2.2.2	Protein.....	24
2.2.2.1	Quantifizierung von Proteinlösungen.....	24
2.2.2.2	Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue.....	24
2.2.2.3	PAA-Gelelektrophorese (denaturierend und nativ)	25
2.2.2.4	Immunodetektion von Proteinen auf Membranen.....	25
2.2.2.5	β -Glucuronidase Aktivitätstest im nativen PAA-Gel.....	25
2.2.2.6	β -Glucuronidase-Aktivitätstest im Microtiterplattenmaßstab	26
2.2.2.7	Serologische Detektion von Proteinen durch DAS-ELISA.....	26
2.2.3	Hefen	27
2.2.3.1	Kultivierung von Hefen.....	27
2.2.3.2	Hefe-Doppeltransformation:.....	27
2.2.3.3	Erstellung einer Interaktionsmatrix	28
2.2.3.4	β -Galactosidase Filtertest	28
2.2.3.5	Plasmid Isolierung aus Hefe	29
2.2.3.6	Quantifizierung der β -Galaktosidaseaktivität im Hefe-Zwei-Hybrid-System (ONPG-Test).....	29
2.2.4	Pflanzen- und Gewebekultur	30
2.2.4.1	Oberflächen-Sterilisation von Tabaksamen	30
2.2.4.2	Axenische Kultur von <i>N. tabacum</i> und <i>N. benthamiana</i>	30
2.2.4.3	Keimtest.....	30
2.2.4.4	Agrobacteriumtransformation	30
2.2.4.5	Blattscheibentransformation.....	31
2.2.4.6	Histologischer Gus Assay.....	31
2.2.5	Arbeiten mit Tospoviren.....	32
2.2.5.1	Viren Erhaltung	32
2.2.5.2	Virus Resistenztest	32
2.3	Computer-Software und Datenbanken	33
3	ERGEBNISSE.....	34
3.1	Ausgangssituation.....	34

3.2	Untersuchung verschiedener Tospoviren N-Proteine und N-Protein Varianten im Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	36
3.2.1	Interaktionstests mit N-Proteinen aus verschiedenen Tospoviren.....	38
3.2.2	Hefe Interaktionsmatrix mit C-terminalen Deletionen.....	38
3.3	Untersuchung TSWV N-Protein exprimierender <i>Nicotiana tabacum</i> Pflanzen... 43	43
3.3.1	Test unterschiedlicher PPV-Konstrukte in <i>Nicotiana tabacum</i> var. Samsun auf Vermittlung von Tospoviren Resistenz	43
3.3.2	Untersuchung TSWV N-Protein exprimierender <i>Nicotiana benthamiana</i> Pflanzen	48
3.4	Peptid vermittelte Virusresistenz	54
3.4.1	Klonierung und Durchmusterung einer Proteinspezifischen Peptid-Bibliothek ..	54
3.4.2	Konstruktion zweier Tospoviren N-Protein bindender Peptide mit artifizieller RNA-Sequenz.....	56
3.4.3	Konstruktion der Gus Peptid Fusionen.....	58
3.4.4	Interaktionstests von Gus-Peptid-Fusionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	60
3.4.5	Resistenztests mit Peptid exprimierenden <i>N. benthamiana</i> Pflanzen	62
3.4.6	Quantifizierung der Bindungsstärke einer T-Pep-Gus Fusion an Tospoviren N-Proteine	64
3.4.7	Untersuchung der GusT Expression in rekombinanten <i>N. benthamiana</i> Pflanzen	66
3.4.8	Resistenztests mit GusT exprimierenden Pflanzenlinien.....	69
4	DISKUSSION	73
4.1	Untersuchungen zur N-Protein vermittelten Resistenz	73
4.1.1	Proteininteraktionen der Tospoviren N-Proteine und der N-Protein Peptid Fusionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	74
4.1.2	Untersuchung der N-Protein vermittelten Resistenz in <i>N. tabacum</i> var. Samsun und <i>N. benthamiana</i>	77
4.1.3	Diskussion eines N-Protein vermittelten Resistenzmechanismus in <i>N. tabacum</i> var. Samsun und <i>N. benthamiana</i>	79
4.2	Diskussion der Peptid vermittelten Tospovirusresistenz in <i>N. benthamiana</i>.....	83
4.3	Ausblick	86
5	ZUSAMMENFASSUNG	88
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	89

Abbildungsverzeichnis:

<i>Abbildung 1.1 Western Flower Thrips (F. occidentalis)</i>	2
<i>Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des TSWV Genoms</i>	3
<i>Abbildung 1.3 Modell zur Virusknospung</i>	4
<i>Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der übernommenen Konstrukte</i>	35
<i>Abbildung 3.2 Interaktion von TSWV N-Protein, M₂ und Art Protein mit verschiedenen Tospovirus N-Proteinen</i>	37
<i>Abbildung 3.3 Interaktionsmatrix der Tospoviren N-Proteine</i>	38
<i>Abbildung 3.4 Sequenzvergleich C-terminaler Enden verschiedener Tospoviren N-Proteine</i>	39
<i>Abbildung 3.5 Test auf Proteininteraktionen C-terminaler Deletionsmutanten</i>	40
<i>Abbildung 3.6 Interaktionsmatrix der C-terminalen Deletionen mit homologen und heterologen N-Proteinen</i>	41
<i>Abbildung 3.7 Phylogenetischer Stammbaum der Tospoviren N-Proteine und Einteilung in Interaktionsgruppen</i>	42
<i>Abbildung 3.8 Expressionsstärken verschiedener N. tabacum var. Samsun Linien</i>	44
<i>Abbildung 3.9 Immunodetektion von TSWV N-Protein in N. tabacum var. Samsun Pflanzen</i> .	45
<i>Abbildung 3.10 Mittlere Pflanzenhöhe von TSWV inokulierten N. tabacum var. Samsun Pflanzen 21 Tage nach Infektion</i>	47
<i>Abbildung 3.11 Resistenztest der Linie Art / 1.1 gegen TCSV und GRSV</i>	48
<i>Abbildung 3.12 Stammbaum verschiedener Tospoviren-Spezies und Isolate</i>	49
<i>Abbildung 3.13 Relative Expressionsstärke der N-Protein exprimierenden N. benthamiana Linien</i>	50
<i>Abbildung 3.14 Immunodetektion von N-Protein in Proteinextrakten aus transformierten N. benthamiana Pflanzen</i>	51
<i>Abbildung 3.15 Tospovirus Resistenz von N-Protein exprimierenden Nicotiana benthamiana Linien</i>	53
<i>Abbildung 3.16 Die isolierten Peptide und ihre Lage in der N-Protein Sequenz</i>	55
<i>Abbildung 3.17 Aminosäure Sequenzvergleich verschiedener Tospoviren N-Proteine in der C-terminalen Binderegion</i>	56
<i>Abbildung 3.18 Aminosäure- und Nukleotidsequenzvergleich von T- und W-Pep mit ihrer jeweiligen Wildtyp Sequenz</i>	57
<i>Abbildung 3.19 DNA-Fragmente von T-Pep und W-Pep sowie ihrer Kombination TW-Pep</i> ..	58
<i>Abbildung 3.20 Schematischer Vergleich der mutierten Gus-Fus Sequenz zur ursprünglichen Gus Sequenz</i>	59
<i>Abbildung 3.21 Schematische Darstellung unterschiedlicher Gus-Peptidfusionen</i>	59
<i>Abbildung 3.22 Interaktionen der Gus Peptid Fusionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System</i>	61
<i>Abbildung 3.23 Relative Expression der Gus Peptidfusionen in transgenen Nicotiana benthamiana Keimlingen</i>	63

<i>Abbildung 3.24 Durchschnittliche Pflanzenhöhe transgener Nicotiana benthamiana Linien 21 Tage nach Infektion mit TSWV</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 3.25 Quantifizierung der Proteininteraktionen von Gus und GusT mit C-terminalen Deletionen von Tospoviren N-Proteinen</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 3.26 Nachweis der Gus-Peptid-Fusionen in Pflanzenextrakten.....</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 3.27 Quantifizierung der Gus Aktivität in Gus und GusT transgenen Nicotiana benthamiana Linien</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 3.28 Histologischer β-Glucuronidase Aktivitätstest</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 3.29 Durchschnittliche Pflanzenhöhe der GusT Linien 23 Tage nach Infektion mit verschiedenen Tospoviren.....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 3.30 Abbildung von GusT transgenen Pflanzen im Vergleich zur Vektorkontrolle Gus 5.a sowie Wildtyppflanzen.....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 4.1 Modell zu N-Protein-Wechselwirkungen.....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 4.2 Sequenzvergleich der C-terminalen Binderegionen von zwölf N-Proteinen....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 4.3 Sequenzvergleich verschiedener Tospoviren Genomenden.....</i>	<i>82</i>

Tabellenverzeichnis:

<i>Tabelle 2.1 Zusammenstellung aller von der Arbeitsgruppe Schreier übernommenen Plasmide</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 2.2 Klonierungsstrategien für Hefe-Zwei-Hybrid-System geeignete Vektoren mit Tospoviren N-Proteinen</i>	<i>17</i>
<i>Tabelle 2.3 Tabelle zur Konstruktion von N-Protein Deletionen</i>	<i>18</i>
<i>Tabelle 3.1 Sequenzidentitätsvergleich von acht Tospoviren N-Proteinen.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 3.2 Symptomausprägung von N. benthamiana Pflanzen 21 Tage nach Infektion mit verschiedenen Tospoviren</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 3.3 Das Verhältnis von symptomatischen zu asymptomatischen GusT Nicotiana benthamiana Pflanzen 23 Tage nach Infektion mit verschiedenen Tospoviren</i>	<i>71</i>

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Antiserum
3-AT	3 Amino-1,2,4-triazol
6-BAP	6-Benzylaminopurin
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
DMF	N-N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Tage nach Inokulation
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
evtl.	eventuell
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gal4	Galaktose 4
HRP	Meerrettich-Peroxidase
3-IBA	3-Indolbutyrsäure
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LiAc	Lithiumacetat
L-Protein	virale RNA abhängige RNA Polymerase
NAA	Naphtylelessigsäure
NaPi	Natriumphosphat
Nos	Nopalinsynthase
N-Protein	Nucleokapsidprotein
NSm-Protein	Transportprotein
NSs	Nicht-Strukturprotein
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid
ORF	Open reading frame (Offener Leserahmen)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDR	parasite derived resistance
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Einheit (U)
ü.N.	über Nacht
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronid
z.B.	zum Beispiel

Virus Acronyme

BWYV	Beet western yellows <i>polerovirus</i>
CMV	Cucumber mosaic cucumovirus
CaMV	Cauliflower mosaic geminivirus
PPV	Plum pox potyvirus
PVX	Potato X potexvirus
PVY	Potato Y potyvirus
TCV	Turnip crinkle carmovirus
TMV	Tobacco mosaic tobamovirus

Tospoviren

CSNV	Chrysanthemum stem necrosis tospovirus
CCV	Capsicum chlorosis tospovirus
GBNV	Groundnut bud necrosis tospovirus
GCFV	Groundnut chlorotic fan-spot tospovirus
GRSV	Groundnut ringspot tospovirus
GYSV	Groundnut yellow spot tospovirus
INSV	Impatiens necrotic spot tospovirus
IYSV	Iris yellow spot tospovirus
TCSV	Tomato chlorotic spot tospovirus
TSWV	Tomato spotted wilt tospovirus
TYFRV	Tomato yellow fruit ring tospovirus
PSMV	Physalis severe mottle tospovirus
WSMV	Watermelon silver mottle tospovirus
ZLCV	Zucchini lethal chlorosis tospovirus

Die Viren GYSV und GCFV werden in der Literatur auch als Peanut yellow spot virus (PYSV) bzw. Peanut chlorotic fan-spot virus (PCFV) beschrieben. PSMV ist ein Physalis-Isolat von Melon yellow spot virus (MYSV).

1 Einleitung

Virale Krankheiten stellen ein großes Problem in der Pflanzenproduktion dar. Dies betrifft nicht nur Ertragseinbußen durch vermindertes Pflanzenwachstum, sondern auch Qualitätsverluste, die z.B. im Zierpflanzenbau oder in der Obst- und Gemüseproduktion zum wirtschaftlichen Totalverlust des Erntegutes führen. Da bisher keine kurative wirkenden Pestizide existieren, beschränken sich antivirale Strategien auf pflanzenbauliche Maßnahmen die zu einer Reduzierung des Befalls führen sollen. Diese Maßnahmen sind aber nur eingeschränkt wirksam. Aus diesem Grund wurden gentechnische Strategien zur Erzeugung dauerhafter und breiter Virusresistenz in Pflanzen erprobt. Diese betreffen meist Viren mit einem Plus-Strang-RNA-Genom. Deutlich weniger Informationen liegen für Viren mit einem Negativ-Strang-RNA-Genom vor, obwohl einige wirtschaftlich sehr bedeutende Erkrankungen von Viren dieses Typs verursacht werden. Zu dieser Gruppe gehören die Tospoviren, gegen die in der vorliegenden Arbeit zwei Resistenzstrategien vorgestellt werden.

1.1 Tospoviren

Das Typvirus der Tospoviren ist das Tomato spotted wilt virus (TSWV), welches 1930 von Samuel et al. (Samuel et al. 1930) als Verursacher der Tomaten-Bronzeflecken-Krankheit beschrieben wurde (Brittlebank 1919). Tospoviren zeichnen sich durch einen großen Wirtskreis von 1050 beschriebenen Arten aus (Peters 1998) und der wirtschaftliche Schaden, der alleine durch TSWV verursacht wird beläuft sich auf geschätzte eine Milliarde US\$ pro Jahr (Goldbach et al. 1996). Die große ökonomische Bedeutung dieser Virusgruppe hat dazu geführt, dass neben der Suche nach Resistenzgenen mit Methoden der klassischen Züchtung auch zytologische, biochemische und molekulargenetische Methoden angewendet wurden um diese Virusgruppe besser verstehen und bekämpfen zu können. Tospoviren sind membranumhüllte Viren, deren drei Genomteile in negativer und positiver Leserichtung fünf Gene kodieren. Aufgrund ihrer Eigenschaften wurden sie als Mitglieder der Bunyaviridae beschrieben (Milne et al. 1984) und stellen innerhalb dieser Virusfamilie die einzige Gruppe dar, die für Pflanzen infektiös ist (Kolakofsky 1991). Als Vektor für den Transport von Pflanze zu Pflanze dienen Thripse (Wijkamp et al. 1993). Diese Insekten gehören in die Familie der Thripidae und ernähren sich indem sie Mesophyllzellen mittels eines Saugrüssels anstechen und aussaugen. Über den so aufgenommenen Pflanzensaft können sie sich als Larve mit Tospoviren infizieren. Das Virus wird wahrscheinlich im Magen aufgenommen und vermehrt sich im Insekt. Nachdem die Speicheldrüsen infiziert sind kann das adulte Tier das Virus auf andere Pflanzen übertragen (Nault 1997).

Eine Abbildung eines wichtigen Tospovirus Vektors (*Frankliniella occidentalis*) ist in Abbildung 1.1 dargestellt.



Abbildung 1.1 Western Flower Thrips (*F. occidentalis*)

Entnommen von:

<http://ftsg.ifas.ufl.edu/FTSIBC.HTM>

Nachdem das Virus in die Pflanzenzelle gelangt ist kann sich eine Virusinfektion in einer Wirtspflanze etablieren. Hierzu werden die drei Genomsegmente, die sich in einem Komplex mit dem Nucleokapsidprotein (N-Protein) des Virus befinden über einen noch ungeklärten Mechanismus von der umhüllenden Membran befreit. Die ebenfalls im sphärischem, membranumhüllten Virus (Virion) eingeschlossenen Moleküle der viralen RNA-Polymerase (L-Protein) beginnen nun damit neue Genomsegmente und Boten-RNA von den Nucleokapsiden (virale RNA mit Nucleokapsidprotein komplexiert) herzustellen. Das L-Protein stellt Kopien der viralen Genomsegmente her, welche wiederum von Nucleokapsidprotein komplexiert, als Vorlage für die Herstellung viraler Genomsegmente dienen können. Hierdurch wird der Replikationszyklus des Virus geschlossen. Gleichzeitig werden von den Genomteilen Boten RNAs mit cap-Struktur für die Translation der viralen Proteine hergestellt. Die cap-Struktur wird wahrscheinlich von dem L-Protein an die viralen Boten RNAs angefügt, nachdem sie von zellulärer Boten-RNA abgetrennt wurde (Duijsings et al. 2001). Die viralen Boten-RNAs tragen zusätzlich noch eine Poly(A)-Sequenz, deren Ursprung noch unbekannt ist (Soellick 2000). Von dem viralen S-Segment wird die Boten-RNA für das Nucleokapsidprotein (N-Protein) gebildet. Mittels des viral komplementären S-Segments wird die Boten-RNA für das NSs Protein hergestellt, dessen Funktion noch völlig unbekannt ist. Von dem viralen M-Segment wird die Boten RNA für die viralen Glykoproteine G1 und G2 abgelesen, welche als Polyprotein (G1-G2 Protein) an den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums hergestellt und proteolytisch in die beiden Teilproteine gespalten werden (Adkins et al. 1996). Diese zwei Proteine finden sich später in der viralen Membran und sind höchst wahrscheinlich für das Eindringen des Virus in die Zellen des Thrips

verantwortlich. Weiterhin unterstützen sie evtl. die Viruskapsung in das Endoplasmatische Retikulum (Resende R. de et al. 1991). Das M-Segment des Virus kodiert zusätzlich noch für das Movementprotein (NSm-Protein), welches für den Zell zu Zell Transport des Virus benötigt wird und dessen Boten-RNA von dem viral komplementären M-Segment hergestellt wird (Storms et al. 1995). Die virale RNA-Polymerase wird schließlich von dem viralen L-Segment hergestellt. Es ist noch nicht klar, ob hierfür eine Boten-RNA nötig ist, oder ob das viral komplementäre L-Segment auch als Boten-RNA wirken kann. Eine vereinfachte Darstellung der viralen Genomteile und die von ihnen kodierten Proteine findet sich in Abbildung 1.2.

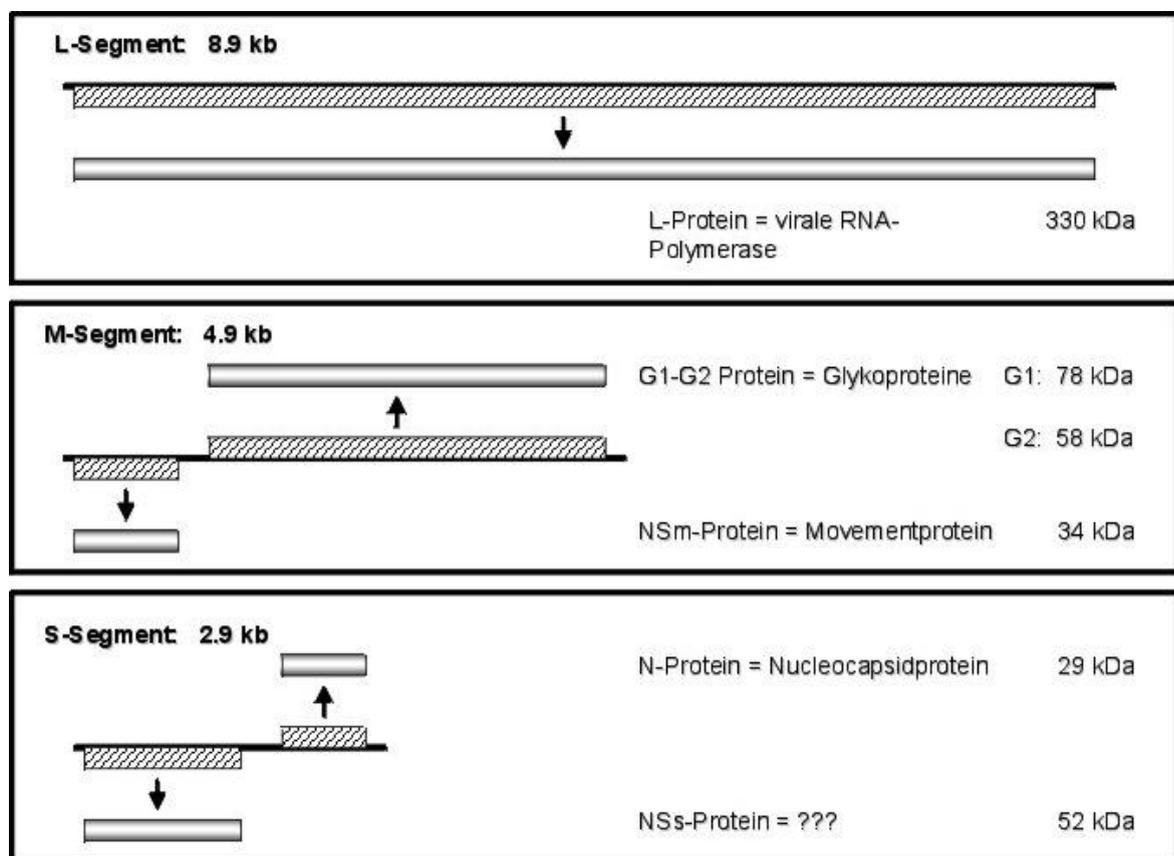


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des TSWV Genoms

Die einzelnen Segmente des Einzelstrang RNA Genoms sind als schwarze Linien dargestellt. Auf ihnen liegen die offenen Leseraster der viralen Proteine als schraffierte Balken. Hierbei soll die Lage der Balken relativ zur viralen RNA angeben, in welcher Orientierung sie sich auf dem Segment befinden, d.h. ob die Boten RNA der Proteine von dem viralen (Balken oberhalb der RNA-Linie) oder dem viral komplementären Genom-Segment (Balken unterhalb der RNA-Linie) gebildet wird. Schattierte Balken deuten die viralen Proteine an. Auf derselben Höhe ist der Name des jeweiligen Proteins mit der entsprechenden Funktion sowie das Molekulargewicht angegeben.

Nach erfolgreicher Infektion einer Pflanzenzelle infiziert das Virus weitere Zellen. Hierzu werden Nucleokapside aller Genomteile, wahrscheinlich mit Hilfe des NSm-Proteins, durch die Plasmodesmata transportiert (Storms et al. 1995). Ob die virale Polymerase als Protein oder als Boten RNA transportiert wird ist noch nicht geklärt. Eine Bindung des NSm-Proteins an das Nucleokapsidprotein sowie eine Bindung an RNA konnte gezeigt werden (Soellick et al. 2000). Parallel zur Ausbreitung in der Pflanze bilden sich in infizierten Zellen membranumhüllte Virionen, die wahrscheinlich für die erneute Infektion einer Thripslarve und für den Transport von Pflanze zu Pflanze notwendig sind. Die Bildung von Virionen wurde elektronenmikroskopisch untersucht (Kikkert et al. 1999). Anhand der gewonnenen Daten wurde ein Modell des viralen Entwicklungszyklus entwickelt (Abbildung 1.3). Demnach werden die Glykoproteine in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums synthetisiert. Anschließend werden sie in den Golgi-Apparat transportiert, wo sie mit neu gebildeten Nucleokapsiden in Kontakt kommen. Anschließend werden Nucleokapside von den Membranen des Golgi-Apparates umhüllt und abgeschnürt. Sie werden daraufhin in der Zelle als „doppelt umhüllte Partikel“ sichtbar. Die äußere Membranen dieser Partikel können nun miteinander und mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums fusionieren. Hierdurch werden „einfach umhüllte-Partikel“ im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums angesammelt und können durch saugende Thripse aufgenommen werden.

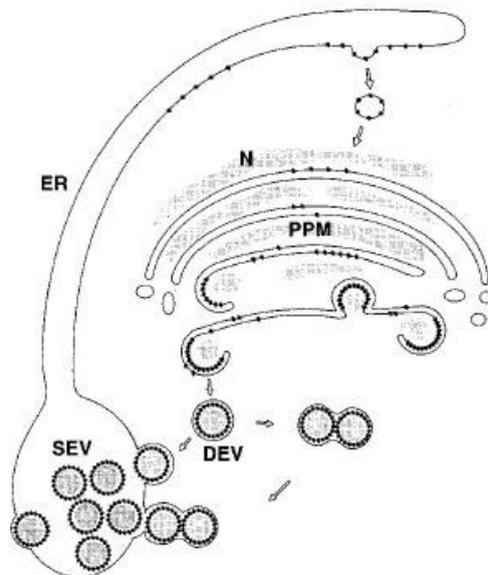


Abbildung 1.3 Modell zur Virusknospung

Die Abbildung wurde der Publikation von Kikkert et al. 1999 (Kikkert et al. 1999) entnommen.

ER = Endoplasmatisches Retikulum; N = Ansammlungen von N-Protein; PPM = Paarige Parallele Membranen; DEV = double enveloped particles (doppelt umhüllte Partikel); SEV = single enveloped particles (einzeln umhüllte Partikel)

Dieser Infektionszyklus von TSWV trifft in seinen Grundzügen wahrscheinlich auf alle Tosspoviren zu, wobei Unterschiede für die unterschiedlichen Viren, Virusstämme, Wirtspflanzen und Thripsarten zu erwarten sind.

1.2 Virusresistenz bei Pflanzen

Die Schwerpunkte der phytovirologischen Forschung waren die Beschreibung von Pflanzenviren und deren Schadbilder, die Identifizierung von natürlich vorkommenden Resistenzgenen und deren Überführung in aktuelles Zuchtmaterial. Diese Forschungsansätze hatten oft rein deskriptiven Charakter. Seitdem jedoch molekularbiologische und biochemische Methoden in der Phytovirologie verwendet werden, sind zusätzliche Werkzeuge verfügbar um grundlegende Prozesse viraler Infektionen aufzuklären und die gewonnenen Einsichten für die Resistenzzüchtung nutzbar zu machen. Einige wichtige Erkenntnisse der letzten Jahre sollen hier kurz dargestellt werden.

1.3 Virus gesteuerte Prozesse während der Infektion und pflanzliche Gegenmaßnahmen

Damit sich eine virale Infektion vollständig in einer Pflanze etablieren kann, muss das Virus in der Lage sein drei grundlegende Prozesse durchzuführen. Dies ist die Vermehrung des Virus, der virale Zell-zu-Zell-Transport und die systemische Ausbreitung des Virus über das Phloem. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse haben gezeigt, dass Pflanzen in der Lage sind, in alle angesprochenen Prozesse einzugreifen um eine virale Infektion zu verhindern (Fraser 2000a). Der am besten untersuchte Mechanismus verläuft über Produkte von Resistenz-Genen, die in direkter oder indirekter Weise virale Proteine erkennen können. In der Folge wird eine Signalkaskade aktiviert, die in der Regel zu einem hypersensitiven Zelltod der befallenen Zellen und zu einer Unterdrückung der Virusausbreitung führt. Einige Beispiele für Resistenzgene gegen Viren sind: das N- und N'-Gen gegen Tobacco mosaic tobamovirus (TMV), das Rx-Gen gegen Potato X potexvirus (PVX), das Y-1 Gen gegen Potato Y potyvirus (PVY) und das HRT Gen gegen Turnip crinkle carmovirus (TCV) sowie das Sw-5b Gen gegen TSWV (Smith 1944; Spassova et al. 2001). Die Resistenzgene scheinen spezifische Module in einer gemeinsamen Signalkaskade zu sein, da Resistenzgene auch in anderen Pflanzenarten ihre Funktion erfüllen können. Weiterhin sind mehrere Resistenzgene von denselben Elementen einer Signalkaskade abhängig (Liu et al. 2002). Eine Aktivierung der Resistenzgene führt zur transkriptionellen Aktivierung verschiedener Gene der Pathogenabwehr und zur Weiterleitung systemischer Signale. In der Regel führt die infizierte Zelle hiernach den programmiertem Zelltod durch (Feys et al. 2000). Welche Mechanismen aber schließlich zur Virusresistenz führen ist noch weitgehend ungeklärt. Der eigentliche Hypersensitive Zelltod scheint z.B. nur ein Begleitphänomen der viralen Abwehr zu sein, da die Virusausbreitung außerhalb der Nekrose gestoppt wird, bzw. unabhängig von der Nekrose ist (Bendahmane et al. 1999; Cole et al. 2001; Murphy et

al. 2001). Weitgehend ungeklärt sind auch Resistenzmechanismen, die nicht durch R-Gene und Hypersensitiven Zelltod vermittelt werden. So ist es möglich eine erhöhte Pathogenabwehr durch Gabe von Salizylsäure (SA) und deren Analoga, wie z.B. Benzothiodiazol oder Acibenzolar-S-methyl zu erzeugen, die auch eine Resistenz gegen mehrere Virusgruppen einschließt (Oostendorp et al. 2001). Hierbei scheint der antivirale Signalweg aber getrennt von den Signalwegen zu sein, die zu erhöhter Pilz- bzw. Bakterienresistenz führen (Murphy et al. 1999). Proteine, die in Verbindung mit viraler Abwehr gebracht werden, sind Ribosomen inaktivierende Proteine (RIPs) (Nielsen et al. 2001), ein „inhibitor of viral replication“ (VIR) (Akad et al. 1999) sowie eine enzymatische Aktivität, die analog zum tierischen Interferon System zur Phosphorylierung des Elongationsfaktors eIF-2a führt (Langland et al. 1998). Ebenso scheint die Pflanze bei viralem Befall die Plasmodesmata mittels Callose Ablagerungen zu verstopfen (Bucher et al. 2001; Murphy et al. 2002; Ueki et al. 2002). Die tatsächliche Bedeutung dieser Beobachtungen für die virale Abwehr ist aber noch weitgehend unklar. Zum Teil wird die Interpretation von Ergebnissen durch die große Anzahl von Genen erschwert, die bei Virenbefall induziert werden und deren Funktion noch völlig ungeklärt ist (Guo et al. 2000). Ein weiterer und besser untersuchter Mechanismus beruht auf dem sequenzspezifischen Abbau viraler RNA. Der auslösende Faktor ist wahrscheinlich doppelsträngige RNA, die bei der viralen Replikation und Transkription entsteht und die von zellulären Komponenten erkannt wird. Zusätzlich wird ein sequenzspezifisches Signal systemisch in der Pflanze verbreitet, das die ganze Pflanze auf den Abbau der Virus RNA vorbereitet (Fagard et al. 2000; Waterhouse et al. 2001). Dieser Mechanismus scheint einen so großen Einfluss auf den Erfolg viraler Infektionen zu haben, dass auf dem Genom mehrerer Virusgruppen Inhibitoren codiert werden, die diese Prozesse unterbinden können (Li et al. 2001). Das Wechselspiel sequenzspezifischen RNA Abbaus (RNA silencing) und viraler Inhibition erklärt höchst wahrscheinlich klassische virologische Phänomene, wie die Erholung einiger Pflanzen nach Virusinfektion (Fagard et al. 2000) und auch bestimmte Mosaiksymptome (Moore et al. 2001) sowie die Beschränkung von Viren auf bestimmte Pflanzengewebe (Ryabov et al. 2001).

1.4 Molekularbiologisch hergestellte Virusresistenzen

Parallel zur Forschung an natürlich vorhandenen Virusresistenzen hat es Bestrebungen gegeben künstliche Virusresistenzen mittels der Molekulargenetik zu erzeugen. Hierbei haben sich die meisten Strategien am Konzept der „parasite derived resistance“ (PDR) orientiert, welches von Sanford und Johnson entwickelt und später als „pathogen derived resistance“ bekannt wurde (Sanford et al. 1985). Hierbei werden Gene des Pathogens in den Wirtsorganismus überführt. Durch die Expression der entsprechenden Genprodukte

sollen Prozesse des Pathogens gestört werden, was schließlich zur Verhinderung oder Reduktion von Infektionen führen soll. In der Phytovirologie wurden verschiedenste virale Sequenzen verwendet, wie z.B. Gene für RNA-Polymerasen, Hüllproteine und Movement-Proteine sowie RNA von Virus Satelliten und defective interfering (DI) RNAs (Strittmatter et al. 1993) (Lomonosoff 1995). Hierdurch wurde in zahlreichen Fällen auch eine hohe Resistenz gegen das jeweilige Virus erreicht. Es stellte sich heraus, dass Pflanzen mit der besten Resistenz in den allermeisten Fällen das transformierte Gen nicht in Protein übersetzten, sondern die Boten RNA über einen silencing Mechanismus abbauten. Diese Resistenz bezog sich daher lediglich auf die Virusart von der das Transgen stammte oder sehr nah verwandte Virusstämme bzw. -arten (Callaway et al. 2001).

Transgene Pflanzen, die das jeweilige Transgen in Protein übersetzten zeigten oft nur eine Abschwächung der Virussympptome oder eine Verzögerung der Symptomausprägung. Im Gegensatz zur RNA vermittelten Resistenz bezog sich dies aber oft auf mehrer Virusspezies (Gonsalves et al. 1993). Die besten Resultate wurden nicht mit Wildtyp Proteinen, sondern mit Proteinmutanten erzielt (Cooper et al. 1995; Tacke et al. 1996) (Beachy 1999). Aufgrund der häufig breiteren Resistenz erscheint eine Protein vermittelte Resistenz sehr wünschenswert. Die Anwendung dieser Strategie leidet aber unter der Tatsache, dass die beobachteten Resistenzphänotypen von völliger Anfälligkeit oder sogar einer Unterstützung der Infektion von homologen und heterologen Viren, über eine abgemilderte Infektion bis zur Immunität der Pflanze reichen kann. Der Erfolg einer Protein vermittelten Resistenzstrategie ist daher nicht vorherzusagen. Dies hat dazu geführt, dass man sich in den letzten Jahren auf RNA-vermittelte-Resistenz konzentriert und deren Nachteile in Kauf genommen hat.

1.5 Gentechnisch erzeugte Resistenz gegen TSWV

Die oben beschriebenen allgemeinen Erfahrungen zur „pathogen derived resistance“ spiegeln sich auch in Arbeiten wieder, die sich mit transgen vermittelten TSWV Resistenzen beschäftigen. Die erste Arbeit, die hierzu vorliegt, beschreibt eine Resistenz, die von einer verzögerten Symptomausprägung bis zu völlig symptomfreien Pflanzen reichte (Gielen et al. 1991). Das verwendete Transgen enthielt die Gensequenz des Nucleokapsidproteins. Später wurde gezeigt, dass sich die hohe Resistenz nur auf TSWV Isolate und Stämme bezog und RNA vermittelt ist (de Haan et al. 1992; Pang et al. 1993), während Nucleokapsidprotein exprimierende Pflanzen einen Effekt gegen mehrere Tospoviruspezies zeigten, der sich aber nur in einer verzögerten Virusausbreitung von zwei bis drei Wochen äußerte (MacKenzie et al. 1992; Pang et al. 1992; Pang et al. 1993; Pang et al. 1994; Vaira et al. 1995). Es scheint in manchen Fällen auch möglich zu sein, dass Nucleokapsidprotein exprimierende Pflanzen hoch

resistent gegen TSWV sind. So werden in der oben genannten Arbeit (MacKenzie et al. 1992) mehrere Pflanzenlinien beschrieben, die hohe Resistenz gegen TSWV aufweisen, obwohl sie Nucleokapsidprotein exprimieren. Weiterhin wird in einer Patentschrift (Schreier et al. 1994) ein DNA Konstrukt beschrieben, welches eine breite Resistenz gegen Tospoviren vermitteln kann und welches zur Expression eines modifizierten Nucleokapsidproteins führt. Diese Resistenz bezieht sich auf TSWV, TCSV und GRSV. Zusätzlich zeigten die beschriebenen *N. tabacum* var. Samsun Pflanzen eine verminderte Anzahl von Lokalnekrosen nach Infektion mit INSV. Andere Gruppen konzentrieren sich auf den RNA vermittelten Resistenzmechanismus. Hier werden hohe und gleichzeitig breite Resistenzen dadurch erzeugt, dass man Sequenzen von Nucleokapsidproteinen mehrerer Tospoviren Spezies (TSWV, TCSV und GRSV) in einem Konstrukt kombiniert (Prins et al. 1995). In einer weiteren Arbeit wird gezeigt, dass man auch mit Sequenzen des TSWV Movementproteins (NSm) hohe Resistenz hervorrufen kann, während andere Sequenzen des viralen Genoms, wie die der Intergenischen-Region, der Glykoproteine, des NSs Proteins und Sequenzen aus dem codierenden und nicht codierenden Region des L-Segments keinerlei Resistenz bewirken (Prins et al. 1996). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Sequenzlänge von 110 bp des TSWV N-Gens ausreichend für eine RNA-vermittelte-Resistenz ist, sofern sie mit der Sequenz von GFP fusioniert wurde (Pang et al. 1997). Die GFP Sequenz kann durch die Sequenz des turnip mosaic potyvirus (TuMV) Hüllproteins ersetzt werden um so Resistenz gegen TuMV und TSWV (Jan et al. 2000) zu erhalten. Ein Bedarf für neue Resistenzquellen ist aber trotz der bisher erreichten Erfolge gegeben, da pseudorekombinante Stämme bekannt sind, die sowohl die natürlich vorkommende Sw-5b Resistenz, als auch die RNA-vermittelte-Resistenz brechen können (Hoffmann et al. 2001). Da natürliche Resistenzgene nur in sehr begrenztem Maß vorhanden sind und oft in getrennten Pflanzenarten bzw. züchterisch uninteressanten Kultivaren vorliegen (Hoffmann et al. 2001) können sie nur sehr begrenzt eingesetzt werden. Es erscheint daher notwendig eine Alternative zur RNA vermittelten Resistenz zu entwickeln. Hier bietet sich die Protein vermittelte breite Resistenz gegen Tospoviren an, da sie wahrscheinlich mit konservierten Funktionen des Virus interferiert, während die RNA-vermittelte-Resistenz lediglich einen spezifischen Resistenzmechanismus der Pflanze induziert. Für eine züchterische Verwendung Protein-vermittelter-Resistenz ist es aber notwendig, die Wirkmechanismen besser zu verstehen um die bisher oft unbefriedigende Resistenzhöhe zu erhöhen und die Wirkung von verwendeten Transgenen vorhersagen zu können. Für die Nucleokapsidprotein vermittelte Tospoviren Resistenz ist es daher nötig die Frage zu klären, warum Protein exprimierende Pflanzen häufig nur eine verzögerte Symptomausprägung zeigen,

während mit niedriger Frequenz auch Pflanzenlinien auftauchen die hoch resistent sind (MacKenzie et al. 1992), deren exprimierte N-Protein Menge aber nicht mit der Resistenz korreliert. Weiterhin ist die Beobachtung interessant, dass mit einem veränderten Konstrukt, welches ein modifiziertes Nucleokapsidprotein zur Expression bringt, hoch resistente Pflanzen mit hoher Frequenz regeneriert werden konnten (Schreier et al. 1994). Ein Verständnis dieses Phänomens könnte es erlauben Protein vermittelte Resistenzen planbar zu machen und zur gezielten Anwendung zu bringen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es tiefere Einblicke in den molekularen Wirkungsmechanismus Nucleokapsidprotein vermittelter Tospovirus Resistenz zu bekommen. Ausgangspunkt war die Beobachtung einer breiten und hohen Virusresistenz gegen die Tospoviren TSWV, TCSV und GRSV in *Nicotiana tabacum* var. Samsun Pflanzenlinien, die eine Variante des TSWV N-Proteins mit einer N-terminalen Fusion von 23 Aminosäuren unter Kontrolle eines translationalen Verstärkerelementes aus Plum pox potyvirus exprimieren. Hierbei sollte die Frage beantwortet werden, ob die Addition von 23 Aminosäuren oder die Expression mittels des verwendeten translationalen Verstärkers für die hohe Resistenz verantwortlich ist. Weiterhin sollte geprüft werden, welche weiteren Tospoviren Spezies dem Resistenzmechanismus unterliegen und ob das beobachtete Resistenzspektrum Rückschlüsse über den verantwortlichen Mechanismus erlauben. Da das N-Protein mehrere bekannte, einige vermutete sowie evtl. noch unbekannte Funktionen im viralen Entwicklungszyklus ausführt, sollte parallel hierzu geprüft werden, ob die beobachtete Resistenz aus der Störung mehrerer viraler Prozesse hervorgeht oder ob eine einzelne Funktion des Proteins ausreichend ist um eine Protein vermittelte Resistenz zu erzeugen. Hierzu sollte ein Peptid gefunden und in rekombinanten Pflanzen zur Expression gebracht werden, welches eine Funktion des N-Proteins repräsentiert. Bindungsstudien im Hefe-Zwei-Hybrid-System sollten zeigen, ob die beobachteten Resistenzen mit Bindungseigenschaften des N-Proteins bzw. des Peptids in Verbindung zu bringen sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wurden reinst oder in p.A. Qualität von den Firmen Merck, Sigma, J.T. Baker Chemicals, Biomol, Roche Biochemicals Difco Laboratories, Roth, Serva, GIBCO BRL, Bio-Rad, Fluka, Duchefa, Biozym und Amersham Pharmacia Biotech bezogen. Enzyme stammten von Roche, Invitrogen, MBI Fermentas und New England Biolabs. Filter und Membranen wurden von Millipore und Amersham Pharmacia Biotech erworben. DNA Isolationen wurden mit Säulen-Systemen der Firma Qiagen durchgeführt. Synthetische Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG, Invitrogen und Metabion bezogen.

2.1.2 Organismen

2.1.2.1 Viren

Tomato spotted wilt virus L3	TSWV	(DSMZ-Nr. PV-0182)
Tomato chlorotic spot virus	TCSV	(DSMZ-Nr. PV-0390)
Groundnut ringspot virus	GRSV	(DSMZ-Nr. PV-0205)
Chrysanthemum stem necrosis virus	CSNV	(DSMZ-Nr. PV-0529)
Impatiens necrotic spot virus	INSV	(DSMZ-Nr. PV-0280)
Iris yellow spot virus	IYSV	(DSMZ-Nr. PV-0528)
Physalis severe mottle virus	PSMV	(Cortez et al. 2001)
Watermelon silver mottle virus	WSMV	(DSMZ-Nr. PV-0283)

2.1.2.2 Bakterien

Escherichia coli

DH5 α	F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 <i>deoR endA1 recA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> (Hanahan 1983)
Top 10	F ⁻ <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80dlacZ Δ M15, Δ lacX74, <i>deoR recA1 araD130</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> (Invitrogen)
DB3.1	F ⁻ <i>gyrA462 endA</i> ⁻ Δ (<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (Sm ^r) <i>xyf5</i> λ - <i>leu mtI1</i> (Novagen)

Agrobacterium tumefaciens

LBA4404 nicht onkogener *A. tumefaciens* Stamm ohne eigenes Ti-Plasmid, basierend auf dem Wt-Stamm Ach5 (Hoekema et al. 1983)

2.1.2.3 Hefen

Saccharomyces cerevisiae

PJ69-4A *MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, ade2-101, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7lacZ* (James et al. 1996)

Y190 *MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, ade2-101, lys2-801, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, cyh^r2, LYS2::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-His3, URA3::Gal1_{UAS}-Gal1_{TATA}-lacZ* (Harper et al. 1993)

2.1.2.4 Pflanzen

Nicotiana tabacum var. Samsun NN

Nicotiana benthamiana

2.1.3 Vektoren

pAS2-1 Hefe-Zwei-Hybrid-System Vektor mit Gal4-DNA-Bindungs-Domäne (codons 1-147) und Tryptophan Selektion (Clontech)

pACT2-1 Hefe-Zwei-Hybrid-System Vektor mit Gal4-Aktivierungs-Domäne (codons 768-881) und Leucin Selektion (Clontech)

pEntry4 Gateway Vektor zur Herstellung mehrerer Zielvektoren mittels homologer Rekombination (Invitrogen)

pLX-Gateway binärer Vektor zur Agrobacterium vermittelten Pflanzentransformation mit Gateway Kasette, basierend auf pLX222 (Landsmann et al. 1988)

pCRBluntII Vektor zur Klonierung von PCR Fragmenten mittels einer Topoisomerase Reaktion (Invitrogen)

2.1.4 Oligonukleotide

2.1.4.1 Oligonukleotide zur Klonierung der Tospoviren N-Protein Sequenzen

Leseraster für das gesamte N-Protein werden mit dem jeweiligem Virus-Akronym und dem Kürzel –N bezeichnet. Die jeweiligen C-terminalen Deletionen werden mit dem Virus-Akronym und dem Kürzel –C bezeichnet.

TCSV-5	GGGAATTCCATATGCCCATGGCTAAGGTCAAGCTCACCAG 5'-Ende des TCSV-N Leserasters mit <i>Eco</i> RI, <i>Nde</i> I und <i>Nco</i> I Schnittstelle
TCSV-3	CGCGGATCCCTCGAGTTATGCAACACCAGCAATCTTGGC 3'-Ende des TCSV-N Leserasters mit <i>Xho</i> I und <i>Bam</i> HI Schnittstelle
TCSV-Cd26	CGCGGATCCCTCGAGTTACATAGCAATGCTTCCTTTAGC 3'-Ende des TCSV-C Leserasters mit <i>Xho</i> I und <i>Bam</i> HI Schnittstelle
GRSV-5	GGGAATTCCATATGCCCATGGCTAAGGTCAAGCTCACAAAAG 5'-Ende des GRSV-N Leserasters mit <i>Eco</i> RI, <i>Nde</i> I und <i>Nco</i> I Schnittstelle
GRSV-3	CGCGGATCCCTCGAGTTATGCAACACCAGCAATCTTGG 3'-Ende des GRSV-N Leserasters mit <i>Xho</i> I und <i>Bam</i> HI Schnittstelle
GRSV-Cd26	CGCGGATCCCTCGAGTTACATAGCAATGCTTCCCTTAGC 3'-Ende des GRSV-C Leserasters mit <i>Xho</i> I und <i>Bam</i> HI Schnittstelle
CSNV-5	GGGAATTCCATATGCCCATGGCTAAAGTTAAGCTTACAAAGG 5'-Ende des CSNV-N Leserasters mit <i>Eco</i> RI, <i>Nde</i> I und <i>Nco</i> I Schnittstelle
CSNV-3	CGCGGATCCCTCGAGTTAAACAAGATCTTTAGGAATAAGTTTAG 3'-Ende des CSNV-N Leserasters mit <i>Xho</i> I und <i>Bam</i> HI Schnittstelle
CSNV-Cd26	CGCGGATCCCTCGAGTTACATAGCAATGGCTCCTTTCATTC 3'-Ende des IYSV-N Leserasters mit <i>Xho</i> I und <i>Bam</i> HI Schnittstelle
INSV_N_5'NcoI	AGCAGATCACCATGGACAAAGCAAAGATTACC 5'-Ende des INSV-N Leserasters mit <i>Nco</i> I Schnittstelle
INSV_N_5'NdeI	AGCAGATCCATATGAACAAAGCAAAGATTACC 5'-Ende des INSV-N Leserasters mit <i>Nde</i> I Schnittstelle
INSV_N-3'Xmal	AAATCTCCCGGGAATAGAATCATTTTTCCCAAATC 3'-Ende des NSV-N Leserasters mit <i>Xho</i> I Schnittstelle

INSV_N-3'	BamHI AGCTCAGGATCCCTTTTAAATAGAATCATTTTT	3'-Ende des NSV-N Leserasters mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle
INSV_N_Cd26	GCGGGATCCTTACATTGCAGCAAGTCCTTTAGC	3'-Ende des INSV-C Leserasters mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle
IYSV-5	GGGAATTCCATATGCCCATGGCTACCGTTAGGGTGAAAC	5'-Ende des IYSV-N Leserasters mit <i>Eco</i> RI, <i>Nde</i> I und <i>Nco</i> I Schnittstelle
IYSV-3	CGCGGATCCCTCGAGTTAATTATATCTATCTTTCTTGGA	3'-Ende des IYSV-N Leserasters mit <i>Xho</i> I und <i>Bam</i> HI Schnittstelle
IYSV-Cd26	GCGGGATCCTTACAATGAAGCAGCACCCGA	3'-Ende des IYSV-C Leserasters mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle
PSMV-5	GGGAATTCATGCTACCGTTGCTAAGCTTACAAAGG	5'-Ende des PSMV-N Leserasters mit <i>Eco</i> RI und <i>Nco</i> I Schnittstelle
PSMV-3	CGCGGATCCCTCGAGTTAACTTCAATGGACTTAGACCTGGAAG	3'-Ende des PSMV-N Leserasters mit <i>Xho</i> I und <i>Bam</i> HI Schnittstelle
PSMV-Cd26	CGCGGATCCCTCGAGTTACAGGGATATGCCACTAGTTG	3'-Ende des PSMV-C Leserasters mit <i>Xho</i> I und <i>Bam</i> HI Schnittstelle
WSMoV-5	GGGAATTCCATATGCCCATGGCTAACGTTAAGCAGCTCA	5'-Ende des WSMV-N Leserasters mit <i>Eco</i> RI, <i>Nde</i> I und <i>Nco</i> I Schnittstelle
WSMoV-3	CGCGGATCCCTCGAGTTACACTTCCAAAGAAGTGCT	3'-Ende des WSMV-N Leserasters mit <i>Xho</i> I und <i>Bam</i> HI Schnittstelle
WSMV-Cd26	GCGGGATCCTTAGAGCGAAATAGAGCTAGCTGT	3'-Ende des WSMV-C Leserasters mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle

2.1.4.2 Oligonukleotide zur Klonierung der mutierten β -Glucuronidase Sequenz

Gus_5_BspHI	CTTTGGTCGTCATGAAGATGC	zur Eliminierung einer internen <i>Bsp</i> HI Schnittstelle im β -Galaktosidase Leseraster
Gus_3_NcoI	GCATCTCCATGGCGACCAAAG	zur Eliminierung einer internen <i>Bsp</i> HI Schnittstelle im β -Galaktosidase Leseraster

Gus_5_BspHI,EcoRI CCCGGGCTCATGAGGGAATTCATGTTACGTCCTGTAGA
AACC

um eine *Eco* RI Schnittstelle für N-terminale Peptid Fusionen mit der β -Galaktosidase zu klonieren

Gus_3_NcoI,Sall,BamHI CGCGGATCCTCAGTCGACCCCGGGGCCCATGGGTTGTTT
GCCTCCCTGC

um eine *Nco* I und eine *Xho* I Schnittstelle für C-terminale Peptid Fusionen mit der β -Galaktosidase zu klonieren

2.1.4.3 Oligonukleotide zur Klonierung der T-Pep und W-Pep Sequenz

T-Pep5 CCGGAATTCGCCATGGCTTCTAGTTCTAACCCAAACGCAAA
GGGTTCTGTGGCAATGGAG
für das 5'-Ende der T-Pep Sequenz mit *Eco* RI und *Nco* I Schnittstelle

T-Pep-52 AGGGTTCTGTGGCAATGGAGCATTATTCTGAGACATTGAAT
AAATTTTACGAGATGTTTG
für die mittlere T-Pep Sequenz

T-Pep-3 GGGCAATTGCCCCGCTCGAGAACACCAAACATCTCGTAAA
ATTTATTCAATGTCTCAGA
für das 3'-Ende der T-Pep Sequenz *Xho* I und *Mun* I Schnittstelle

W-Pep-5 CCCTCATGACCCTCGAGTTGTCTGAGTCTAATCCAGGTA
CTTCTAGTATTAGTTTGA
für das 5'-Ende der W-Pep Sequenz mit *Bsp* HI und *Xho* I Schnittstelle

W-Pep-52 ATCCAGGTA
ACTGCTTCTAGTATTAGTTTGA
AAAAGTACGAAG
ATCAGGTTAAATATATGG
für die mittlere W-Pep Sequenz

W-Pep-3 CCGCAATTGCGCGTCGACAGCAGAGAAA
ACTCTATCCATATA
TTAACCTGATCTTCGTA
für das 3'-Ende der T-Pep Sequenz *Sal* I und *Mun* I Schnittstelle

2.1.4.4 Oligonukleotide zur Klonierung der M_1-, M_2- und der Art-Mutanten

M1-NdeI	AACATACAAAATCATATGCAATCAAATCAA für das 5'-Ende des M_1 Leserasters mit <i>Nde</i> I Schnittstelle
M1_NcoI	GATACCATGGTTATGCAATCAAATCAATCTCAAGC für das 5'-Ende des M_1 Leserasters mit <i>Nco</i> I Schnittstelle
M2_NcoI	GATACCATGGTGATGTCGAGAATTCGAGCTCGGTAC für das 5'-Ende des M_2 Leserasters mit <i>Nco</i> I Schnittstelle
Art-NdeI	ACTTCTACAATCCATATGACTATTACTCCTACT für das 5'-Ende des Art Leserasters mit <i>Nde</i> I Schnittstelle
Art_BspHI	TACAATCATCATGACTATTACTCCTACTATTCACATTTCTGCT AGATCTCCTTAT für das 5'-Ende des Art Peptids mit <i>Bsp</i> HI Schnittstelle
N_rev	GAGAGAGGATCCTTAAGCAAGTTCTGTGAGTTTTGCCTGTTTT TTAACCC für das 3'-Ende des TSWV-N Leserasters mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle

2.1.4.5 Oligonukleotide für RT-PCR und Sequenzierungen

T7(dT)15	GTAATACGACTCACTATATTTTTTTTTTTTTTTTTT zur Hybridisierung mit Boten-RNA und Einführung der T7 Promotor Sequenz
35S-seq	GATGACGCACAATCCCCTACTATCCT zur Sequenzierung von Vektoren mit CaMV 35S Promotor
Nos-seq	GGAACTACTCACACATTATTCTGG zur Sequenzierung von Vektoren mit Nopalin Synthase Terminator

2.1.5 Verwendete Plasmide

2.1.5.1 Übernommene DNA Konstrukte

Tabelle 2.1 Zusammenstellung aller von der Arbeitsgruppe Schreier übernommenen Plasmide

Plasmidname	Beschreibung
Nr. 305	ORF des TSWV N-Proteins mit einem translationalen Verstärkers aus dem Plum pox potyvirus (PPV) Genom mit eliminiertem alternativem Startcodon in einer <i>Hin</i> dIII Kasette mit dem CaMV 35S Promotor und dem Nos-Terminator.
Nr. 313	ORF des TSWV N-Proteins mit einem translationalen Verstärkers aus dem Plum pox potyvirus (PPV) Genom mit alternativem Startcodon in einer <i>Hin</i> dIII Kasette mit dem CaMV 35S Promotor und dem Nos-Terminator.
Nr. 314	ORF des TSWV N-Proteins mit einer artifiziellen Peptidfusion unter der Kontrolle eines translationalen Verstärkers aus dem Plum pox potyvirus (PPV) Genom mit mutierter Sequenz zwischen dem alternativen Startcodon und dem Startcodon des N-Protons in einer <i>Hin</i> dIII Kasette mit dem CaMV 35S Promotor und dem Nos-Terminator.
pAD-M2	ORF des TSWV N-Proteins mit der Sequenz der aminoterminalen Peptidfusion als translationale Fusion mit der Aktivierungsdomäne des Gal4 Proteins. Das Plasmid ist ein Derivat des pACT2-1 Vektors für das Hefe-Zwei-Hybrid System.
pBD-M2	ORF des TSWV N-Proteins mit der Sequenz der aminoterminalen Peptidfusion als translationale Fusion mit der DNA Bindungsdomäne des Gal4 Proteins. Das Plasmid ist ein Derivat des pAS2-1 Vektors für das Hefe-Zwei Hybrid System.

2.1.5.2 Klonierungen für das Hefe-Zwei-Hybrid-System:

Für alle Klonierungen wurden PCR-Fragmente verwendet. Als Ausgangsmaterial für die Sequenz des Proteins mit der artifiziellen Peptidfusion (Art-Proteins) diente das Plasmid Nr. 314 (Tabelle 2.1). Die Sequenzen der Tosspoviren N-Proteine wurden über RT-PCR amplifiziert. Hierfür wurde RNA aus infizierten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen isoliert. Danach wurde das jeweilige Offene Leseraster mit spezifischen Oligonukleotiden in cDNA überführt und mit den gleichen Oligonukleotiden über eine PCR Reaktion amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde enzymatisch geschnitten und in die jeweiligen Zwei Hybrid Vektoren eingesetzt. Die folgende Tabelle gibt genaueren Aufschluss über die Klonierungen.

Tabelle 2.2 Klonierungsstrategien für Hefe -Zwei-Hybrid-System geeignete Vektoren mit Tospoviren N-Proteinen

N-Protein	Oligonukleotide	Klonierung
Art	Art_BspHI N_rev	PCR-Fragment mit <i>Bsp</i> HI und <i>Bam</i> HI geschnitten und in pACT2-1 (<i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI geschnitten) ligiert.
	Art-NdeI N_rev	PCR-Fragment mit <i>Nde</i> I und <i>Bam</i> HI geschnitten und in pAS2-1 (<i>Nde</i> I und <i>Bam</i> HI geschnitten) ligiert.
TCSV	TCSV-5 TCSV-3	PCR-Fragment <i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI geschnitten und in pACT2-1 und pAS2-1 (jeweils <i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI geschnitten) ligiert.
	GRSV	GRSV-5 GRSV-3
CSNV	CSNV-5 CSNV-3	PCR-Fragment <i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI geschnitten und in pACT2-1 und pAS2-1 (jeweils <i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI geschnitten) ligiert.
INSV	INSV_N_5'NcoI INSV_N_3'BamHI	PCR-Fragment mit <i>Nco</i> I und <i>Bam</i> HI geschnitten und in pACT2-1 (<i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI geschnitten) ligiert.
	INSV_N_5'NdeI INSV_N_3'BamHI	PCR-Fragment mit <i>Nde</i> I und <i>Bam</i> HI partiell geschnitten und in pAS2-1 (<i>Nde</i> I und <i>Bam</i> HI geschnitten) ligiert.
IYSV	IYSV-5 IYSV-3	PCR-Fragment <i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI geschnitten und in pACT2-1 und pAS2-1 (jeweils <i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI geschnitten) ligiert.
PSMV	PSMV-5 PSMV-3	PCR-Fragment <i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI geschnitten und in pACT2-1 und pAS2-1 (jeweils <i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI geschnitten) ligiert.
WSMV	WSMoV-5 WSMoV-3	PCR-Fragment <i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI geschnitten und in pACT2-1 und pAS2-1 (jeweils <i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI geschnitten) ligiert.

Die Tabelle 2.2 gibt die verwendeten Oligonukleotide zur Amplifizierung der deletierten Nucleokapsidprotein Sequenz wieder. Gleichfalls wird angegeben, wie viele Aminosäuren vom C-Terminus des jeweiligen N-Proteins entfernt wurden. Alle Gene wurden durch RT-PCR auf isolierter RNA infizierter *N. benthamiana* Blätter amplifiziert und parallel zur Klonierung der Wildtyp N-Protein Sequenzen durchgeführt. Die erhaltenen Fragmente wurden mit *Nco* I und *Bam* HI geschnitten und in die ebenfalls *Nco* I und *Bam* HI geschnittenen Hefe-Zwei-Hybrid-Vektoren pACT2-1 und pAS2.1 kloniert.

Tabelle 2.3 Tabelle zur Konstruktion von N-Protein Deletionen

Name der Deletion	Anzahl der vom C-Terminus entfernten Aminosäuren	Verwendete Oligonukleotide	
TCSV-C	26	TCSV-5	TCSV-Cd26
GRSV-C	26	GRSV-5	GRSV-Cd26
CSNV-C	28	CSNV-5	CSNV-Cd26
INSC-C	26	INSV_N_5'NcoI	INSV_N_Cd26
IYSV-C	37	IYSV-5	IYSV-Cd26
PSMV-C	42	PSMV_5	PSMV-Cd26
WSMV-C	39	WSMoV-5	WSMV-Cd26

2.1.5.3 Klonierung der T-Pep und W-Pep Sequenz

Für die Synthese des T-Pep Fragments wurden die Oligonukleotide T-Pep-52 und T-Pep-3 bei 50°C hybridisiert und mittels einer Polymerasereaktion (Pwo von Roche) zum Doppelstrang verlängert. Hiernach wurde eine PCR Reaktion mit den Oligonukleotiden T-Pep-5 und T-Pep-3 durchgeführt um das entsprechende Fragment zu verlängern. Analog wurde das W-Peptid synthetisiert, wobei zuerst die Oligonukleotide W-Pep-52 und W-Pep-3 eingesetzt wurden. Die endgültige Verlängerung wurde wieder über eine PCR mit den Oligonukleotiden W-Pep-5 und W-Pep-3 erreicht. Die erhaltenen Fragmente wurden über eine Topoisomerase Reaktion in den Vektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Durch die verwendeten Oligonukleotide wurde die Sequenz von T-Pep am 3'-Ende sowie W-Pep am 5'-Ende mit einer *Xho* I Schnittstelle versehen. Um eine Kombination der beiden Peptidsequenzen zu erreichen, wurden PCR-Fragmente von T-Pep und W-Pep jeweils mit dem Restriktionsenzym *Xho* I geschnitten und in Kombination ligiert. Durch eine PCR mit den Oligonukleotiden T-Pep-5 und W-Pep-3 wurde das fusionierte Fragment amplifiziert und in den Vektor pCRBluntII subkloniert.

2.1.5.4 Mutation der β -Glucuronidase für N- und C-terminale Peptidfusionen

Das Gus-Gen wurde in zwei Fragmenten über eine PCR Reaktion amplifiziert. Als template diente das Plasmid pDC-Gus-intron, welches von Leo Gälweiler zur Verfügung gestellt wurde. Das erste Fragment wurde mit den Oligonukleotiden Gus_5_BspHI, EcoRI und Gus_3_NcoI amplifiziert. Das entstandene Produkt wurde mit *Nco* I geschnitten. Für das zweite Fragment wurden die Oligonukleotide Gus_5_BspHI und Gus_3_NcoI, Sall, BamHI verwendet. Dieses Fragment wurde mit *Bsp* HI geschnitten und mit dem ersten Fragment ligiert. Durch diese Prozedur wurden eine interne *Bsp* HI

Schnittstelle eliminiert und gleichzeitig Schnittstellen für *Sma* I, *Bsp* HI und *Eco* RI am 5'-Ende eingebracht. Weiterhin wurden am 3'-Ende Schnittstellen für *Nco* I, *Sal* I, *Bam* HI und *Sma* I geschaffen. Da die neue Gus Sequenz translationale Fusionen ermöglicht, wurde das Gen Gus-Fus genannt. Die vollständige Gus-Fus Sequenz wurde als DNA Fragment mit den Enzymen *Bsp* HI und *Bam* HI geschnitten und in den *Nco* I, *Bam* HI geschnittenen Vektor pEntry4 kloniert. Dieser Vektor ist Bestandteil des Gateway™ Systems von Invitrogen und ermöglicht die gerichtete Klonierung des eingebrachten Fragments in weitere Gateway fähige Vektoren über sequenzspezifische Rekombination. Das neue Plasmid wurde pEntry-Gus genannt.

2.1.5.5 Klonierung von Gus-Peptidfusionen

Das Plasmid pEntry-Gus (Kapitel 2.1.5.4) wurde *Nco* I und *Sal* I geschnitten und mit dem *Nco* I, *Xho* I geschnittenen Fragment von T-Pep legiert. Die so entstandene Gen Fusion wurde GusT genannt. Die Fusion von Gus-Fus mit den kombinierten Peptiden (TW-Pep) wurde ebenfalls mit dem *Nco* I, *Sal* I geschnittenen pEntry-Gus Vektor und der Ligation mit dem *Nco* I, *Sal* I geschnittenen TW-Pep Fragment erzeugt. Das entstandene Gen wurde GusTW genannt. Die entsprechenden Vektoren wurden als pEntry-GusT und pEntry-GusTW bezeichnet. Zusätzlich zu den hier beschriebenen C-terminalen Gus Fusionen wurden noch N-terminale Fusionen hergestellt indem der Vektor pEntry-GusT (pEntry4 mit dem GusT Gen) mit *Eco* RI geschnitten und mit einem ebenfalls *Eco* RI und *Mun* I geschnittenen T-Pep Fragment legiert wurde. Weiterhin wurde der pEntry-GusTW Vektor mit *Eco* RI geschnitten und mit einem *Eco* RI, *Mun* I geschnittenen TW-Peptid Fragment fusioniert. Die so entstandenen N- und C-terminalen Fusionskonstrukte wurden pEntry-TGusT bzw. pEntry-TWGusTW genannt.

2.1.5.6 Klonierung von Gus-Peptid Fusionen für das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Die Klonierung erfolgte mittels einer sequenzspezifischen Rekombination. Als Hilfsmittel hierzu wurde das Gateway™ System von Invitrogen eingesetzt. Die Klonierung der benötigten pEntry Vektoren ist in Kapitel 2.1.5.5 erläutert. Die benötigten Hefe-Zwei-Hybrid-Vektoren pAS2-1 und pACT2-1 wurden als Zielvektoren an das Gateway System angepasst. Hierzu wurde der Vektor für die DNA Bindungsdomänenfusion (pAS2-1) mit *Nde* I und *Sal* I geschnitten. Die entstandenen Fragmentenden wurden mittels des Klenow-Polymerase-Fragments aufgefüllt. Hiernach wurde der so behandelte Vektor mit der Gateway Kasette A legiert und in DB3.1 Zellen transformiert. Der Vektor für die Aktivierungsdomänen Fusion pACT2-1 wurde mit *Nco* I und *Xho* I verdaut und mit Klenow-Polymerase-Fragment behandelt. Dieser Vektor wurde mit der Gateway

Kassette B ligiert und ebenfalls in DB3.1 Zellen transformiert. Die neuen Vektoren wurden pAS2-1_Gateway bzw. pACT2-1_Gateway genannt.

Das in Kapitel 2.1.5.4 beschriebene Gus-Fus Gen sowie die Gene für die Gus-Peptid-Fusionen wurden nun mit der LR-Reaktion von dem entsprechenden pEntry4 Derivat in die modifizierten Hefe-Zwei-Hybrid-Vektoren rekombiniert. Die Auswahl der Gateway Kassetten in den Hefe-Zwei-Hybrid-Vektoren wurde so getroffen, dass translationale Fusionen zwischen der Aktivierungs- respektive DNA Bindungsdomäne und den einzelnen Versionen des Gus-Gens möglich wurden. Die so entstandenen Vektoren wurden pBD-Gus bis pBD-TWGUSTW bzw. pAD-Gus bis pAD-TWGusTW genannt, wobei hier pBD jeweils für einen Vektor mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und pAD für einen Vektor mit der Gal4-Aktivierungsdomäne steht.

2.1.5.7 Vektorklonierung für die Pflanzentransformation

Zur Expression des N-Proteins und seiner Varianten (M_2 und Art) wurde die Expressionskassette (35S-Promotor mit Nos-Terminator) über einen Restriktionsschnitt mit dem Enzym *Hin* dIII aus den übernommenen Plasmiden Nr. 305, 313 und 314 (Tabelle 2.1) entnommen und in die *Hin* dIII Schnittstelle des binären Transformationsvektors pLX222 (Landsmann et al. 1988) eingesetzt.

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung diente ein Derivat des pLX222 Vektors. Dieses Plasmid (pLX_Gateway) wurde von Jana Hackbusch hergestellt und ist in ihrer Diplomarbeit beschrieben (Hackbusch 2000). Der Vektor enthält die Expressionskassette aus dem Vektor pRT104 (Töpfer et al. 1987) mit dem CaMV 35S Promotor und ein CaMV Polyadenylierungs Signal mit einer zusätzlichen Gateway Kassette (Leseraster A) zur sequenzspezifischen Rekombination. Dieser Gateway-Destination-Vektor wurde mit den pEntry Vektoren pEntry-Gus, pEntry-GusT, pEntry-GusTW, pEntry-TGusT und pEntry-TWGusTW (Kapitel 2.1.5.5) in einer LR-Reaktion rekombiniert, so dass die Vektoren pLX-Gus, pLX-GusT, pLX-GusTW, pLX-TGusT und pLX-TWGusTW entstanden.

2.1.6 Lösungen und Kulturmedien

Lösungen wurden nach Sambrook et al. (Sambrook et al. 1981) bzw. laut Herstellerangaben mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Millipore) hergestellt. Lösungen und Medien wurden bei 125°C für 20 Minuten autoklaviert. Instabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.1.6.1 Bakterienmedien

2.1.6.1.1 LB-Medium

10 g/l		Trypton
5 g/l		Hefe Extrakt
10 g/l		NaCl
15 g/l		Agar
pH:	7.5	mit NaOH

2.1.6.1.2 dYT-Medium

16 g/l		Trypton
10 g/l		Hefe Extrakt
5 g/l		NaCl
15 g/l		Agar
pH:	7.0	mit NaOH

2.1.6.1.3 Agrobakterium Medium (YEB-Medium)

5 g/l		Rinderextrakt
1 g/l		Hefeextrakt
5 g/l		Peptone
5 g/l		Saccharose
0,49 g/l		MgSO ₄
pH:	7.2	(mit NaOH)
15 g/l		Agar

2.1.6.2 Hefemedien

2.1.6.2.1 Hefe Vollmedium (YPAD)

20 g/l		Pepton
10 g/l		Hefe Extrakt
100 mg/l		Adenin (Sigma A-9126)
18 g/l		Agar (Merk)
pH:	5.8	(mit HCl)

nach dem Autoklavieren pro Liter noch 50 ml 40% Glucose zugeben.

2.1.6.2.2 SD-Medien (LW- und LWH-Medium)

6.7 g/l	Yeast Nitrogen Base (Difco 0919-07)
630 mg/l	DO Supplement (Clontech 8610-1)
100 mg/l	Adenin (Sigma A-9126)
18 g/l	Agar (Merk)
pH:	5.8 mit NaOH
für LW-Medium:	20 mg/l Histidin (Sigma H-9511)
für LWH-Medium:	3 ml/l 3 mM 3-AT nach dem Autoklavieren zugeben
für beide Medien:	50 ml/l 40% Glucose nach dem Autoklavieren zugeben

2.1.6.3 Pflanzenmedien

2.1.6.3.1 MS-Medium (Murashige et al. 1962)

4.3 g/l	MS-Salze (Sigma M-5519)
30 g/l	Saccharose
8 g/l	Agar
pH:	5,8 (mit KOH einstellen)

2.1.6.3.2 Sproßinduktionsmedium

Das Sproßinduktionsmedium basiert auf dem MS-Medium. Zusätzlich wurden 500 mg/l Claforan (Duchefa) sowie 100 mg/l Kanamycin zugegeben. Für die Sproßinduktion von *N. tabacum* var. Samsun wurden 0,5 mg/l 6-BAP und 0,1 mg/l NAA zum Medium gegeben. Für *N. benthamiana* wurden diese Phytohormone bzw. Analoga durch 1 mg/l 6-BAP und 1 mg/l 3-IBA ersetzt.

2.1.6.3.3 Wurzelinduktionsmedium

Das Wurzelinduktionsmedium basiert auf dem MS-Medium. Zusätzlich wurden 250 mg/l Claforan sowie 100 mg/l Kanamycin zugegeben. Für die Wurzelinduktion von *N. tabacum* var. Samsun wurde auf die Gabe von Phytohormonen verzichtet. Für *N. benthamiana* wurde 0,05 mg 6-BAP verwendet und die Kanamycin-Konzentration auf 25 mg/l reduziert.

2.2 Methoden

2.2.1 Nukleinsäuren

DNA Isolierungen aus Bakterien wurden mittels des Säulensystems von Qiagen vorgenommen. PCR Fragmente und Fragmente aus Agarose-Blöckchen wurden mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ von Roche aufgereinigt. RNA-Isolierung aus Pflanzengewebe wurde mit dem Trizol Reagenz von Gibco BRL nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Rekombinante DNA-Techniken wie Restriktionen, Dephosphorylierungen und Ligationen wurden nach Protokollen der jeweiligen Enzym Lieferanten vorgenommen. Gleiches gilt für die Klonierungen mittels des Gateway™ Systems (Invitrogen) und den Topoisomerase Klonierungen mittels des „pCRII-Blunt Topo“ Systems (Invitrogen). Reverse Transkriptionen wurden mit der Omniscript™ Reversen Transkriptase nach Anleitung des Herstellers (Quiagen) durchgeführt.

2.2.1.1 Sequenzanalysen

Sequenzierungen wurden von der MPIZ DNA Servicegruppe (ADIS) durchgeführt. Hierzu wurden die Sequenzierer Abi Prism 377 und 3700 von Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die Reagenzien entstammen dem „BigDye-terminator™“ System des gleichen Herstellers. Dieses verwendete Sequenziersystem beruht auf der Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977).

2.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR Reaktionen wurden mit zwei unterschiedlichen Enzymen durchgeführt. Für diagnostische Zwecke wurde die *Taq*-Polymerase von Invitrogen verwendet. Für Klonierungen und Sequenzierungen wurde die *Pwo*-Polymerase von Roche verwendet. PCR Reaktionen wurden im 100 µl Maßstab mittels einer HYBAID OmniGene PCR Maschine (MWG-Biotech) mit folgendem Programm durchgeführt: 15 Minuten 94°C, danach 30 Zyklen (15 Sekunden 55°C, 1 Minute 72°C, 15 Sekunden 94°C) hiernach wurden bei 55°C 15 Sekunden lang inkubiert und anschließend nochmals 5 Minuten bei 72°C. Die Inkubationen, die hier beispielhaft bei 55°C angeführt sind, wurden für die jeweilige Anlagerungstemperatur der verwendeten Oligonukleotide optimiert. Für PCR Fragmente mit einer Länge über 1 kb bis 2 kb wurde die Inkubation bei 72°C um 30 Sekunden verlängert. Für PCR Fragmente unter 0,5 kb wurde die Inkubation um 30 Sekunden verkürzt.

2.2.1.3 *Erstellung einer Protein spezifischen Peptid Bibliothek durch DNase I Verdau*

Um eine zufällige Fragmentierung der TSWV N-Protein Sequenz zu erreichen, wurde ein PCR-Fragment der N-Protein Sequenz mit DNase I (Roche) geschnitten. Hierzu wurden 2 µg des PCR Produktes (gereinigt durch eine Ethanol-Fällung) in 50 mM Tris/HCL pH 7.5 sowie 10 mM MnCl₂ und 50 µg/ml BSA in einem 100 µl Volumen mit 0,2 U DNase I geschnitten. Dies geschah in mehreren Ansätzen, die nach 3, 4 und 5 Minuten Inkubation bei RT mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ von Roche aufgereinigt wurden, welches die Reaktion stoppte und Fragmente entfernte, die kleiner als 100 bp waren. Anschließend wurden die Fragmente mit dem „pCRII-Blunt Topo“ System (Invitrogen) über eine Topoisomerase Reaktion kloniert und auf LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin plattiert. Die so erhaltenen Kolonien wurden von den Platten abgewaschen und für eine Plasmid Isolation verwendet. Die klonierten DNA Fragmente wurden über einen Restriktionsverdau mit *Eco* RI aus dem Plasmid (pCRII-Blunt) geschnitten und in einen ebenfalls *Eco* RI geschnittenen und dephosphorylierten pACT2-1 Vektor kloniert. Die so erhaltenen Kolonien wurden erneut von den Platten abgewaschen und für eine Plasmid Isolierung verwendet. Vorher wurden einige Kolonien in 5 ml dYT-Medium angeimpft. Die anschließend isolierten Plasmide wurden erneut mit *Eco* RI geschnitten um die Größen der klonierten Fragmente zu überprüfen.

2.2.2 Protein

2.2.2.1 *Quantifizierung von Proteinlösungen*

Proteinlösungen wurden mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad 500-0006) laut Herstellerangaben im 1 ml Maßstab durchgeführt. Als Protein-Standard wurde Bovines Serum Albumin (BSA) verwendet.

2.2.2.2 *Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue*

PAA-Gele und Polyvinylpyrrolidon (PVDF) Membranen wurden mindestens 30 Minuten oder über Nacht in Coomassie Brilliant Blue R-250 Lösung gefärbt. Anschließend wurden sie mit Entfärbelösung entfärbt und hiernach bei Raumtemperatur getrocknet. Die Entfärbelösung (1 Liter) wurde aus 450 ml Ethanol, 100 ml Essigsäure und 450 ml Wasser gemischt. Für die Färbelösung wurde noch 0,15% Coomassie brilliant Blue R-250 zugefügt und anschließend filtriert.

2.2.2.3 PAA-Gelelektrophorese (denaturierend und nativ)

Denaturierende Gelelektrophoresen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt (Laemmli 1970). Die Elektrophorese wurde mit dem XCell Sure Lock™ Mini Cell System (Novex) bei 130 V und 30 mA durchgeführt.

Für Gelelektrophoresen unter nativen Bedingungen wurde weder im Gel noch im Laufpuffer SDS verwendet. Alle anderen Bedingungen blieben gleich.

2.2.2.4 Immunodetektion von Proteinen auf Membranen

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen wurden diese unter denaturierenden Bedingungen in PAA-Gelen aufgetrennt (Kapitel 2.2.2.3). Anschließend wurden sie mit dem XCell II™ Blot Modul (Novex) auf PVDF Membranen (Immobilon™-P von Millipore) transferiert. Hiernach wurden unspezifische Bindestellen mit Blockingpuffer (2,5% Magermilchpulver in TBS 137) abgesättigt. Anschließend wurde die Membran 5 Minuten in TBS 137 gewaschen und dann eine Stunde lang mit dem TSWV spezifischen Antikörper (DSMZ TSWV AS-0580 Raw Antiserum) inkubiert. Der Antikörper wurde 1:1000 in Blocking-Puffer verdünnt. Hiernach wurde je viermal für mindestens fünf Minuten mit TBS 137 gewaschen und danach mit dem HRP gekoppelten Antikörper (Anti-Rabbit) aus dem ECL™ Western Blotting Analysis System (RPN2108) für eine weitere Stunde inkubiert. Dieser Antikörper wurde ebenfalls 1:1000 in Blocking-Puffer verdünnt. Anschließend wurde die Membran erneut zweimal mit TBS 137 wie oben beschrieben gewaschen. Hiernach wurde nochmals zweimal mit TBS 274 gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem ECL System und dem Lumi-Imager™ von Roche. Anschließend wurde die Membran mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt und entfärbt. Um das Molekulargewicht der detektierten Proteine abschätzen zu können, wurde in mindestens einer Spur des Gels ein Molekulargewichtsmarker (MBI Fermentas #SM0441) aufgetragen.

TBS 137 und 274:

20 mM	Tris-HCL pH 7.6
137 bzw. 274 mM	NaCl

2.2.2.5 β -Glucuronidase Aktivitätstest im nativen PAA-Gel

Proteinextrakte aus Wildtyp und rekombinanten *N. benthamiana* Pflanzen wurden durch PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in eine Plastiktüte eingeschweißt und mit 12 ml Gus-Nachweispufer (Kapitel 2.2.4.6) überschichtet. Hiernach wurde das Gel bei 37°C im Dunklen über Nacht inkubiert. Danach wurde das

Gel in Coomassie Brilliant Blue R Lösung 30 Minuten lang gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung entfärbt (Kapitel 2.2.2.2). Als Positivkontrolle wurde grob gereinigte β -Glucuronidase aus *E. coli* (Sigma G-7396) mit auf das Gel aufgetragen.

2.2.2.6 β -Glucuronidase-Aktivitätstest im Mikrotiterplattenmaßstab

Dieser Test beruht auf einer publizierten Methode (Morita et al. 2001), wurde aber für den Mikrotiterplattenmaßstab abgewandelt. Für die β -Glucuronidase-Aktivitätsbestimmung wurden 2 μ l Proteinextrakt aus Pflanzen bzw. Keimlingen mit 190 μ l Reaktionspuffer in einem Mikrotiterplattengefäß vermengt. Pro Pflanzenlinie wurden vier Bestimmungen durchgeführt. Hiernach wurde die Mikrotiterplatte bei 28°C 2-3 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 24 μ l Natriumcarbonat (1 M) abgestoppt. Die Absorption des farbigen Reaktionsproduktes wurde in einem MR4000 ELISA Reader (Dynatech) bei 410nm gemessen. Die erhaltenen Werte wurden gegen den Proteingehalt der Proteinextrakte normalisiert.

2.2.2.7 Serologische Detektion von Proteinen durch DAS-ELISA

Die DAS-ELISA Technik wurde laut Angaben des Herstellers (Loewe Phytodiagnostica) durchgeführt. Verwendet wurde ein System zur Detektion von TSWV in Pflanzenextrakten (Cat. No. 075011). Als Mikrotiterplatten wurden Nunc-Immuno™ Platten mit PolySorp™ Oberfläche verwendet. Diese Platten wurden mit einem Anti-TSWV-Antikörper beschichtet. Hierzu wurde 200 μ l pro Mikrotiterplattengefäß einer 1:500 Verdünnung des mitgelieferten Antikörpers in Beschichtungspuffer vier Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend viermal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden 200 μ l des Proteinextraktes pro Mikrotiterplattengefäß eingefüllt. Pro Pflanze wurden vier Mikrotiterplattengefäße verwendet. Die so befüllte Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde sie fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und mit 200 μ l einer 1:500 Verdünnung, des Anti-TSWV-Antikörpers mit gekoppelter Meerrettich Peroxidase in Probenpuffer, befüllt. Die Platte wurde erneut vier Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend fünfmal mit Wasch-Puffer gewaschen. Hiernach wurde die Nachweisreaktion durchgeführt indem je 200 μ l Substratlösung pro Mikrotiterplattengefäß abgefüllt wurden. Die Platte wurde nun je nach Schnelligkeit der einsetzenden Reaktion 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 410nm in einem MR4000 ELISA Reader (Dynatech) bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden mit dem Proteingehalt der Proteinextrakte normalisiert.

Beschichtungspuffer:	1,59 g/l	Na_2CO_3
	2,93 g/l	NaHCO_3
pH:	9,6	

Waschpuffer:	8,0 g/l	NaCl
	2,9 g/l	Na ₂ HPO ₄
	0,2 g/l	KH ₂ PO ₄
	0,2 g/l	KCl
	0,5 ml/l	Tween 20
	pH:	7,3
Probenpuffer:	20 g/l	Polyvenylpyrrolidon
	2 g/l	Bovines-Serum-Albumin
	0,1g/l	NaN ₃
	in 1 Liter Wasch-Puffer lösen	
Substratpuffer:	97 ml/l	Diethanolamin
	0,2 g/l	MgCl ₂
	pH:	9,8
1 mg/l 4-Nitrophenyl-Phosphat-di-Na-Salz vor Verwendung zugeben		

2.2.3 Hefen

2.2.3.1 Kultivierung von Hefen

Die Hefestämme wurden bei 4°C auf YPAD Platten gelagert und in regelmäßigen Abständen (vier Wochen) erneut ausgestrichen und drei Tage bei 30°C inkubiert bevor sie wieder bei 4°C gelagert wurden. Flüssigkulturen wurden über Nacht oder über zwei Tage angezogen indem sie bei 30°C und 220 rpm geschüttelt wurden.

2.2.3.2 Hefe-Doppeltransformation:

Die Hefe-Doppeltransformationen beruht auf einer publizierten Methode (Gietz et al. 1995), wurde aber in einer modifizierten Form durchgeführt. Hierzu wurde der jeweils verwendete Hefestamm in flüssigem YPAD Medium über Nacht bei 30°C und 220 rpm angezogen. Von dieser Kultur wurde 1 ml in 50 ml YPAD überimpft und unter den oben genannten Bedingungen ca. 3,5 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 5000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 50 ml sterilem Wasser resuspendiert und erneut wie oben abzentrifugiert. Die Hefezellen wurden danach in 0,1M LiAc pH 7.5 aufgenommen. Das Volumen richtete sich hierbei nach der Anzahl der geplanten Transformationen, wobei für jede Transformationen 50 µl Zellen vorgesehen wurden. Pro 50 ml Kultur wurden maximal zehn Transformationen

durchgeführt. Die 50 µl Hefezellen wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und mit 240 µl 50% Polyethylenglycol (MW 3350) überschichtet. Anschließend wurden noch 36 µl 1,0 M LiAc pH 7.5 sowie 48 µl H₂O mit je 1 µg der jeweils verwendeten pACT2-1 und pAS2-1 Plasmid Derivate zugegeben. Das Gemisch wurde durch Pipettieren homogenisiert und anschließend 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Der folgende Hitzeschock wurde bei 42°C 25 Minuten lang durchgeführt. Hiernach wurden die Zellen abzentrifugiert und in 200 µl sterilem H₂O aufgenommen. Von diesen 200 µl wurden 170 µl auf Selektionsplatten für die Proteininteraktion (LWH-Medium) und 30 µl auf Selektionsplatten für doppelt transformierte Zellen (LW-Medium) als Transformations-Kontrollplatte ausplattiert. Anschließend wurden die Platten bei 30°C für 3 bis 5 Tage inkubiert und anschließend auf gewachsene Kolonien kontrolliert.

2.2.3.3 Erstellung einer Interaktionsmatrix

Doppelt transformierte Hefezellen wurden nach der erfolgten 3 bis 5 tägigen Inkubation bei 30°C (Kapitel 2.2.3.2) mit einer Impföse in eine Mikrotiterplatte überimpft, die mit je 100 µl H₂O pro Mikrotiterplattengefäß versehen war. Nachdem dies für alle Interaktionen der Interaktionsmatrix erfolgt war, wurden alle Zellsuspensionen mittels eines 96 Replikators „pin tool“ auf LWH- und LW-Medium überimpft. Die Platten wurden nun erneut für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend auf Koloniewachstum überprüft.

2.2.3.4 β-Galactosidase Filtertest

Inkubationsplatten mit Hefekolonien wurden mit einem passend zugeschnittenen Filter (Hybond™-N⁺ von Amersham) bedeckt. Anschließend wurde der Filter abgehoben und mit den anhaftenden Hefezellen in flüssigen Stickstoff eingefroren und danach wieder bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Filter wurde nun mit den jetzt teilweise geöffneten Zellen auf zwei Lagen Gel Blotting Papier (GB002 von Schleicher & Schuell) in eine Petrischale gelegt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich die Zellen auf der Oberseite befanden und der Filter blasenfrei aufgelegt wurde. Das Blotting Papier wurde vorher mit 2 ml LacZ-Nachweislösung pro Petrischale angefeuchtet. Die Petrischale wurde zugedeckt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Filter im Abzug getrocknet.

LacZ Nachweislösung (wurde jedes Mal frisch angesetzt):
pro 10 ml Z-Puffer: 35 µl β-Mercaptoethanol und 500 µl X-Gal (2% in DMF)

Z-Puffer:	10,7 g/l	Na ₂ HPO ₄
	5,5 g/l	NaH ₂ PO ₄
	0,75 g/l	KCl
	0,24 g/l	MgCl ₂
pH:	7.0	

2.2.3.5 Plasmid Isolierung aus Hefe

Hefekolonien wurden in 5 ml LWH-Medium über ein bis zwei Tage bei 30°C und 100 rpm angezogen. Hiernach wurden die Zellen abzentrifugiert und in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß mit 0,4 g kleinen Glasperlen mit 425-699 µm Durchmesser (Sigma G-8772) in 250 µl Resuspensionspuffer (50mM Tris/HCl pH 8,0; 10mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) aus dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Quiagen) 5 Minuten lang auf dem Vortex aufgeschlossen. Anschließend wurde wie nach Herstellerangabe verfahren, wobei aber die Inkubation mit Lysis-Puffer (200 mM NaOH / 1% SDS) auf 2 Minuten erhöht wurde. Nach Bindung der Plasmid DNA an die vom Hersteller gelieferte Minisäule und den empfohlenen Waschschritten wurde die Plasmid-DNA mit 100 µl H₂O eluiert und im Speed Vac auf 10 µl eingeeengt. Diese 10 µl wurden in kompetente DH5α Zellen transformiert. Die Methode ist stark abgewandelt worden, beruht aber auf einer Veröffentlichung (Liang et al. 1992).

2.2.3.6 Quantifizierung der β-Galaktosidaseaktivität im Hefe-Zwei-Hybrid-System (ONPG-Test)

Doppelt transformierte Hefezellen des Stammes Y190 wurden in 5 ml Flüssigkultur (LWH- bzw. LW-Medium) angeimpft und 2 Tage bei 30°C und 100 rpm inkubiert. Hiernach wurde die Zellzahl mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt. Aliquots von 10⁷ Zellen wurden in je ein Mikrotiterplattengefäß abgefüllt und abzentrifugiert. Für jede Proteininteraktion wurden 4 Mikrotiterplattengefäße verwendet. Die Zellen wurden anschließend in 148 µl Z-Puffer (Kapitel 2.2.3.4) und 0,4 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert. Anschließend wurden noch je 9,2 µl 0,1% SDS und 9,2 µl CHCl₃ zugegeben. Die Platten wurden verschlossen und 10 Minuten auf einem Tischinkubator geschüttelt. Hiernach wurde in jeden Ansatz 30 µl O-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid (ONPG) Lösung mit 4 mg/ml zugegeben. Nun wurde die Platte bei 28°C für 120 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion mit 75 µl 1M NaCO₃ abgestoppt. Nachdem Zellreste abzentrifugiert worden waren, konnten 135 µl des Überstandes in einer neuen Mikrotiterplatte gemessen werden. Dies geschah bei 410 nm in einem MR4000 ELISA Reader (Dynatech). Die Messwerte wurden entsprechend der Formel $y = 10^3 \times (A_{410}/120)$ in ONPG Einheiten umgerechnet.

2.2.4 Pflanzen- und Gewebekultur

2.2.4.1 Oberflächen-Sterilisation von Tabaksamen

Samen *Nicotiana tabacum* var. Samsun und *Nicotiana benthamiana* wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße gefüllt und mit einer Sterilisationslösung überschichtet. Diese besteht aus einer gesättigten $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ Lösung d.h. 50 g/l mit 100 ml/l 20% Triton X100. Anschließend wurde 10 Minuten inkubiert und danach dreimal mit sterilem H_2O gewaschen. Hiernach wurden die Samen auf festem MS-Medium verteilt.

2.2.4.2 Axenische Kultur von *N. tabacum* und *N. benthamiana*

Samen von Wildtyp Pflanzen beider Arten wurden wie beschrieben sterilisiert (Kapitel 2.2.4.1), auf festem MS-Medium ausgelegt und bei 16 Stunden Licht und 26°C in Gewekulturschränken inkubiert. Gekeimte Pflanzen wurden in Weckgläser mit festem MS-Medium überführt und erneut inkubiert. Sobald die wachsenden Pflanzen zu groß für die Gläser waren wurden Sproßstücke mit ein oder zwei Blättern unter sterilen Bedingungen isoliert und auf frisches Medium gesetzt. Das Pflanzenwachstum wurde über den Saccharosegehalt des Mediums beeinflusst. Für eine Langzeitkultur wurde MS-Medium mit 10 g/l Saccharose verwendet. Für schneller wachsende Pflanzen wurde die Saccharose Konzentration auf die sonst üblichen 30 g/l erhöht.

2.2.4.3 Keimtest

Samen transgener Pflanzen wurden oberflächensterilisiert (Kapitel 2.2.4.1). Hiernach wurden 36 Samen je Mutterpflanze auf festes MS-Medium mit 100 mg/l Kanamycin ausgelegt und wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben inkubiert. Nach 14 Tagen wurde die Wurzellänge der Keimlinge bonitiert. Hierfür wurden Keimlinge des jeweiligen Wildtyps als Kontrolle herangezogen. Diese entwickelten auf 100 µg/ml Kanamycin enthaltenden MS-Medium keine oder nur eine kleine Wurzel. Keimlinge mit normal entwickelten Wurzeln wurden als Kanamycin resistent eingestuft.

2.2.4.4 Agrobakteriumtransformation

Die Bakterien wurden in einer 20 ml Kultur (YEB-Medium mit 100 µg/ml Rifampicin und 2 mM MgSO_4) 2 Tage bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Hiervon wurden 4 ml in 100 ml des gleichen Mediums überimpft und anschließend 3,5 Stunden unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 5000 rpm und 4°C in einem Sorval GSA Rotor abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml des oben genannten

Mediums resuspendiert und in 200 µl Aliquots in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden nun bis zur eigentlichen Transformation bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurde pro Ansatz ein Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µg DNA vermischt. Hiernach wurden die Zellen sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 1 ml des obigen Mediums versehen und 2 Stunden bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und auf YEB-Medium mit 100 µg/ml Rifampicin und 5 µg/ml Tetracyclin (als Selektion für das Plasmid pLX222 bzw. dessen Derivate) ausplattiert. Anschließend wurden die Platten für weitere 2-3 Tage bei 28°C inkubiert und auf wachsende Kolonien kontrolliert.

2.2.4.5 *Blattscheibentransformation*

Für die Blattscheibentransformation wurden 20 ml einer Agrobakterien Kultur mit dem jeweiligem pLX222 Plasmid in YEB-Medium mit 100 µg/ml Rifampicin und 5 µg/ml Tetracyclin über Nacht bei 28°C und 220 rpm angezogen. Hiernach wurden die Zellen bei 5000 rpm für 10 Minuten in einem Sorval GSA Rotor abzentrifugiert und in 15 ml flüssigem MS-Medium aufgenommen (Kapitel 2.2.4.2). Aus der Gewebekultur wurden Blattstücke der jeweils zu transformierenden *Nicotiana* Spezies unter sterilen Bedingungen in ca. 1cm^2 große Stücke geschnitten und mit den Agrobakterien in einer Petrischale ca. 1 Minute lang inkubiert. Hiernach wurden die Blattstücke vorsichtig entnommen und mit der Blattunterseite nach oben auf festes MS-Medium gelegt. Die Petrischalen mit den Blattstücken wurden mit Parafilm verschlossen und in Gewebekulturschränken bei 26°C und 16 Stunden Licht inkubiert. Nach 2 bis 3 Tagen wurden sie auf Sproßinduktionsmedium der jeweiligen *Nicotiana* Spezies überführt. Alle 14 Tage wurden die Blätter auf frisches Medium gesetzt. Sprosse, die sich entwickelten wurden mit einem Skalpell von den Blattstücken abgetrennt und in kleine Weckgläser mit Wurzelinduktionsmedium gesetzt. Hiernach wurden sie solange unter den oben genannten Bedingungen inkubiert, bis sie Wurzeln entwickelt hatten. Anschließend wurden die regenerierten Pflanzen im Gewächshaus getopft.

2.2.4.6 *Histologischer Gus Assay*

Keimlinge bzw. junge Pflanzen wurden in einer kleinen Petrischale mit Gus Nachweispufer überschichtet und in einem Exsikkator unter Vakuum gesetzt. Anschließend wurde der Druck normalisiert, wodurch der Puffer in die Interzellularen des Pflanzengewebes eintrat. Diese Prozedur wurde solange wiederholt, bis die Blätter eine dunkle, grüne Farbe angenommen hatten. Anschließend wurden die Blätter in Puffer bei 37°C im Dunklen über Nacht inkubiert. Um die Färbung besser erkennen zu können,

wurde der Chlorophyll-Hintergrund entfärbt. Dies geschah durch mehrmalige Waschungen mit 70% Ethanol, bei Raumtemperatur über mehrere Tage hinweg.

Gus Nachweispuﬀer (wurde jedes Mal frisch angesetzt):

pro 10 ml Gus Puffer: 50µl X-Gluc (10% in DMF)

Gus Puffer:	100 mM	NaPi
	10 mM	EDTA
	0,05%	Triton X-100

2.2.5 Arbeiten mit Tospoviren

2.2.5.1 Viren Erhaltung

Die Viren wurden alle vier Wochen vermehrt. Hierzu wurden ebenso alte *N. benthamiana* Pflanzen auf dem dritten und vierten Blatt mit Carborundum bestäubt und mit einem Tropfen Virus-Inoculum versehen. Das Virus-Inoculum wurde hergestellt indem infiziertes Blattmaterial in einem 1:5 (w/v) Verhältnis mit Virus-Inokulations-Puffer (0,1 M $\text{Na}_2/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.0, 2% PEG 10000, 0.2% Na_3SO_3) zerrieben wurde. Anschließend wurde das Virus-Inoculum leicht in das Blatt eingerieben und nach fünf Minuten mit Wasser abgespült.

2.2.5.2 Virus Resistenztest

Wildtyp und transgene Pflanzen wurden in sandhaltiger Blumenerde ausgesät und nach 14 Tagen in Einzeltöpfe pikiert. Diese Pflanzen wurden im Drei- bis Vierblattstadium mit Virus infiziert, wobei das dritte und vierte Blatt mit Carborundum bestäubt und mit je 50 µl Virus-Inoculum (Kapitel 2.2.5.1) versehen wurde. Das Virus wurde ins Blatt eingerieben und nach fünf Minuten mit Wasser abgespült. Nach jeweils zwölf Testpflanzen wurde eine Wildtyp Pflanze infiziert um so das Inoculum auf Virulenz zu überprüfen. Die infizierten Pflanzen wurden nach 7, 10, 14, 17 und 21 Tagen nach Infektion bonitiert (GusT Linien wurden auch nach 23 Tagen bonitiert), d.h. die Blätter wurden auf Krankheitssymptome untersucht und die Pflanzenhöhe von der Erde bis zur Sproßspitze mit einem Maßband gemessen.

2.3 Computer-Software und Datenbanken

Zur Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden verwendet: Clone Manager 5 von Scientific & Educational Software; BioEdit von Tom Hall (Hall 1999), Adobe Photoshop 6.0, EndNote 4.0, Microsoft Office 2000.

Weiterhin wurden die Internetdienste ClustalW (Higgins et al. 1994) und WU-Blast3 (Altschul et al. 1997) sowie JalView des European Bioinformatics Institut (EBI) verwendet. Literatur und Sequenzdaten-Recherche wurden mittels der Internetdienste am National Center for Biotechnology Information (NCBI) durchgeführt. Weiterhin wurde zur Literatur-Recherche der Internetdienst „ISI Web of Knowledge“ verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Ausgangssituation

In der Arbeitsgruppe Schreier wurde eine Tospoviren Resistenz beobachtet, die ein sehr hohes Resistenzniveau gegen mindestens drei unterschiedliche Tospovirenspezies in *N. tabacum* var. Samsun vermitteln kann (Schreier et al. 1994, 1996). Die resistenten Pflanzen enthalten ein chimäres Gen, das zur Expression eines modifizierten TSWV N-Proteins führt. Die Modifikation besteht aus einer 23 Aminosäure langen Peptidaddition am N-Terminus des N-Proteins. Diese geht auf die Verwendung eines Startcodons zurück, welches alternativ zum Startcodon des TSWV N-Protein Leserasters verwendet wird. Zusätzlich enthält das chimäre Gen eine Sequenz aus dem Plum pox potyvirus Genom von dem vermutet wurde, dass es als translationaler Verstärker wirkt. Im Gegensatz hierzu erwies sich eine Pflanzenlinie als stark anfällig, die ein TSWV N-Protein ohne Peptidaddition exprimiert und das Element aus dem Plum pox potyvirus Genom nicht enthielt (Linie X 15.1). Aus diesem Grunde sollte untersucht werden, ob die beobachtete Resistenz auf Unterschiede in den verwendeten Konstrukten oder der exprimierten Proteine zurückgeht. Hinweise für einen Protein vermittelten Mechanismus hatten sich aus der Beobachtung ergeben, dass heterozygote Nachkommen zweier homozygoten und hoch resistenten Pflanzenlinien (XL 8.28 und XL 4.24) nur ca. die halbe Menge rekombinantes Protein exprimierten und in Resistenztests keine oder nur eine schwache Resistenz zeigten.

Als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen wurden von der Arbeitsgruppe Schreier drei verschiedene DNA-Konstrukte übernommen. Diese Konstrukte waren in den Plasmiden Nr. 305, 313 und 314 enthalten (Tabelle 2.1) und unterschieden sich nur geringfügig von dem Resistenz erzeugenden Konstrukt. Eine schematische Darstellung der Konstrukte und der hiervon exprimierbaren Proteine findet sich in Abbildung 3.1. Alle enthalten weiterhin den CaMV 35S Promotor, die Sequenz des translationalen Verstärkers aus Plum pox potyvirus, die Sequenz des TSWV N-Proteins und die Nopalinsynthase-Terminator Sequenz. In einem Konstrukt wurde das alternative Startcodon eliminiert, so daß ein TSWV N-Protein ohne die oben angesprochene Peptidaddition exprimiert werden sollte. Aufgrund des mutierten Startcodons wurde das Konstrukt M_1 genannt. Das zweite Konstrukt (M_2) ist für die Expression des TSWV N-Proteins mit Peptidaddition vorgesehen. Im letzten Konstrukt (Art) wurde die Sequenz verändert um eine N-terminale Peptidaddition mit einer zufällig gewählten Aminosäuresequenz zu exprimieren.

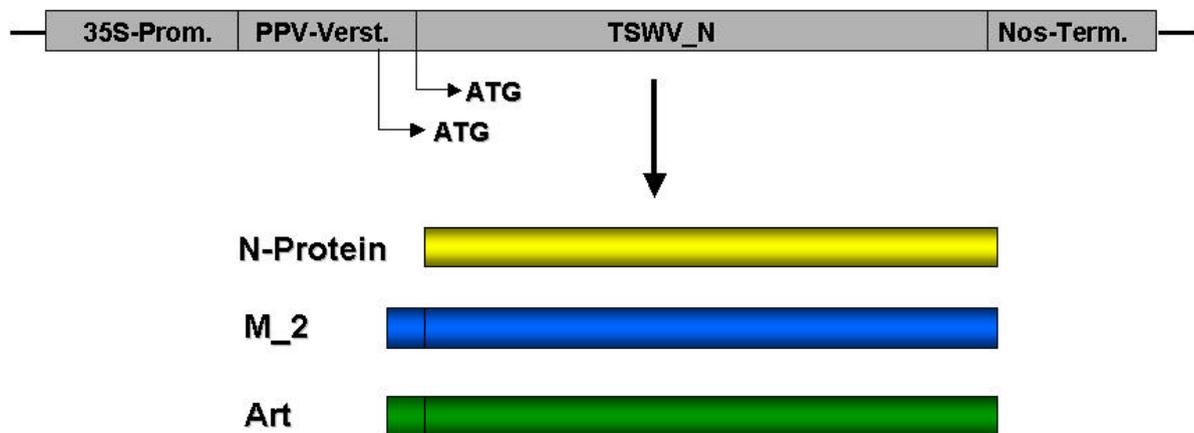


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der übernommenen Konstrukte

Im unteren Teil sind die N-Protein Varianten dargestellt, die von verschiedenen Derivaten des oberen Konstruktes exprimiert werden können. Hierbei steht N-Protein für das Wildtyp N-Protein, M_2 für das N-Protein mit der N-terminalen Peptidfusion sowie Art für das N-Protein mit einer **artifizierten** Peptidfusion. Die Sequenz der zusätzlichen Aminosäuren am N-terminus ist: **MSRIRARYPPDPLESHITTSTI** für das M_2-Protein und **MAITPTIHISARSPYDEILRST** für das Art-Protein. 35S-Prom. steht für den CaMV 35S Promotor, PPV-Verst. für den translationalen Verstärker aus dem Plum pox potyvirus und Nos.-Term. für den Nopalinsynthase Terminator.

Aus theoretischen Überlegungen sollte eine Nucleokapsidprotein vermittelte Resistenz durch Interaktionen des rekombinanten Proteins vermittelt werden. Da aus vorherigen Experimenten bekannt war, dass das TSWV N-Protein mit sich selber interagieren kann und dass diese Interaktion über zwei Bindestellen vermittelt werden, die sich jeweils im N- und C-Terminus des Proteins befinden (Uhrig et al. 1999), sollten die Interaktion verschiedener Tospoviren N-Proteine bzw. der oben beschriebenen TSWV N-Protein Varianten im Hefe-Zwei-Hybrid-System untersucht werden.

3.2 Untersuchung verschiedener Tospoviren N-Proteine und N-Protein Varianten im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das N-Protein von TSWV zeigt im Hefe-Zwei-Hybrid-System homotypische Interaktionen (Uhrig et al. 1999). Diese Interaktionen werden von zwei Bindestellen vermittelt, die im N-terminalen und C-terminalen Bereich des N-Proteins liegen und so zu einer Kopf-an-Schwanz Verbindung mehrerer N-Proteine führt. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache wurden Interaktionsstudien im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit dem TSWV N-Protein und seinen Derivaten M₂ und Art sowie den N-Proteinen von sieben weiteren Tospovirenspezies durchgeführt. Hierdurch sollte die Frage beantwortet werden, ob TSWV N-Protein auch Interaktionen zu anderen Tospoviren N-Proteinen zeigt und ob diese Interaktionen durch eine Peptidaddition messbar beeinflusst wird. Vektoren für das Hefe-Zwei-Hybrid-System, die das TSWV N-Protein sowie das M₂-Protein als translationale Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne und der Gal4-DNA-Bindungsdomäne enthalten, waren im Labor vorhanden (Kapitel 2.1.5.1 Tabelle 2.1). Die entsprechenden Klonierungen für das Art-Protein wurde selber angefertigt. Weiterhin wurden die N-Protein Sequenzen der anderen Tospovirenspezies über RT-PCR amplifiziert und ebenfalls als Fusionen mit der Gal4-Aktivierungs- und DNA-Bindungsdomäne kloniert. Die genauen Klonierungen sind in Tabelle 2.2 angegeben. Die Vektoren wurden durch Doppeltransformation in den Hefestamm PJ69-4A transformiert. Tests auf Selbstaktivierung mit den jeweils zugehörigen leeren Vektoren pACT2-1 und pAS2-1 waren negativ. Daraufhin wurden die Plasmide in Interaktionstests eingesetzt. Anhand des Koloniewachstums auf LWH-Medium und eines β -Galaktosidase Aktivitätstests kann als Ergebnis festgehalten werden, dass Kolonien, die das TSWV N-Protein in Kombination mit den N-Proteinen von TSWV, TCSV, GRSV, CSNV und INSV exprimierten, transkriptionelle Aktivität der beiden Gal4 aktivierten Reportergene *HIS3* und *lacZ* zeigen. Dies läßt auf eine Interaktion der jeweiligen Fusionsproteine schließen. Diese Interaktion ist unabhängig davon, welches der Proteine als Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne bzw. der Gal4-DNA-Bindungsdomäne eingesetzt wurde. Die Proteine M₂ und Art zeigten gleichfalls in beiden Fusionsvarianten Interaktionen zu den N-Proteinen von TSWV, TCSV, GRSV, CSNV und INSV. Es konnten keinerlei Interaktionen des TSWV N-Proteins, bzw. seiner Varianten M₂ und Art, mit den N-Proteinen von IYSV, PSMV und WSMV festgestellt werden. Siehe hierzu auch die Abbildung 3.2. Es kann kein qualitativer Unterschied zwischen dem TSWV N-Protein und seinen Varianten M₂ und Art beobachtet werden. Alle drei Proteine zeigen eine Bindung zu den N-Proteinen von TSWV, TCSV, GRSV, CSNV und INSV, aber nicht zu den N-Proteinen von IYSV, PSMV und WSMV.

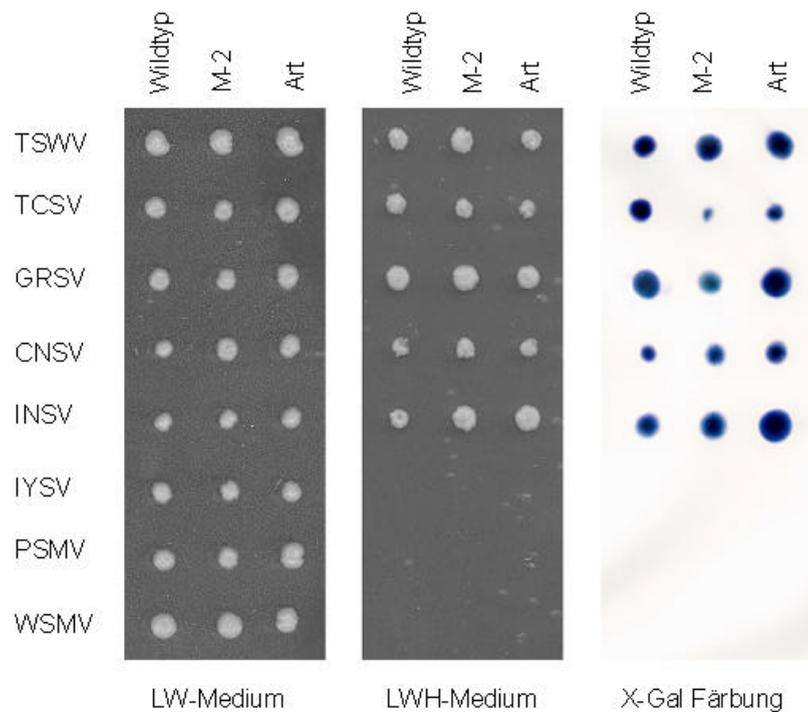


Abbildung 3.2 Interaktion von TSWV N-Protein, M_2 und Art Protein mit verschiedenen Tospovirus N-Proteinen

Die gezeigten Hefekolonien enthalten Kombinationen verschiedener N-Proteine als Fusion mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne (horizontale Reihen) und Fusionen des TSWV N-Proteins bzw. seiner Varianten M_2 und Art mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (vertikale Reihen). In der ersten Teilabbildung sieht man Kolonien auf LW-Medium, welches auf doppelt transformierte Zellen selektiert. Die mittlere Abbildung zeigt Kolonien auf LWH-Medium, welches auf Transkription des *HIS3*-Gens selektiert und den Test auf Protein-Interaktionen zeigt. Die letzte Abbildung zeigt die Verifikation der Interaktion durch die X-Gal Färbung, die die Expression des *lacZ*-Gens als zweites Reportergen der Proteininteraktion nachweist..

3.2.1 Interaktionstests mit N-Proteinen aus verschiedenen Tospoviren

Kombinationen der N-Proteine verschiedener Tospoviren wurden im Hefe-Zwei-Hybrid-System auf Interaktion getestet. Die hierfür benötigten Vektoren sind in Kapitel 2.1.5.2 beschrieben. Es wurde festgestellt, dass die N-Proteine von TSWV, TCSV, GRSV, CNSV und INSV in allen möglichen Kombinationen Interaktionen zeigen. Die N-Proteine von IYSV, PSMV und WSMV zeigen keinerlei Interaktionen mit den N-Proteinen der anderen Viren, können aber untereinander in beliebiger Kombination interagieren. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 gezeigt. Da sich die genannten N-Proteine aufgrund ihrer Interaktionen in zwei Gruppen einteilen lassen wurden diese Gruppen als Interaktionsgruppen bezeichnet.

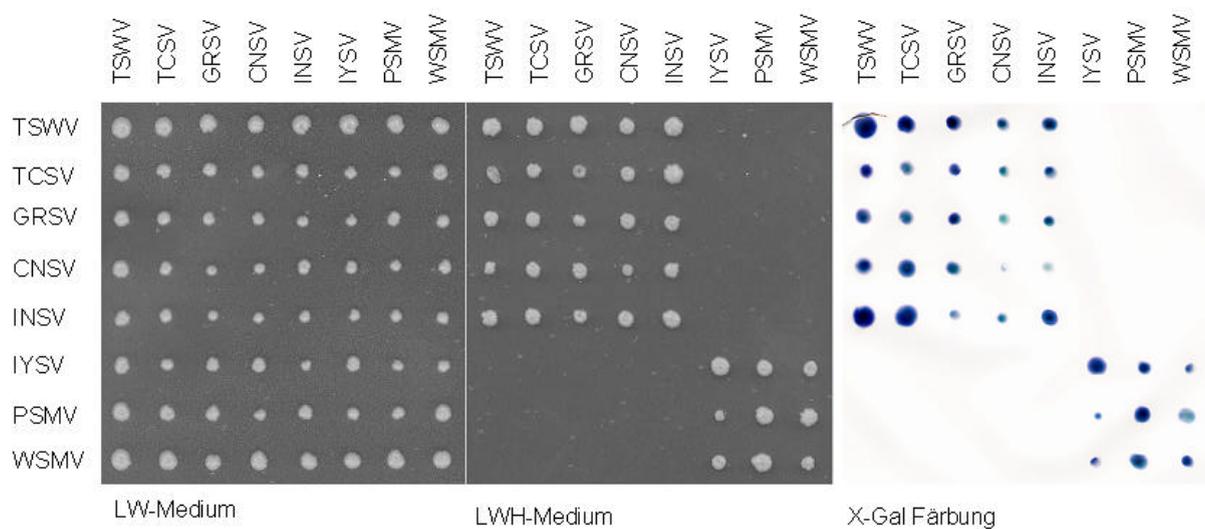


Abbildung 3.3 Interaktionsmatrix der Tospoviren N-Proteine

Die gezeigten Hefekolonien enthalten Kombinationen von N-Proteinen verschiedener Tospovirenspezies. Die Tospovirenspezies, der das jeweilige N-Protein entstammt, ist in der jeweiligen Zeile und Spalte angegeben. Die Proteinfusionen mit der DNA-Bindungsdomäne wechseln in den Spalten der Matrix. Die Fusionen mit der Gal4-Aktivierungsdomäne wechseln in den Zeilen. In der linken Teilabbildung ist die Kontrolle auf Doppeltransformation dargestellt. In der mittleren Teilabbildung ist der Test auf Protein Interaktion zu sehen, die in der rechten Teilabbildung durch eine X-Gal Färbung überprüft wird. Die auf LWH-Medium nicht gewachsenen Kolonien stellen gleichzeitig die Kontrolle auf Selbstaktivierung aller Konstrukte dar.

3.2.2 Hefe Interaktionsmatrix mit C-terminalen Deletionen

Wie von schon vorher gezeigt (Uhrig et al. 1999), geht die Interaktion des Wildtyp TSWV N-Proteins im Hefe-Zwei-Hybrid-System auf die Interaktion zweier Bindestellen pro N-Protein zurück. Für eine N-Protein Interaktion im Hefe-Zwei-Hybrid-System wäre es aber ausreichend wenn pro N-Protein nur eine Bindestellen existieren würde. Es wurde deshalb geprüft, ob in den gefundenen Interaktionsgruppen (Abbildung 3.3) beide Bindestellen existieren. Eine dieser Bindestellen wurde am C-Terminus des N-Proteins

lokalisiert und durch die C-terminale Deletionsmutante CΔ26 entfernt (Uhrig et al. 1999). Anhand eines Sequenzvergleichs der verwendeten N-Proteine wurden homologe Bereiche zu dieser Bindestelle in allen verwendeten N-Proteinen identifiziert (Abbildung 3.4) und entsprechende C-terminale Deletionen hergestellt, so daß die Proteine nur noch eine Bindestelle enthalten sollten. Die Konstruktion der entsprechenden Vektoren ist in Kapitel 2.1.5.2 beschrieben.

```

TSWV_N  GSVAMEHYSETLNKPFYEMFGVKKQAKLAELA*
TCSV_N  GSIAMEHYSEHLDFYAMFGVRKEAKIAGVA*
GRSV_N  GSIAMDYYSDNLDKPFYESVGVKKEAKIAGVA*
CSNV_N  GAIAMEHYSDSLNKFYEMFGVQKSKLIPKDLV*
INSV_N  GLAAMDHYKEGLTISIYSMFNATIDFGKNDSI*
IYSV_N  GAASLIKPFNEQIKILEGAFGK~~IVEDIGE~SSKPKTPSKKDRYN*
PSMV_N  SGI SIRKIYNEQVQFMEOAFKSSLVVDGMGESSKSKASSSRKSI EV*
WSMV_N  SSI SIRKKYEDQVKYMDRVFSANLSVDDYGDHSKKS~~~SKPSTSEV*

```

Abbildung 3.4 Sequenzvergleich C-terminaler Enden verschiedener Tospoviren N-Proteine

Die Aminosäuresequenz ist im „Ein-Buchstaben-Code“ wiedergegeben. Alle Aminosäuren, die rechts des schwarzen Balkens stehen, wurden in den C-terminalen Deletionen entfernt. Der Sequenzvergleich wurde mittels des EBI Internetdienstes ClustAll erstellt und mit dem Programm BioEdit nachbearbeitet.

Die erhaltenen Vektoren wurden durch Doppeltransformation in den Hefestamm PJ69-4A transformiert und auf LW- und LWH-Medium getestet. Die Tests ergaben, dass alle neu hergestellten C-terminalen Deletionen keine Interaktion untereinander zeigen, aber immer noch Bindungen mit den Wildtyp Proteinen eingehen können (Abbildung 3.5). Folglich konnte die C-terminalen Bindestelle soweit vorhergesagt werden, dass ihre Bindungsfähigkeit durch die jeweilige Deletion zerstört wurde. Gleichzeitig blieb die Funktion der N-terminalen Bindestelle erhalten, wie durch die Proteininteraktionen mit dem Wildtyp Protein festgestellt wurde. Damit ist die Lage der C-terminalen Bindestelle von TSWV N-Protein bis zu einer Sequenzidentität von 26% für PSMV N-Protein konserviert (Tabelle 3.1).

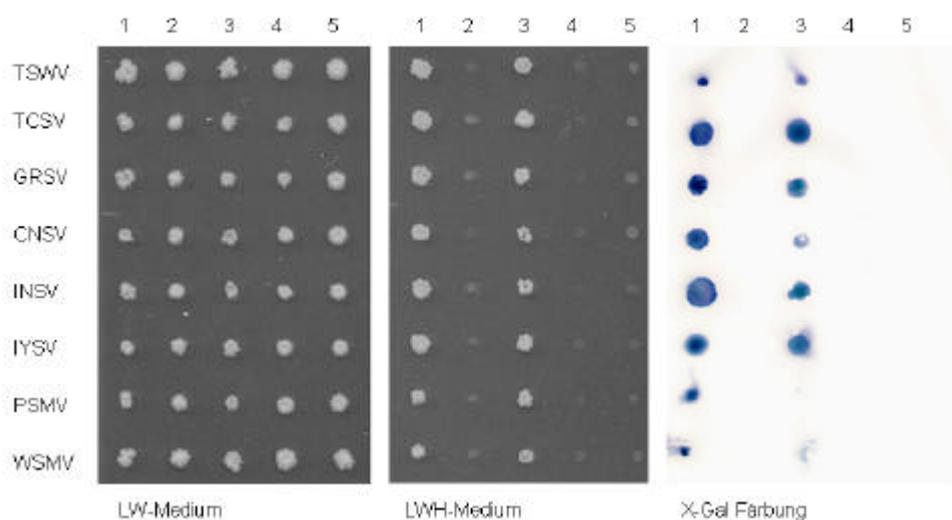


Abbildung 3.5 Test auf Proteininteraktionen C-terminaler Deletionsmutanten

In Spalte Nr. 1 befinden sich Hefekolonien, die die N-Proteine der jeweils links angegebenen Spezies als Fusion mit der Gal4-Aktivierungs- bzw. DNA-Bindedomäne exprimieren. In Spalte Nr. 2 werden die C-terminalen Deletionen des jeweils links angegebenen N-Proteins als Fusion mit der Gal4-Aktivierungs- bzw. DNA-Bindedomäne exprimiert. In Spalte Nr. 3 wird die C-terminale Fusion der links angegebenen N-Proteins als Fusion mit der Gal4-DNA-Bindedomäne in Kombination mit dem Wildtyp N-Protein der gleichen Virusspezies in der Fusion mit einer Gal4-Aktivierungsdomäne exprimiert. Die Spalten Nr. 4 und Nr. 5 zeigen den Test auf Selbstaktivierung der Wildtyp Proteine, die jeweils mit den Kontrollvektoren pAS2-1 und pACT2-1 getestet wurden. Die Spalte Nr. 2 erbringt den Nachweis fehlender Selbstaktivierung der C-terminalen Deletionen. In der ersten Teilabbildung wird das Wachstum auf LW-Medium gezeigt, welches auf doppelt transformierte Hefekolonien selektiert. Die zweite Teilabbildung zeigt Koloniewachstum auf LWH-Medium und den Test auf Proteininteraktion. In der dritten Teilabbildung wird eine XGal Färbung gezeigt, die die Expression des lacZ-Gens, als zweites Reportergen für die Proteininteraktion, nachweist.

Tabelle 3.1 Sequenzidentitätsvergleich von acht Tosspoviren N-Proteinen

Die Werte sind in Prozentpunkten angegeben und anhand eines Sequenz-Vergleichs der N-Proteine errechnet worden (verändert nach (Cortez et al. 2001)).

	TSWV	TCSV	GRSV	CNSV	INSV	IYSV	PSMV	WSMV
TSWV	100	77	78	77	55	34	26	33
TCSV		100	81	75	55	34	23	26
GRSV			100	75	54	33	29	33
CNSV				100	58	35	34	32
INSV					100	30	28	30
IYSV						100	49	44
PSMV							100	57
WSMV								100

Die C-terminalen Deletionen erlaubten es die Interaktionsgruppen genauer zu untersuchen. Folglich wurden die Deletionen auf Interaktion mit heterologen N-Proteinen getestet (Abbildung 3.6). Die Ergebnisse zeigen, dass die Interaktionsgruppe von TSWV, TCSV, GRSV, CNSV und INSV N-Protein für beide Bindestellen bestätigt werden konnte. Dies traf auch für die Interaktionsgruppe von IYSV, PSMV und WSMV N-Protein bis auf zwei Ausnahmen zu. Diese Ausnahmen betraf die Interaktion der C-terminalen Deletion des IYSV N-Proteins mit den N-Proteinen von PSMV und WSMV, obwohl die reziproke Interaktion der C-terminalen Deletionen von PSMV und WSMV N-Protein mit dem IYSV N-Protein gezeigt werden konnte. Interaktionen zwischen Proteinen unterschiedlicher Interaktionsgruppen blieben weiterhin aus.

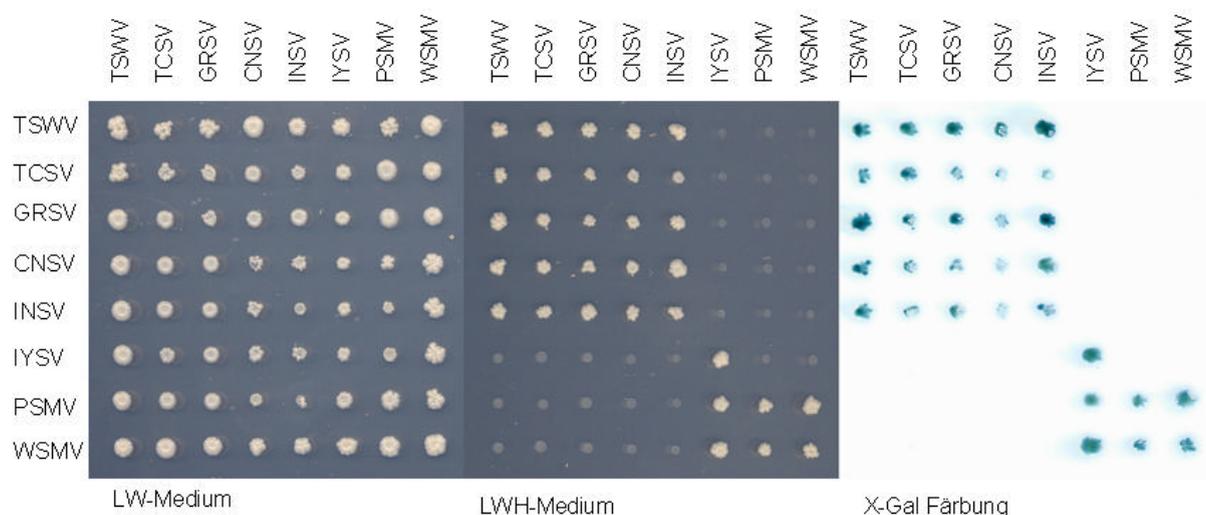


Abbildung 3.6 Interaktionsmatrix der C-terminalen Deletionen mit homologen und heterologen N-Proteinen

Hierbei wurden die C-terminalen Deletionen als DNA-Bindungsdomäne (horizontale Reihen) und die Wildtyp Proteine als Fusion mit der Aktivierungsdomäne (vertikale Reihen) getestet. In der linken Teilabbildung ist die Kontrolle auf Doppeltransformation dargestellt. In der mittleren Teilabbildung ist der Test auf Proteininteraktion zu sehen, die in der rechten Teilabbildung durch eine X-Gal Färbung überprüft wird.

Zusammenfassend kann daher festgestellt werden, dass die N-Proteine Bindungen zu N-Proteinen anderer Tospovirenspezies eingehen können. Diese Interaktionen bilden zwei Interaktionsgruppen, deren Mitglieder alle Proteine innerhalb der Interaktionsgruppe in allen möglichen Kombinationen binden können, aber keine Bindung zu Proteinen in der anderen Interaktionsgruppe zeigen. Eine Interaktionsgruppe umfasst die N-Proteine von TSWV, TCSV, GRSV, CNSV und INSV. Die andere Interaktionsgruppe umfasst die N-Proteine von IYSV, PSMV und WSMV. Gleichfalls wurde gezeigt, dass alle getesteten N-Proteine eine Bindestelle am C-Terminus des Proteins besitzen. Weiterhin konnte, bis auf zwei Ausnahmen, nachgewiesen werden, dass die oben beschriebenen Interaktionsgruppen für beide Bindestellen der N-Proteine gelten.

Ein Vergleich der Interaktionsgruppen mit einer Ähnlichkeitsanalyse aller Tospoviren N-Proteine (Abbildung 3.7) läßt die Vermutung zu, dass die Interaktionsgruppen mit zwei Verwandtschaftsgruppen der Tospoviren N-Proteine identisch sind.

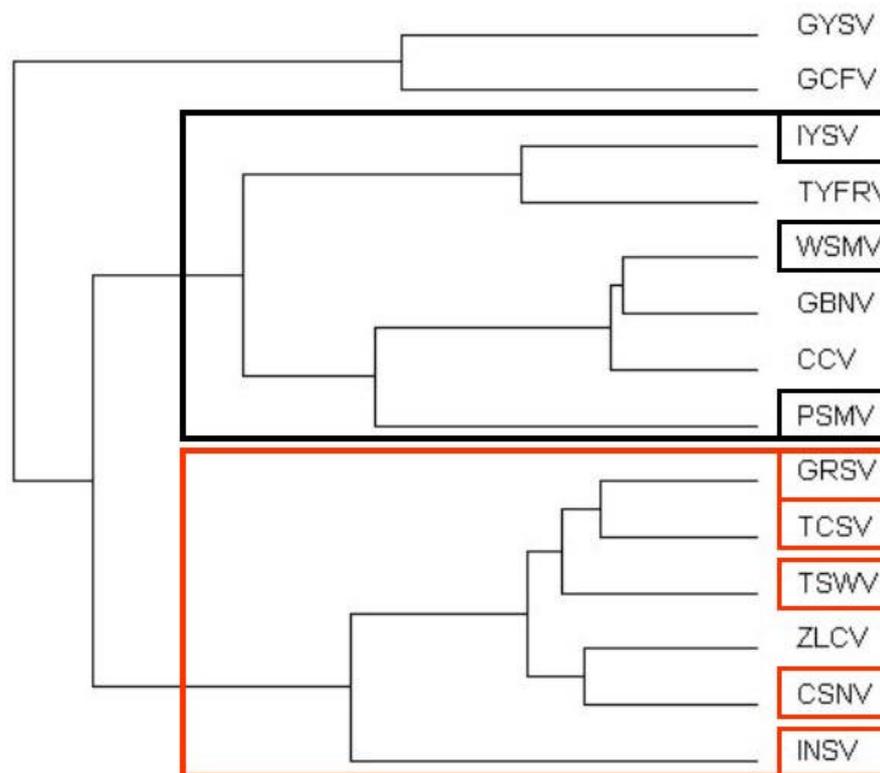


Abbildung 3.7 Phylogenetischer Stammbaum der Tospoviren N-Proteine und Einteilung in Interaktionsgruppen

Die Abbildung zeigt einen phylogenetischen Stammbaum, der aufgrund von N-Protein Sequenzähnlichkeiten aufgestellt wurde. Interaktionsgruppen sind durch große schwarze bzw. rote Kästen markiert. Die im Hefe-Zwei-Hybrid-System getesteten Proteine sind durch kleine Kästen markiert, wobei Proteine der gleichen Interaktionsgruppe gleiche Farben besitzen.

Demnach reicht die Fähigkeit zur heterologen Proteinbindung und die funktionelle Konservierung der N-Protein Bindestellen über einen weiten Verwandtschaftskreis. Dies bedeutet z.B. für das TSWV N-Protein eine funktionelle Konservierung bis zu einer Sequenzidentität von 55% für INSV N-Protein. Innerhalb der zweiten Interaktionsgruppe reicht die funktionelle Konservierung bis zu einer Sequenzidentität von 44% bei der Interaktion des WSMV N-Proteins mit dem N-Protein von IYSV (vergleiche Tabelle 3.1).

3.3 Untersuchung TSWV N-Protein exprimierender *Nicotiana tabacum* Pflanzen

Die in Kapitel 1.5 beschriebene Beobachtung einer künstlich hergestellten hohen und breiten Tospoviren-Resistenz sollte weitergehend untersucht werden. Hierbei interessierte vor allem, ob die beobachtete Peptid-Addition verantwortlich für die Resistenz ist und ob sie durch andere Aminosäuresequenzen ausgetauscht werden kann. Weiterhin war interessant, welche Virusspezies der Resistenz unterliegen. Um diese Fragen zu klären wurden transgene *Nicotiana tabacum* var. Samsun sowie *Nicotiana benthamiana* Pflanzen hergestellt, die TSWV N-Protein sowie zwei Varianten hiervon exprimieren. Die Varianten tragen je eine Aminosäure-Addition am N-terminus und stellen Derivate des ursprünglich verwendeten Konstruktes dar. Hierzu wurden von der Arbeitsgruppe Schreier drei Plasmide übernommen, die die jeweils zugehörigen offenen Leseraster in Verbindung mit einem CaMV 35S Promotor, einem translationalen Verstärker aus dem Plum pox potyvirus Genom sowie der Terminationssequenz des Nopalin Synthasegens (Nos-Terminator) trugen. Diese Konstrukte sind in der Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. Von den übernommenen Plasmiden enthielt das Plasmid Nr. 305 (Tabelle 2.1) die oben beschriebenen Elemente. In diesem Plasmid wurde das alternativ zum Startcodon des TSWV N-Proteins verwendete Startcodon eliminiert. Hierdurch sollte nur das TSWV N-Protein exprimiert werden. Im Plasmid Nr. 313 war das alternative Startcodon noch enthalten, wodurch die M_2 Variante (Abbildung 3.1) mit der 23 Aminosäuren langen Peptidaddition exprimiert werden konnte. Von Plasmid Nr. 314 sollte ein Protein mit einer zufällig gewählten Peptidfusion von 23 Aminosäuren Länge gebildet werden. Hierzu wurde die Sequenz zwischen dem Startcodon des M_2-Proteins und des TSWV N-Proteins entsprechend mutiert. Die so exprimierte Proteinvariante wurde Art (für **artifizielle** Sequenz) genannt. Die drei beschriebenen Expressionskassetten wurden als *Hin* dIII Fragmente in den Agrobakterienvektor pLX222 (Landsmann et al. 1988) eingesetzt und pLX_M_1, pLX_M_2 und pLX_Art genannt (Kapitel 2.1.5.7). Diese Vektoren konnten für Blattscheibentransformationen eingesetzt werden.

3.3.1 Test unterschiedlicher PPV-Konstrukte in *Nicotiana tabacum* var. Samsun auf Vermittlung von Tospoviren Resistenz

Blattscheiben von *Nicotiana tabacum* var. Samsun wurden mit den Konstrukten pLX_M_1, pLX_M_2 und pLX_Art transformiert. Aus den regenerierten Sprossen wurden unabhängige Transformanden (T_0 -Generation) herangezogen und mittels DAS-ELISA auf Expression der chimären Gene getestet. Exprimierende Pflanzen wurden bis zur

Samenreife herangezogen und ihre Nachkommen (T_1 -Generation) erneut mittels DAS-ELISA auf Expression der Proteine getestet. Samen dieser Pflanzen (T_2 -Generation) wurden durch einen Keimtest auf Murashige-Skoog Medium mit 100 μ g/ml Kanamycin auf Expression des cotransformierten *ntpII*-Gens getestet. Anhand dieser Ergebnisse wurden für jedes transformierte Konstrukt zwei Pflanzenlinien ausgewählt, deren T_2 -Generation vollständig gegen Kanamycin resistent war, so dass jede Pflanze mindestens eine Kopie des *ntpII*-Gens (Kanamycin Resistenzgens aus der T-DNA des pLX222 Vektors) trug und exprimierte.

Keimlinge (T_2 -Generation) dieser Pflanzenlinien wurden zusammen mit den Linien XL 8.28 sowie X 15.1 (Schreier et al. 1996) angezogen und durch DAS-ELISA auf Expression des jeweiligen Transgens getestet. Als Kontrolle diente hierbei Proteinextrakt aus Wildtyp *Nicotiana tabacum* var. Samsun Pflanzen. Als weitere Kontrollen wurden die Linien XL 8.28 und X 15.1 verwendet, wobei die Expressionsstärke der Linie X 15.1 als 100% bzw. 1 definiert wurde.

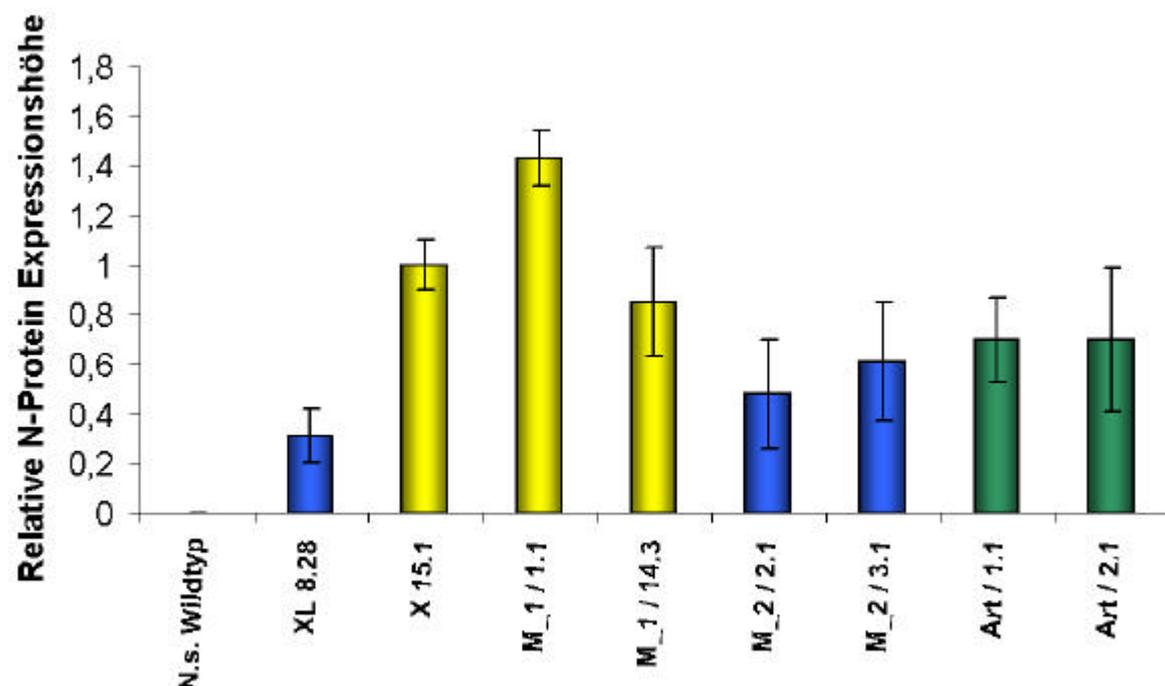


Abbildung 3.8 Expressionsstärken verschiedener *N. tabacum* var. Samsun Linien

Die Abbildung zeigt die relativen Expressionsstärken rekombinant exprimierten N-Proteins. Die Werte wurden über DAS-ELISA ermittelt, wobei der Wildtyp als Nullwert und die Expressionsstärke der Linie X 15.1 als 1 definiert wurde. Die verwendeten Proteinextrakte wurden aus Keimlingen gewonnen.

Die Menge rekombinant exprimierten Proteins liegt in den Linien M₁ / 14.3; M₂ / 2.1; M₂ / 3.1; Art / 1.1 und Art / 2.1 zwischen den Werten für die hoch exprimierende aber anfällige Linie X 15.1 und der niedrig exprimierenden aber hoch resistenten Linie XL 8.28. Die Linie M₁ / 1.1 erreicht eine Expressionsstärke, die ca. 1,4 mal so hoch ist wie

die der Linie X 15.1. Durch dieses Experiment konnte zusätzlich bestätigt werden, dass die hoch resistente Linie XL 8.28 nur ca. 30% der Proteinmenge exprimiert, die die anfällige Linie X 15.1 erreicht.

Durch Immunodetektion wurde nachgewiesen, dass von dem pLX_M_1 Konstrukt ein Protein exprimiert wird, welches das gleiche Laufverhalten wie rekombinant in *E. coli* produziertes TSWV N-Protein aufweist. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Proteine, die in der Linie XL 8.28 exprimiert werden, ein geändertes Laufverhalten zeigen, das auf ein höheres molekulares Gewicht, entsprechend der 23 Aminosäuren-Addition, schließen lässt. Die Proteine, welche von dem Konstrukt pLX_Art exprimiert werden, zeigen das Laufverhalten des TSWV N-Proteins. Damit wird in diesen Pflanzen höchst wahrscheinlich das Startcodon des TSWV N-Proteins verwendet und nicht das Startcodon, welches zu einer Peptidaddition an das N-Protein führen würde (vergleiche Abbildung 3.1).

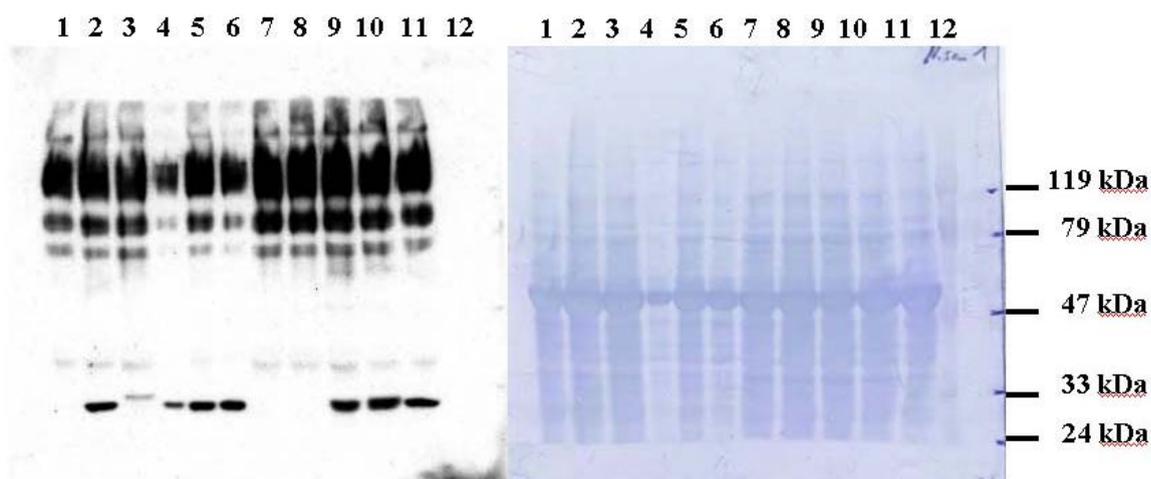


Abbildung 3.9 Immunodetektion von TSWV N-Protein in *N. tabacum* var. Samsun Pflanzen

Die Abbildung zeigt eine Immunodetektion des TSWV N-Proteins in Pflanzenextrakten. In der rechten Teilabbildung ist eine Ladungskontrolle durch unspezifische Coomassie Brilliant Blue Färbung gezeigt. In der ersten und in der zwölften Spur ist Proteinextrakt von Wildtyp Pflanzen aufgetragen. In den Spuren 2 und 11 sind die gleichen Extrakte mit 100 ng TSWV N-Protein aus *E. coli*. In der Spur 3 befindet sich Extrakt der Linie XL 8.28. In der 4. Spur Extrakt der Line X 15.1. In den Spuren 5 bis 10 befinden sich Extrakte der Linien M_1 / 1.1, M_1 / 14.3, M_2 / 2.1, M_2 / 3.1, Art / 1.1 bzw. Ar t/ 2.1 In Spur 12 befinden sich 10 µl eines Protein Molekulargewichtsmarkers. In den Spuren 4 und 6 befindet sich 20 µg Pflanzenprotein. In der Spur 5 befindet sich 40 µg und in den anderen Spuren wurde 80 µg aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-TSWV Antiserum. Anschließend wurde die Membran mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (rechts).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der quantitativen Bestimmung durch DAS-ELISA mit Extrakten aus Keimlingen (Abbildung 1.1) konnte für die Linien M_2 / 2.1 und M_2 / 3.1 keine Expression des rekombinanten Proteins nachgewiesen werden. Für die Immunodetektion wurden Blattextrakte verwendet, die aus dem dritten und vierten Blatt gewonnen wurden. Dies entspricht den Blättern, die in Resistenztests mit Virus inokuliert wurden.

Die Pflanzenlinien, die über DAS-ELISA auf Proteinexpression und durch Immunodetektion auf Expression der einzelnen Proteinvarianten überprüft worden waren, wurden in einem Resistenztest auf ihre Reaktion gegen TSWV getestet. Der Resistenztest wurde wie in Kapitel 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Da infizierte Pflanzen das Wachstum einstellen bzw. ein deutlich verlangsamtes Wachstum zeigen, wurde die ermittelte durchschnittliche Pflanzenhöhe als Maß für das Fortschreiten der Infektion angesehen. Zusätzlich wurde die Anzahl symptomatischer Pflanzen während des Versuchs bestimmt und mit der Anzahl der inokulierten Pflanzen in Relation gesetzt. Als Ergebnis dieser Tests ist festzustellen, dass der Wildtyp sich als vollständig anfällig gegen eine Infektion mit TSWV erwies und lediglich eine durchschnittliche Pflanzenhöhe von 5 cm erreichte. Die Linie XL 8.28 zeigte die erwartete hohe Resistenz und blieb bis zum Ende des Versuchs (21 Tage nach Inokulation) völlig symptomlos. Die Linie X 15.1 zeigte in allen getesteten Pflanzen deutliche Symptome, erreichte aber mit 11 cm eine höhere durchschnittliche Pflanzenhöhe als der Wildtyp. Die Linien M_1 / 1.1; M_1 / 14.3; M_2 / 2.1; Art / 1.1 und Art / 2.1 zeigten eine mehr oder weniger verzögerte Symptomentwicklung, was sich in einer höheren durchschnittlichen Pflanzenhöhe, im Vergleich zum Wildtyp und der Linie X 15.1, bemerkbar machte. Die Linie M_2 / 3.1 blieb ebenfalls wie die Linie XL 8.28 bis zum Ende des Versuches ohne Symptome.

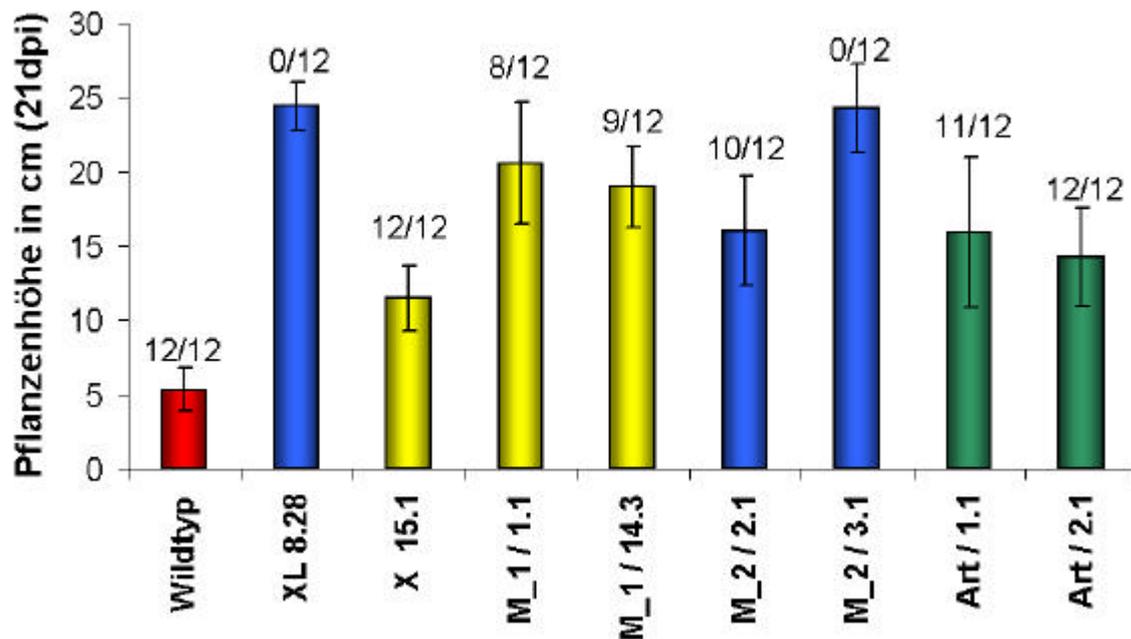


Abbildung 3.10 Mittlere Pflanzenhöhe von TSWV inokulierten *N. tabacum* var. Samsun Pflanzen 21 Tage nach Infektion

Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken eingetragen. Zusätzlich ist das Verhältnis von symptomatischen zu inokulierten Pflanzen angegeben.

Im Vergleich mit der Expressionsstärke (Abbildung 3.8) ergibt sich, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke und der ausgeprägten Resistenz festgestellt werden kann. Die exprimierte Proteinvariante hat keinen qualitativen Einfluss auf die erzeugte Resistenz, da alle sechs getesteten Linien eine mehr oder weniger starke Resistenz aufweisen, deren Höhe zwischen den Linien XL 8.28 und X 15.1 liegt. Für die Linie M₂ / 3.1 wurde eine völlige Symptomlosigkeit festgestellt. Alle anderen Linien zeichneten sich durch eine Resistenz aus, die sich in einer verzögerten Symptomausprägung und einer reduzierten Infektionsrate äußert.

Durch vorhergehende Untersuchungen war bekannt, dass die Linie XL 8.28 nicht nur gegen TSWV, sondern auch gegen TCSV und GRSV resistent ist, während die Linie X 15.1 keinerlei Resistenz gegen alle drei Viren aufweist (Schreier et al. 1996). Gleichfalls war bekannt, dass die XL 8.28 Linie ein N-Protein mit Peptidaddition exprimiert, während die Linie X 15.1 ein Protein mit der Größe des Wildtyp Proteins exprimiert. Da die Linie Art / 1.1 gleichfalls ein Protein mit der Größe des Wildtyp Proteins exprimiert, wurde diese Linie mit TCSV und GRSV inokuliert um so auf eine evtl. vorhandene breite Resistenz zu testen.

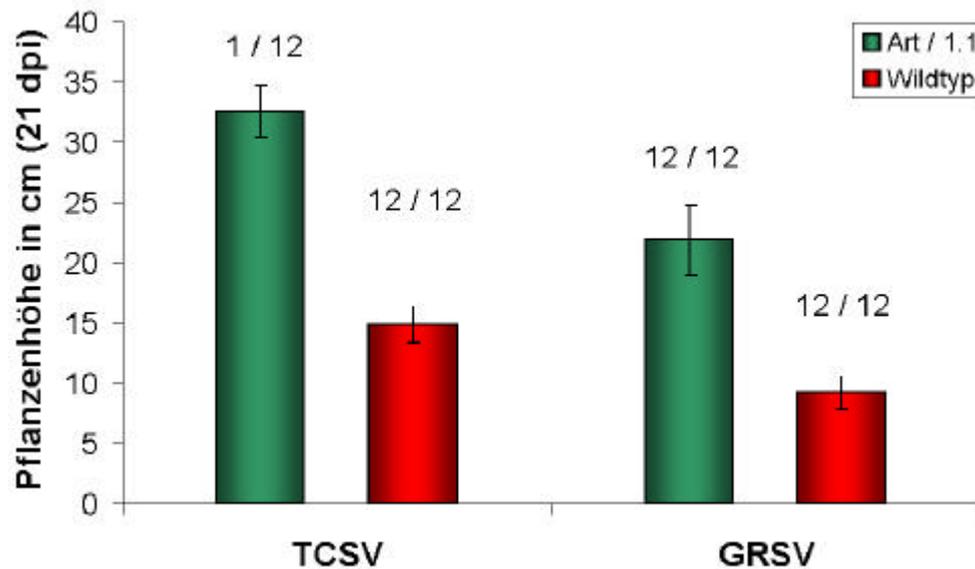


Abbildung 3.11 Resistenztest der Linie Art / 1.1 gegen TCSV und GRSV

In der Abbildung ist die durchschnittliche Pflanzenhöhe 21 Tage nach Inokulation mit der ermittelten Standardabweichung und der jeweiligen Anzahl von symptomatischen zu inokulierten Pflanzen angezeigt.

Wie in Abbildung 3.11 zu sehen ist, kann eine Resistenz der Linie Art / 1.1 gegen TCSV und GRSV im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden. Hierbei scheint die Resistenz gegen TCSV deutlich besser ausgeprägt als die Resistenz gegen GRSV, da nur eine von zwölf Pflanzen Symptome zeigte und eine höhere Pflanzenhöhe erreicht wurde.

3.3.2 Untersuchung TSWV N-Protein exprimierender *Nicotiana benthamiana* Pflanzen

Für eine dauerhafte Virusresistenz ist es wichtig, dass möglichst viele Virusstämme und Virusarten einer Virusgruppe von dem Resistenzmechanismus betroffen sind. Gleichzeitig sollte das Virusspektrum, das der Resistenz unterliegt, Hinweise auf den Resistenzmechanismus geben. Da *Nicotiana tabacum* var. Samsun als Wirtspflanze nur für TSWV, TCSV und GRSV eine systemische Virusausbreitung erlaubt, wurden transgene *Nicotiana benthamiana* Pflanzen hergestellt und auf Resistenz getestet. Diese Pflanzenart erlaubt allen in dieser Arbeit getesteten Tospovirusarten eine systemische Ausbreitung (Abbildung 3.12) und entsprechende Resistenztests.

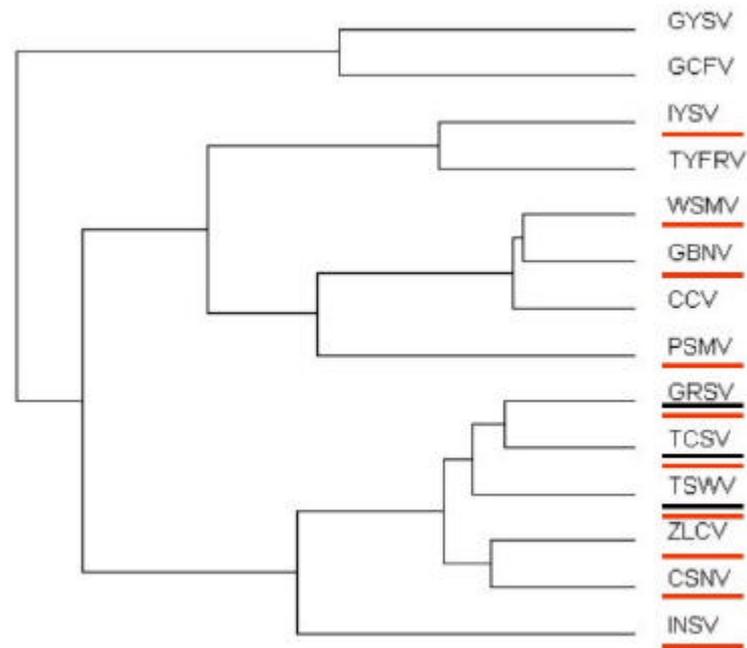


Abbildung 3.12 Stammbaum verschiedener Tospoviren-Spezies und Isolate

Der Stammbaum wurde anhand der Nukleokapsidprotein-Sequenzen erstellt. Viren, die in *Nicotiana tabacum* var. Samsun systemische Ausbreitung zeigen sind schwarz unterstrichen. Rote Markierungen geben systemische Ausbreitung in *Nicotiana benthamiana* an. Für Viren, die keine Markierung aufweisen, liegen noch keine Daten über das Infektionsverhalten in beiden *Nicotiana* Spezies vor.

Blattstücke von *Nicotiana benthamiana* wurden mittels Agrobakterium vermitteltem Gentransfer transformiert (Kapitel 2.2.4.4). Hierfür wurden die Plasmide pLX_M_1 und pLX_M_2 eingesetzt (Kapitel 2.2.4.5). Regenerierte Sprosse (T_0 -Generation) wurden bewurzelt und im Gewächshaus herangezogen. Im folgenden wurde wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben verfahren, bis Samen erhalten wurden (T_2 -Generation), die in einem Kanamycin-Resistenztest (Kapitel 2.2.4.3) einheitlich resistent waren. Für jedes verwendete Konstrukt wurden drei Linien ausgewählt und für die Virus Resistenztests verwendet. Parallel wurde die Menge rekombinant exprimierten Proteins anhand eines DAS-ELISA mit Proteinextrakten aus Keimlingen ermittelt (Abbildung 3.13).

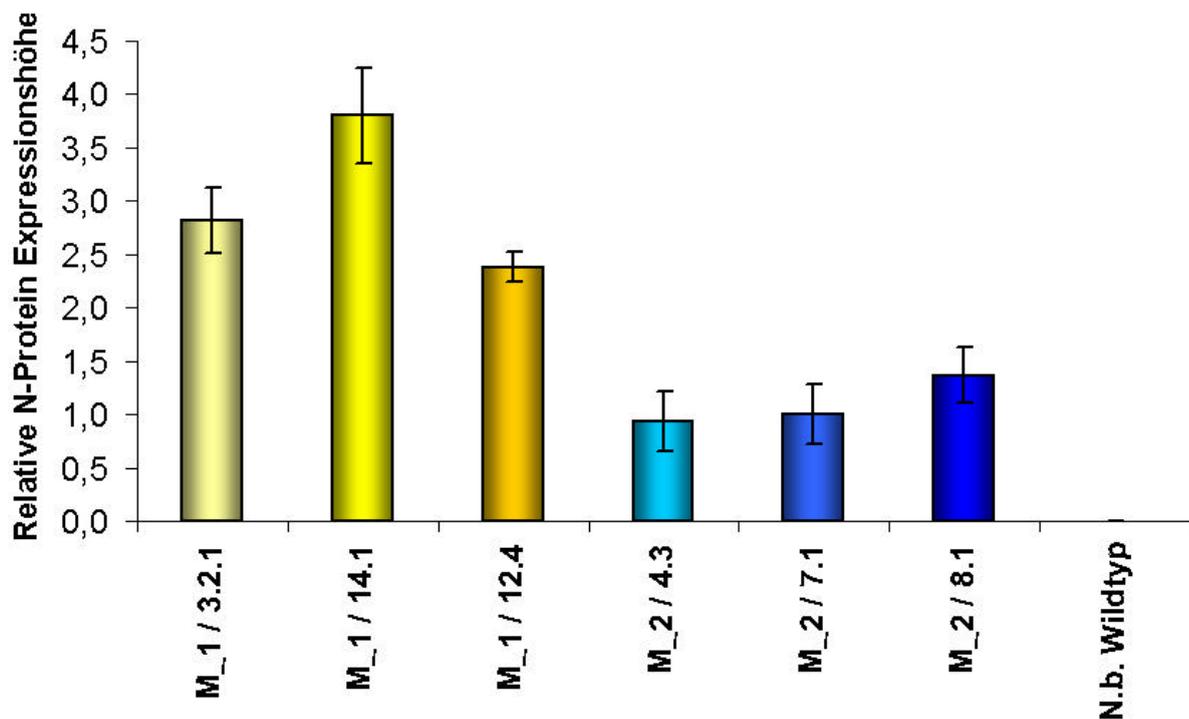


Abbildung 3.13 Relative Expressionsstärke der N-Protein exprimierenden *N. benthamiana* Linien

Die Werte wurden durch DAS-ELISA mit Antikörpern gegen TSWV ermittelt. Der Wert für Wildtyp Pflanzen wurde als Null gewertet, während der Wert für die Linie M_2 / 7.1 auf 1 gesetzt wurde. Ausgangsmaterial waren Proteinextrakte aus Keimlingen.

Es wurde festgestellt, dass die Pflanzenlinien des Konstrukts pLX_M_1 (M_1 / 3.2.1; M_1 / 14.1 und M_1 / 12.4) mehr rekombinantes Protein exprimierten als die Pflanzenlinien M_2 / 4.3; M_2 / 7.1 und M_2 / 8.1, die mit dem Konstrukt pLX_M_2 erzeugt wurden. Hierbei exprimierte Linie M_1 / 14.1 ca. 3,8 mal mehr rekombinantes Protein als die Linie M_2 / 7.1. Die am niedrigsten exprimierende Linie des Konstruktes pLX_M_1 (Linie M_1 / 12.4) exprimiert immer noch ca. 2,4 mal mehr rekombinantes Protein als die Linie M_2 / 7.1. Der Wert für die Linie M_1 / 3.2.1 liegt 2,8 mal höher als der Wert für die Linie M_2 / 7.1. Die Expressionshöhen in den Linien M_2 / 4.3 und M_2 / 8.1 weichen weniger stark ab und erreichen 90% bzw. 140% des Wertes für die Linie M_2 / 7.1.

Anschließend wurde die Expression der Proteinvarianten von Konstrukt pLX_M_1 und pLX_M_2 durch eine Immunodetektion überprüft. Hierbei konnte gezeigt werden, dass von Konstrukt pLX_M_1 in allen drei Pflanzenlinien ein Protein mit der gleichen Größe wie das TSWV N-Protein exprimiert wird, während das Protein, welches von Konstrukt pLX_M_2 exprimiert wird, größer erscheint, was mit der erwarteten Addition von 23 Aminosäuren übereinstimmt (Abbildung 3.14).

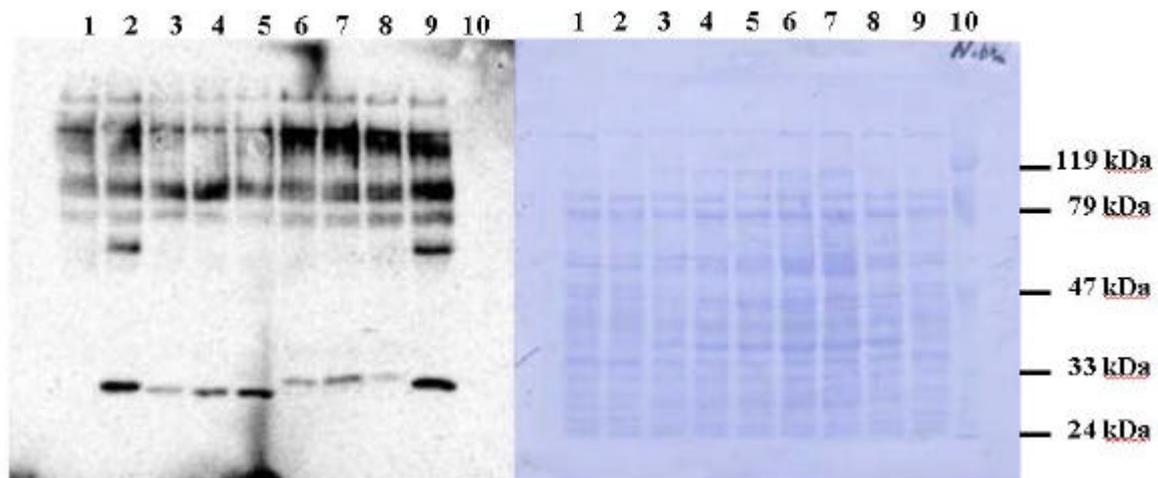


Abbildung 3.14 Immunodetektion von N-Protein in Proteinextrakten aus transformierten *N. benthamiana* Pflanzen

Die Abbildung zeigt eine Immunodetektion des TSWV N-Proteins in Proteinextrakten. In der rechten Teilabbildung ist eine Ladungskontrolle durch unspezifische Coomassie Brilliant Blue Färbung gezeigt. In Spur 1 und 10 sind Extrakte aus Wildtyp Pflanzen aufgetragen. In Spur 2 und 9 ist zusätzlich noch 100 ng TSWV N-Protein vorhanden, welches in *E. coli* exprimiert wurde. In Spur 3, 4, und 5 befinden sich Proteinextrakte der Linien M_1 / 3.2.1, M_1 / 14.1 und M_1 / 12.3. In den Spuren 6, 7 und 8 sind Extrakte der Pflanzen M_2 / 4.3, M_2 / 7.1 und M_2 / 8.1 aufgetragen. In Linie 10 befinden sich 10 µl des Protein Molekulargewichtsmarker. In den Spuren 3, 4 und 5 befinden sich je 10 µg Pflanzenprotein. In den Spuren 6 und 7 wurden je 20 µg aufgetragen. In allen anderen Spuren befinden sich 15 µg Protein.

Die Resistenztests wurden wie in Kapitel 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. In den Tests wurden Wildtyppflanzen und Pflanzen der Linien M_1 / 3.2.1; M_1 / 14.1.1; M_1 / 12.4; M_2 / 4.3; M_2 / 7.1 und M_2 / 8.1 verwendet. Es wurde auf Resistenz gegen die Tosopoviren TSWV, TCSV, GRSV, CSNV, INSV, IYSV, PSMV und WSMV getestet. Das Resistenzverhalten stellte sich für TSWV und nah verwandte Viren (TCSV und GRSV) anders dar als für weiter entfernte Viren. Es wurde eine Verzögerung der Symptomausbreitung und eine reduzierte Häufigkeit der Infektion beobachtet. Hierbei teilten sich die sechs getesteten Linien in zwei Gruppen auf. Die Linien M_1 / 3.2.1, M_1 / 14.1.1, M_2 / 8.1 zeigten in der Symptomausprägung kaum Unterschiede zum Wildtyp. Bei der Linie M_1 / 3.2.1 zeigten von je zwölf TCSV und GRSV inokulierten Pflanzen eine Pflanze bzw. zwei Pflanzen keine deutlichen Blattsymptome, aber auch diese Pflanzen blieben in ihrem Wachstum deutlich zurück, so dass sie als infiziert gewertet wurden. Ein anderes Bild ergab sich für die Linien M_1 / 12.4, M_2 / 4.3 und M_2 / 7.1. Diese Linien zeigten eine deutlich verzögerte Symptomausprägung und erreichten eine wesentlich höhere Pflanzenhöhe (Abbildung 3.15 und Tabelle 3.2). Für TSWV blieben ca. 50% der Pflanzen bis zum Ende des Versuchs völlig symptomlos. Dieses Bild verschlechterte sich für die Viren TCSV und GRSV, wobei aber die beste Linie (M_2 / 7.1) nach TCSV-Inokulation von zwölf Pflanzen nur drei und bei GRSV-Inokulation nur

sechs symptomatische Pflanzen aufwies. Bei den Linien dieser Gruppe M_1 / 12.4 und M_2 / 4.3 zeigten alle Pflanzen am Ende des Versuches Symptome, diese traten aber im Vergleich zum Wildtyp mit einer Verzögerung von bis zu 14 Tagen auf und waren in der Regel stark abgeschwächt, so dass die Linien eine deutlich größere Höhe als der Wildtyp erreichten. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass sich von den sechs getesteten Linien drei Linien als stark anfällig und drei Linien als resistent gegen TSWV, TCSV und GRSV erwiesen. Die Resistenz äußerte sich in einer verzögerten Symptomausprägung und einer reduzierten Infektionsrate.

Gegen Viren mit einer geringeren Verwandtschaft zu TSWV wie CSNV, INSV, PSMV, IYSV und WSMV verhielten sich alle sechs getesteten Linien einheitlich d.h. sie waren entweder vollständig anfällig oder vollständig resistent. Es trat völlige Symptomlosigkeit nach Infektion mit INSV und PSMV auf. Lediglich eine PSMV inokulierte Pflanze zeigte am Ende des Versuches leichte Symptome (Tabelle 3.2). Die im Vergleich geringere Höhe der PSMV inokulierten Pflanzen lässt sich durch schlechtere Wachstumsbedingungen erklären, da diese Pflanzen von Oktober bis November wuchsen, während die INSV inokulierten Pflanzen in mehreren Versuchen von März bis Mai herangezogen und untersucht wurden. Versuche zur Resistenz gegen CSNV und WSMV ergaben keinerlei Resistenz gegen diese Viren (Abbildung 3.15 und Tabelle 3.2). Für IYSV konnte keine vollständige Infektion der Wildtyppflanzen erreicht werden. Dies hatte eine sehr breite Standardabweichung in der durchschnittlichen Pflanzenhöhe zur Folge. Daher kann keine Aussage über Wachstums-Unterschiede gemacht werden. Anhand der in Tabelle 3.2 dargestellten Anzahl symptomatischer Pflanzen lässt sich als Ergebnis festhalten, dass für IYSV keine erhöhte Resistenz für die rekombinanten Pflanzen messbar war.

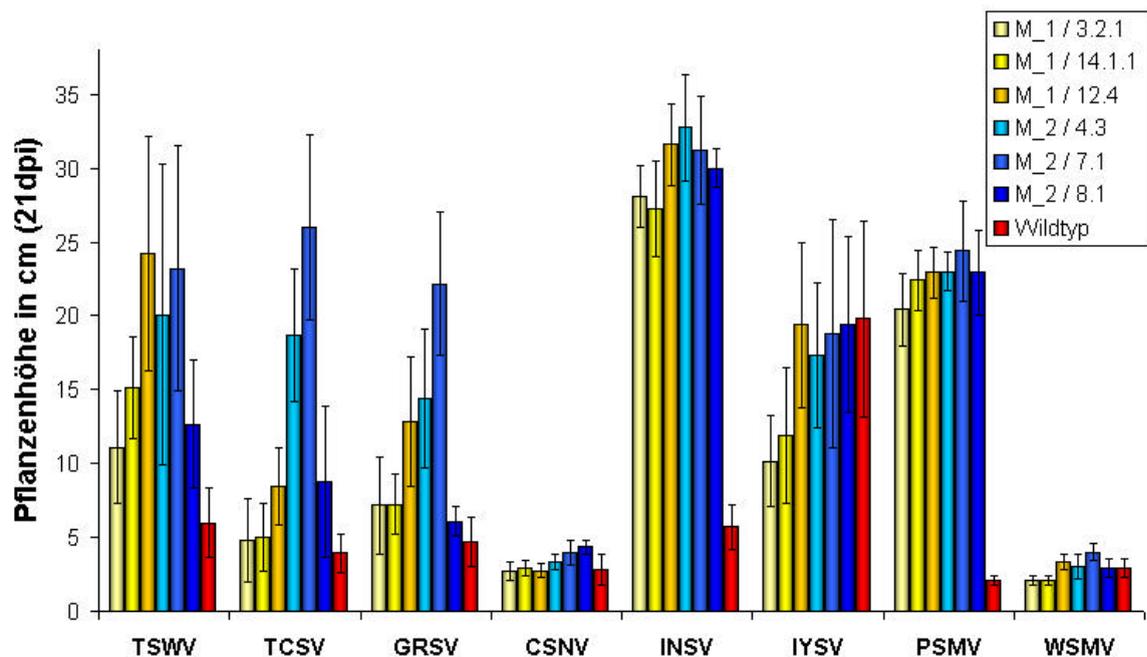


Abbildung 3.15 Tospovirus Resistenz von N-Protein exprimierenden *Nicotiana benthamiana* Linien

Die jeweilige Balkenhöhe gibt die durchschnittliche Pflanzenhöhe 21 Tage nach Infektion an. Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung an.

Tabelle 3.2 Symptomausprägung von *N. benthamiana* Pflanzen 21 Tage nach Infektion mit verschiedenen Tospoviren

Die Zahlenangaben zeigen das jeweilige Verhältnis von symptomatischen Pflanzen zu inokulierten Pflanzen an.

	TSWV	TCSV	GRSV	CSNV	INSV	IYSV	PSMV	WSMV
M_1 / 3.2.1	12 / 12	11 / 12	10 / 12	11 / 11	0 / 12	9 / 12	0 / 12	12 / 12
M_1 / 14.1.1	12 / 12	12 / 12	12 / 12	12 / 12	0 / 12	11 / 12	0 / 12	12 / 12
M_1 / 12.4	13 / 24	12 / 12	12 / 12	12 / 12	0 / 24	17 / 24	0 / 12	12 / 12
M_2 / 4.3	14 / 24	9 / 12	12 / 12	12 / 12	0 / 24	19 / 24	0 / 12	12 / 12
M_2 / 7.1	11 / 24	3 / 12	6 / 12	12 / 12	0 / 24	23 / 24	1 / 12	12 / 12
M_2 / 8.1	12 / 12	11 / 12	12 / 12	12 / 12	0 / 12	5 / 12	0 / 12	12 / 12
Wildtyp	23 / 23	24 / 24	24 / 24	24 / 24	36 / 36	18 / 24	12 / 12	24 / 24

3.4 Peptid vermittelte Virusresistenz

Proteinbindungsstudien haben gezeigt, dass die N- und C-terminale Bindestelle in Tospoviren N-Proteinen funktional konserviert ist (Kapitel 3.2). So konnten z.B. die N- und C-terminalen Bindestellen des TSWV N-Proteins nicht nur das TSWV N-Protein binden, sondern auch an die N-Proteine von TCSV, GRSV, CSNV und INSV. Durch weitere Versuche sollten nun Peptide aus dem TSWV N-Protein identifiziert werden, die diese Bindestellen enthalten. Diese Peptide sollten hiernach in Pflanzen zur Expression gebracht werden, damit diese in Resistenztests getestet werden konnten. Hierdurch sollte geklärt werden, ob eine Virusresistenz erzeugt werden kann und welche Virusspezies dieser Resistenz unterliegen.

3.4.1 Klonierung und Durchmusterung einer Proteinspezifischen Peptid-Bibliothek

Peptid-Bibliotheken bieten die Möglichkeit Protein bindende Peptide im Hefe-Zwei-Hybrid-System zu identifizieren. Um Peptide aus der TSWV N-Protein Sequenz zu finden, die an Tospoviren Proteine binden können, wurde eine proteinspezifische Peptid-Bibliothek erstellt. Diese TSWV N-Protein spezifische Peptidbibliothek wurde durch Fragmentierung eines PCR Produktes mit DNase I hergestellt (Kapitel 2.2.1.3). Dies geschah unter dem Einfluß von Mn^{2+} -Ionen, so dass bevorzugt DNA Fragmente mit glatten Enden entstanden. Die Fragmente wurden durch eine Topoisomerase Reaktion in den Vektor pCRII-Blunt kloniert, wodurch 2500 individuelle Kolonien erhalten wurden. Da die Sequenz des TSWV N-Proteins 777 bp umfaßt, entspricht dies bei völlig zufälliger Fragmentierung einer ca. 1,5 fachen Absättigung. Die Kolonien wurden von den Agarplatten abgewaschen und für eine Plasmidisolierung verwendet. Aus den so erhaltenen Plasmiden wurden die DNA Fragmente mit einem Restriktionsschnitt durch *Eco RI* entfernt und in einen ebenfalls *Eco RI* geschnittenen und dephosphorylierten pACT2-1 Vektor kloniert, wodurch 7289 Kolonien erhalten wurden. Kontroll-Ligationen zeigten, daß ca. 40 Prozent der Kolonien auf Religationen zurückgingen. Es ergibt sich daher eine rechnerische Verringerung auf ca. 4400 individuelle Klone. Eine Restriktionsanalyse ergab eine klonierte Fragmentgröße von 100 bis 300 bp. Als Köder-Protein für den Interaktionstest wurde die beschriebene F242/246A Mutante des TSWV N-Proteins verwendet (Uhrig et al. 1999). Diese wurde durch Doppel-Transformation mit der Peptid-Bibliothek im Hefe-Zwei-Hybrid-System auf Interaktion getestet. Aus sieben unter selektierenden Bedingungen gewachsenen Kolonien wurde das Plasmid isoliert und die Peptid codierende Sequenz sequenziert.

In den sieben untersuchten Kolonien wurden zwei unterschiedliche Peptidsequenzen gefunden.

Die Peptidsequenz **KKGKEYAAILSSSNPNAKGSIAMHYSETLNKFYEMFGV**

fand sich in vier Kolonien mit den Nummern 1.1, 1.2, 1.4 und 1.6. In den Kolonien mit den Nummern 1.5, 1.8 und 18.4 fand sich die Peptidsequenz

SSSNPNAKGSIAMHYSETLNKFYEMFGVK. Beide Sequenzen stellen Bruchstücke aus dem TSWV-N Protein dar (Abbildung 3.16) und reichen jeweils von der Aminosäure 210 bis 248 bzw. 220 bis 249. In beiden Peptidsequenzen sind zwei Phenylalanine (F242 und F246) enthalten, die für eine funktionsfähige C-terminale Bindestelle benötigt werden (Uhrig et al. 1999). Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß zwei Peptide aus der Sequenz des TSWV NProteins isoliert wurden, die die Funktion der C-terminalen Bindestelle enthalten.

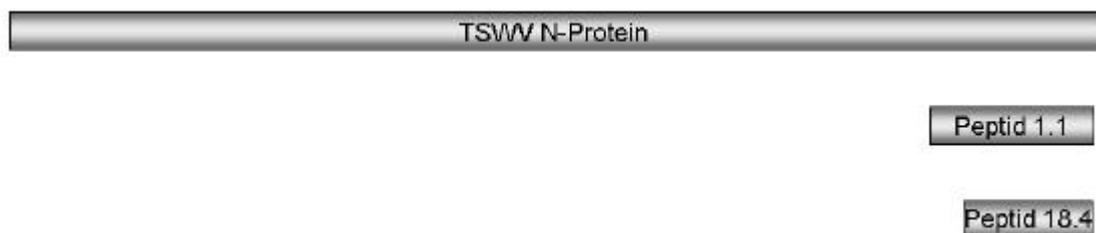


Abbildung 3.16 Die isolierten Peptide und ihre Lage in der N-Protein Sequenz

In der Abbildung sind die Länge der Peptide 1.1 und 18.4 sowie ihre Lage in der Aminosäuresequenz des TSWV N-Proteins maßstabsgerecht wiedergegeben.

In weiteren Interaktionstests mit TSWV-N und der beschriebenen N-terminalen Punktmutante F34/37A (Soellick 2000) wurden keine anderen interagierenden Peptide gefunden. Es kann folglich kein Peptid definiert werden, welches die N-terminale Bindestelle darstellt. Deshalb wird davon ausgegangen, dass diese Bindestelle komplexer ist und sich aus Aminosäuren zusammensetzt, die in der Primärsequenz in weiter auseinander liegenden Bereichen liegen.

3.4.2 Konstruktion zweier Tospoviren N-Protein bindender Peptide mit artifizieller RNA-Sequenz

In den bisher beschriebenen Bindungsstudien zu Tospoviren N-Proteinen wurden zwei Interaktionsgruppen gefunden (Kapitel 3.2.1) sowie festgestellt, dass die Lage der C-terminalen Bindungsstelle in beiden Interaktionsgruppen konserviert ist. Dies wurde durch die Klonierung entsprechender C-terminaler Deletionen und Interaktionstest im Hefe-Zwei-Hybrid-System bestätigt (Kapitel 3.2.2). Aus einer TSWV N-Protein spezifischen Peptidbibliothek wurde eine Peptidsequenz bestimmt, die eine Mikrodomäne des TSWV N-Proteins mit der Funktion der C-terminalen Bindestelle darstellt (Kapitel 3.4.1). Durch einen weiteren Sequenzvergleich sollte nun geklärt werden, ob eine homologe Region in der Sequenz des WSMV N-Proteins bestimmt werden kann, die gleichfalls eine Mikrodomäne für die C-terminale Bindestelle darstellt. Diese sollte folglich in der Lage sein, alle Mitglieder der zweiten Interaktionsgruppe (WSMV, PSMV und IYSV N-Protein) zu binden (Abbildung 3.17).

TSWV_N	1	SSSNFN AKG SV AMEHY SETLNK FYEMFGV	29	29 kDa
TCSV_N	1	..C.....I.....H.D...A....	29	
GRSV_N	1	..C.....I..DY..DN.E.....	29	
CSNV_N	1	KACD.RM..AI.....DS.....	29	
INSV_N	1	KAC S .K...LA..D..K.G.T SI .S..NA	29	
IYSV_N	1	TDCT.GTS.AASLIKFN.QIKILEGA..K	29	
PSMV_N	1	ADCK.GTTSGISLKI.N.QVQFMEQA.KS	29	
WSMV_N	1	E ..TGTAS.I SL KK.EDQVKYMDRV.SA	29	31 kDa

Abbildung 3.17 Aminosäure Sequenzvergleich verschiedener Tospoviren N-Proteine in der C-terminalen Binderegion

Die Abbildung zeigt einen Sequenzvergleich der C-terminalen Binderegion von TSWV N-Protein mit den homologen Regionen anderer Tospoviren N-Proteine. Die Aminosäuresequenz, die in beiden isolierten Peptiden enthalten ist, ist in der TSWV N-Protein Sequenz durch einen schwarzen Kasten markiert. Analog ist die homologe Sequenz in WSMV N-Protein markiert. Die unterschiedlichen Interaktionsgruppen sind mit einem roten bzw. schwarzen Balken eingetragen. Zusätzlich ist das Molekulargewicht der N-Proteine in den jeweiligen Interaktionsgruppe angegeben. Punkte zeigen Aminosäuren an, die identisch zur TSWV Sequenz sind.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden zwei Peptide definiert und als T-Pep und W-Pep bezeichnet, die die jeweilige C-terminale Bindestelle enthalten sollten. T-Pep enthält die Binderegion des TSWV N-Proteins und W-Pep die vermutete Binderegion des WSMV N-Proteins mit der Aminosäuresequenz SESNPGTASSISLKKYEDQVKYMDRV FSA. Die Nukleinsäuresequenz der Peptide wurde so gewählt, dass sie eine möglichst geringe Sequenzidentität zu den beiden Wildtyp Sequenzen zeigt. Diese Sequenzidentität beträgt für T-Pep 61% und für W-Pep 63%. Gleichzeitig wurde die Codon Nutzung für Tabak optimiert (Abbildung 3.18).

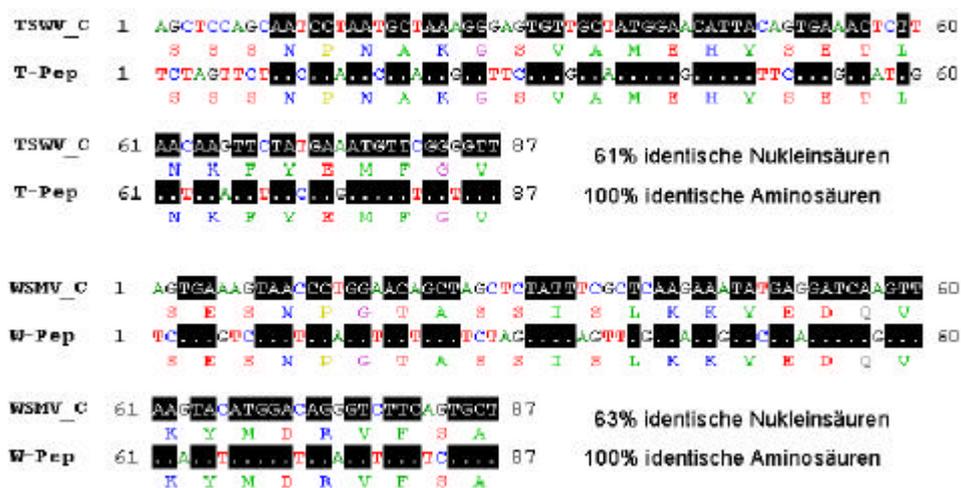


Abbildung 3.18 Aminosäure- und Nukleotidsequenzvergleich von T- und W-Pep mit ihrer jeweiligen Wildtyp Sequenz

Identische Nukleotide sind mit einem schwarzem Hintergrund unterlegt.

Die T- und W-Pep codierenden DNA-Fragmente wurden durch Hybridisierung von synthetisch hergestellten Oligonukleotiden erzeugt. Die hergestellten DNA-Fragmente enthielten zusätzlich noch Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme um Klonierungen für translationale Fusionen zu erlauben. Hierzu wurde am 5'-Ende der Sequenz für das T-Pep Schnittstellen für *Eco RI* und *Nco I* hinzugefügt. Am 3'-Ende wurden Schnittstellen für *Xho I* und *Mun I* addiert. Analog wurde dem Fragment für das W-Pep am 5'-Ende die Sequenzen für Schnittstellen von *Bsp HI* und *Xho I* und am 3'-Ende für *Sal I* und *Mun I* hinzugefügt. Diese Strategie erlaubte auch eine Kombination der Peptid-Kodierenden Sequenzen durch einen Restriktionsverdau beider Fragmente mit *Xho I* und anschließender Ligation. Die DNA-Fragmente sind in der Abbildung 3.19 mit den jeweils eingebrachten Restriktionsfragmenten schematisch dargestellt.

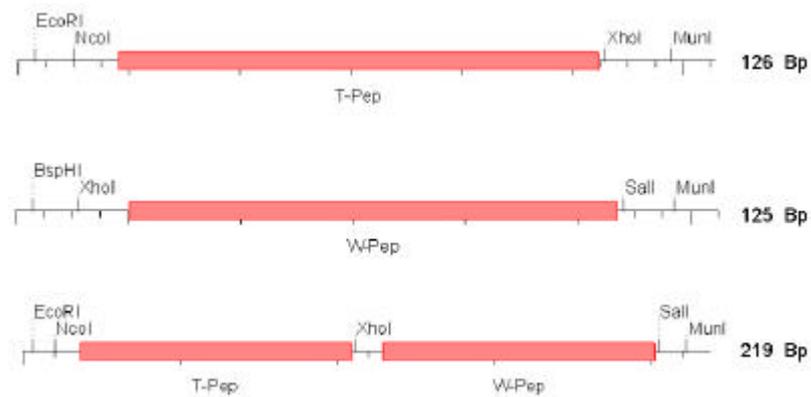


Abbildung 3.19 DNA-Fragmente von T-Pep und W-Pep sowie ihrer Kombination TW-Pep

Die Peptid codierenden Bereiche sind rot markiert. Zusätzlich sind die eingebrachten Restriktionsschnittstellen und die Länge der Fragmente in Basenpaaren (Bp) dargestellt.

3.4.3 Konstruktion der Gus Peptid Fusionen

Da rekombinant exprimierte Peptide in der Regel instabil in der Pflanzenzelle sind wurden die Peptide an ein Träger-Protein fusioniert. Als Trägerprotein wurde die β -Glucuronidase (Gus) aus *E. coli* ausgewählt. Dieses Protein wird häufig als Reportergen in Pflanzen verwendet und ist leicht über die enzymatische Aktivität des exprimierten Proteins nachzuweisen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass seine enzymatische Aktivität in der Regel nicht von Proteinfusionen beeinflusst wird (Jefferson et al. 1986).

Um translationale Peptidfusionen am N- und C-Terminus der β -Glucuronidase herzustellen zu können, wurde die Sequenz der β -Glucuronidase mutiert. Hierdurch wurde eine interne *Bsp* HI Schnittstelle eliminiert und gleichzeitig Schnittstellen für *Sma* I, *Bsp* HI und *Eco* RI am 5'-Ende eingebracht. Weiterhin wurden am 3'-Ende Schnittstellen für *Nco* I, *Sal* I, *Bam* HI und *Sma* I geschaffen (Abbildung 3.20). Da die neue Sequenz translationale Fusionen ermöglicht, wurde das Gen *Gus-Fus* genannt.

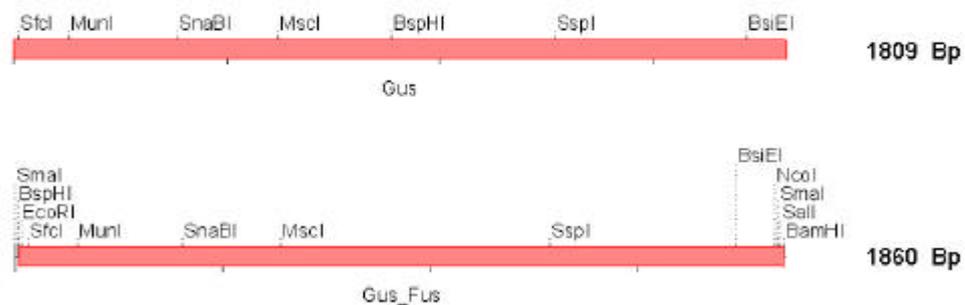


Abbildung 3.20 Schematischer Vergleich der mutierten *Gus-Fus* Sequenz zur ursprünglichen *Gus* Sequenz

Die Lage der entfernten *Bsp* HI sowie der hinzugekommenen Restriktions-Schnittstellen sind eingezeichnet.

Die artifiziellen Peptid-Fragmente wurden als translationale Fusion mit der *Gus-Fus* Sequenz kombiniert und die so entstandenen Gene *GusT*, *GusTW*, *TGusT* und *TWGusTW* genannt. Aus dem Namen des Gens ergibt sich jeweils, welches Peptid enthalten ist und ob dieses als N-terminale oder C-terminale Fusion mit der Sequenz von *Gus* kombiniert wurde. Als Beispiel sei hier das Gen *TWGusTW* und das Gen *GusT* erläutert. Das Gen *TWGusTW* führt zu einer Kombination aus T-Pep und W-Pep jeweils als N- und C-terminale Fusion mit *Gus*. Das Gen *GusT* führt zu einer C-terminalen Fusion von T-Pep an *Gus*. Die Abbildung 3.21 zeigt die verschiedenen *Gus*-Peptidfusionen im Vergleich.

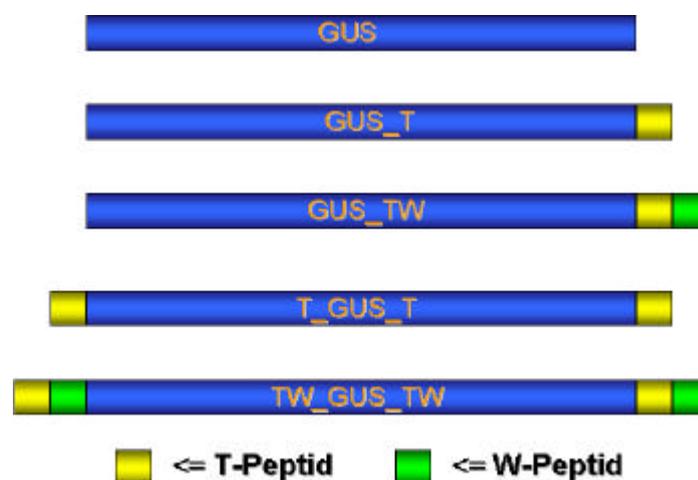


Abbildung 3.21 Schematische Darstellung unterschiedlicher *Gus*-Peptidfusionen

3.4.4 Interaktionstests von Gus-Peptid-Fusionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Vorbereitend für die Pflanzentransformation wurden die Gus-Peptid-Fusionen auf Interaktion mit den Tosspoviren N-Proteinen getestet. Hierzu wurden die Hefe-Zwei-Hybrid-Vektoren pAS2-1 und pACT2-1 an das Gateway™ System angepasst. Das oben beschriebene Gus-Fus Gen sowie die Gene für die Gus-Peptid-Fusionen wurden nun mittels der LR-Reaktion von dem entsprechenden pEntry4 Derivat (Kapitel 2.1.5.5) in die modifizierten Hefe-Zwei-Hybrid-Vektoren umgesetzt. Die Vektoren wurden im Hefe-Zwei-Hybrid-System auf Selbstaktivierung getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass die Gus-Peptid-Fusionen mit der Gal4-DNA-Bindedomäne zu einer Selbstaktivierung führten. Aus diesem Grunde konnten sie nicht für weitere Tests verwendet werden. Die Fusionen mit der Gal4-Aktivierungsdomäne zeigten keine Selbstaktivierung. Sie wurden in Kombination mit verschiedenen Tosspoviren N-Proteinen auf Interaktion getestet. Eine Bindung der isolierten Peptide mit dem unmutierten N-Protein konnte nicht nachgewiesen werden. Um konkurrierende Interaktionen der N-Proteine zu verhindern, wurden die in Kapitel 3.2.2 beschriebenen C-terminalen Deletionen der N-Proteine eingesetzt. Durch diese Tests konnte gezeigt werden, dass die GusT Fusion mit TSWV, TCSV, GRSV, CSNV und INSV N-Proteinen interagieren kann, während es mit den N-Proteinen von IYSV, PSMV und WSMV zu keiner Interaktion kommt. Das Gus Protein selber zeigt keinerlei Interaktion, während die GusTW und die TWGusTW Fusionen mit allen getesteten Tosspoviren N-Proteinen interagieren kann. Die TGusT Fusion zeigt keinerlei Interaktionen (Abbildung 3.22).

Als Ergebnisse können festgehalten werden, dass eine Fusion des T-Peptids mit Gus eine Bindung an die C-terminalen Deletionen von TSWV, TCSV, GRSV, CSNV und INSV N-Protein vermitteln kann. Weiterhin wurde gezeigt, dass T-Pep ausreichend ist um alle Mitglieder der TSWV Interaktionsgruppe zu binden und Gus als Trägerprotein für eine T-Pep Fusion geeignet ist. Ebenfalls wurde festgestellt, dass das GusTW Protein alle getesteten C-terminalen Deletionen binden kann. Während die N- und C-terminale Fusion von T-Pep an Gus keinerlei Interaktionen zeigt, kann eine N- und C-terminale Fusion von T- und W-Pep an Gus alle getesteten N-Protein Varianten binden. Folglich konnte gezeigt werden, dass eine doppelte Fusion von T- und W-Pep an Gus noch eine Proteinfaltung erlaubt, die zu einer Bindung an beide Interaktionsgruppen führt. Die Interaktionsstudien von Gus-Peptid-Fusionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System haben nicht nur gezeigt, dass Gus als Trägerprotein für N- und C-terminale Peptidfusionen geeignet ist und eine Addition von zwei Peptiden zu einer Addition der Bindefähigkeit führen kann,

sondern auch, dass W-Pep ausreichend für eine Bindung an die C-terminalen Deletionen von WSMV, PSMV und IYSV N-Protein ist. Die Lage der C-terminalen Bindestelle konnte in der zweiten Interaktionsgruppe vorhergesagt und durch Experimente im Hefe-Zwei-Hybrid-System überprüft werden. Trotz der nur noch geringen Ähnlichkeit von T-Pep und W-Pep auf der Aminosäuresequenzebene kann eine Peptidsequenz angegeben werden, die nicht nur in der Lage ist an WSMV N-Protein, sondern auch an PSMV und IYSV N-Protein zu binden. Diese zeigen eine Sequenzidentität von nur noch 14% bzw. 17% zur entsprechenden Region im TSWV N-Protein (vergleiche Abbildung 3.17). Die Lage der C-terminalen Bindestelle ist daher über alle Tospoviren N-Proteine stark konserviert, während die Aminosäuresequenz zwischen den Interaktionsgruppen stark variiert.

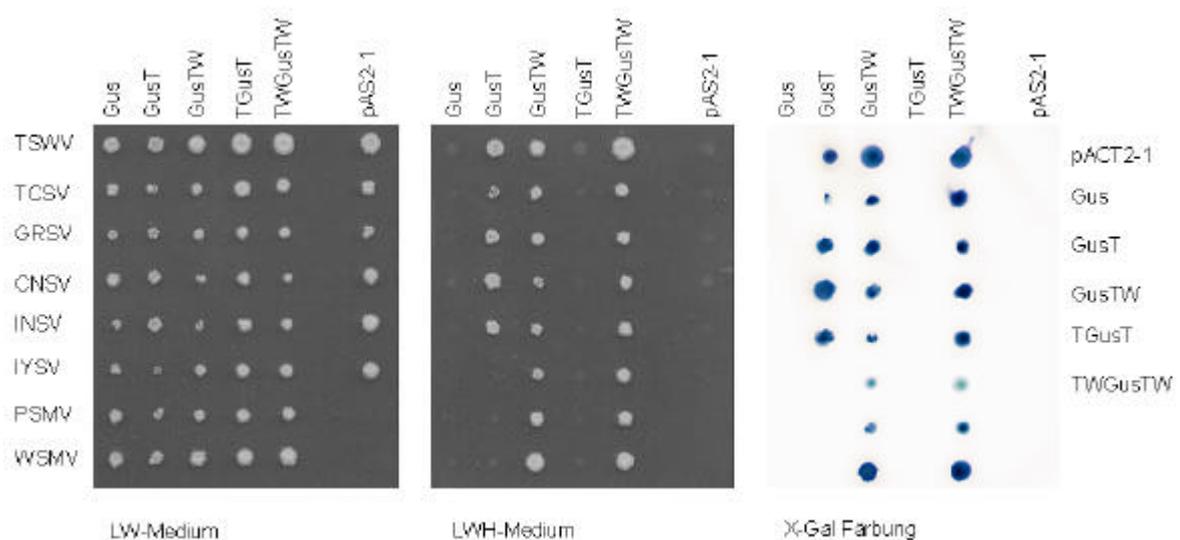


Abbildung 3.22 Interaktionen der Gus Peptid Fusionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System

In der gezeigten Interaktionsmatrix sind die Tospoviren N-Proteine als C-terminale Deletion in horizontalen Reihen aufgetragen. Die einzelnen Varianten des Gus Proteins sind vertikal hierzu aufgetragen. Die Gus-Varianten werden als Fusion mit der Aktivierungsdomäne exprimiert, während die N-Proteine als Fusion mit der DNA Bindungsdomäne exprimiert werden. Die letzte Reihe enthält den pAS2-1 Vektor als Negativ-Kontrolle sowie die rechts aufgeführten Gus-Varianten als Aktivierungsdomänen Fusion. pACT2-1 enthält nur die Aktivierungsdomäne. Die letzte Reihe stellt daher die Kontrolle auf Selbstaktivierung dar. In der ersten Teilabbildung werden die Hefen lediglich auf erfolgreiche Doppeltransformation der Plasmide selektiert. In der zweiten Teilabbildung wird die Selektion auf Protein-Interaktionen gezeigt, die in der dritten Teilabbildung durch einen X-Gal Färbung überprüft werden.

3.4.5 Resistenztests mit Peptid exprimierenden *N. benthamiana* Pflanzen

Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, wurde eine Peptidsequenz identifiziert, die als eine Minimalbinderegion des TSWV NProteins betrachtet werden kann. Durch Versuche im Hefe-Zwei-Hybrid-System (Kapitel 3.4.4) konnte gezeigt werden, dass dieses Peptid (T-Pep) ausreichend für eine Bindung an TSWV NProtein und alle Mitglieder seiner Interaktionsgruppe ist. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass ein homologes Peptid (W-Pep) in der Lage ist alle Mitglieder der zweiten Tospoviren Interaktionsgruppe zu binden. Die Kombination von T- und W-Pep an Gus erlaubte eine Bindung an alle getesteten N-Proteine.

Um den Einfluß von Gus-Peptid-Fusionen auf die virale Entwicklung zu testen wurden rekombinante Pflanzen hergestellt, die diese Fusionen zur Expression bringen sollten. Als Testpflanze wurde *N. benthamiana* gewählt, da diese Art eine systemische Infektion aller interessierender Tospoviren erlaubt. Transgene Pflanzen wurden über Agrobakterium vermittelten Gentransfer und anschließende Regeneration von Sprossen in Gewebekultur (Kapitel 2.2.4.5) erzeugt. Die hierfür benötigten Vektoren wurden über eine sequenzspezifische Rekombination hergestellt. Als Ausgangsmaterial diente das Plasmid pLX-Gateway (Hackbusch 2000). Die entstanden Vektoren zur Pflanzentransformation wurden je nach enthaltener Sequenz pLX-Gus, pLX-GusT, pLX-GusTW, pLX-TGusT und pLX-TWGusTW genannt. Die regenerierten Sprosse wurden bewurzelt und im Gewächshaus bis zur Samenreife herangezogen. Keimlinge von neun Pflanzen je Konstrukt wurden auf Gus-Expression getestet. Hierbei wurde festgestellt, dass Keimlinge aus der Transformation mit den Konstrukten pLX_GusTW, pLX_TGusT und pLX_TWGusTW nur eine geringe Aktivität der β -Glucuronidase zeigten. Keimlinge aus der Transformation mit den Vektoren pLX_Gus und pLX_GusT zeigten hingegen eine deutlich höhere Aktivität. Es ist festzustellen, dass die durchschnittliche Enzymaktivität aller Keimlinge, von je neun getesteten Primärtransformanden pro Konstrukt, mit der Anzahl der fusionierten Peptide abnimmt. Den höchsten durchschnittlichen Aktivitätswert erreichten Keimlinge der GusT Pflanzen. Die Pflanzen des pLX_GusTW Konstruktes erreichten nur noch durchschnittlich 29% dieser Aktivität. Dieser Wert fiel für die TGusT Pflanzen weiter ab auf 13%. Für Pflanzen des Konstruktes TWGusTW war nur noch eine sehr geringe Aktivität von >1% nachweisbar. Die Pflanzen, die mit dem Konstrukt pLX_Gus hergestellt wurden, erreichten hingegen eine durchschnittliche Aktivität von 59% der GusT Pflanzen (Abbildung 3.23).

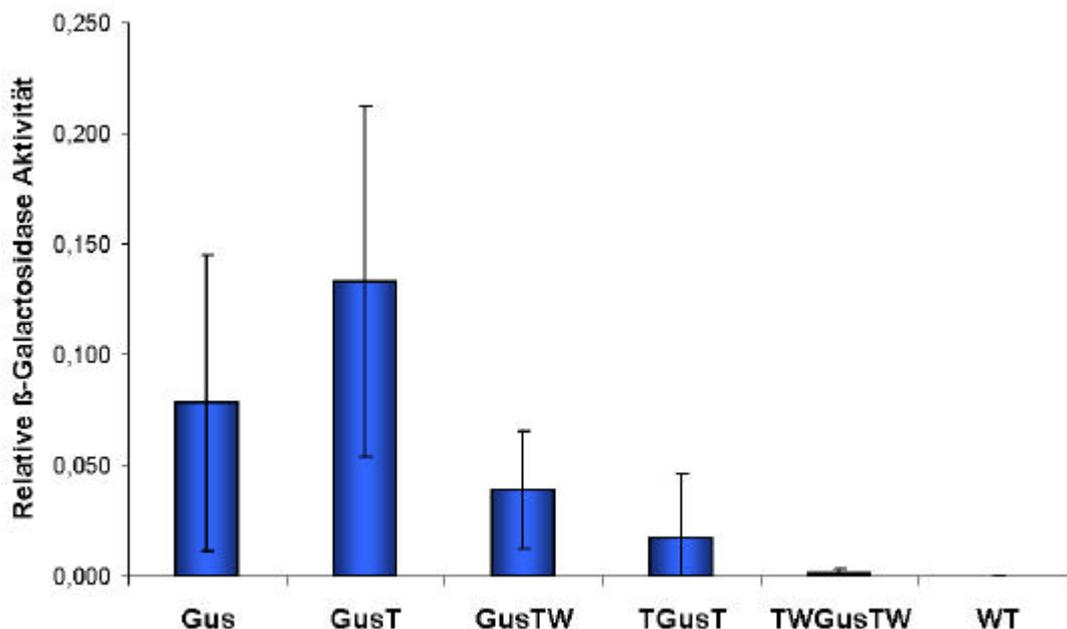


Abbildung 3.23 Relative Expression der Gus Peptidfusionen in transgenen *Nicotiana benthamiana* Keimlingen

Für die Gus Aktivitätstests wurden je 15 Keimlinge pro Linie homogenisiert und gemeinsam auf Gus Expression getestet. Die dargestellten Werte geben jeweils das Mittel und die Standardabweichung von neun Linien pro Konstrukt wieder. Als Kontrolle wurden Keimlinge von Wildtyp Pflanzen verwendet.

Parallel wurden die Keimlinge bis zum Drei- bis Vierblattstadium herangezogen und mit je vier Pflanzen pro Pflanzenlinie auf Resistenz gegen TSWV getestet. Dieser Resistenztest wurde wie in Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt und 21 Tage lang bonitiert. In diesem Test erwiesen sich alle getesteten Pflanzen der Konstrukte pLX_GusTW, pLX_TGusT, pLX_TWGusTW als anfällig gegen TSWV. Eine Ausnahme bildete eine Pflanze des Konstruktes pLX_TGusT. Die Pflanzen des pLX_GusT Konstruktes zeigten hingegen nur bei 25 von 36 getesteten Pflanzen Symptome. Von sechs GusT Linien wurden daraufhin erneut je 4 Pflanzen auf Resistenz gegen TSWV getestet. In diesem Versuch wurde das erste Ergebnis bestätigt, da nur 11 von 24 getesteten Pflanzen Symptome aufwiesen. Eine Zusammenfassung beider Versuche ergab daher einen Anteil von 36 symptomatischen Pflanzen unter 60 getesteten. Im Vergleich zu den Pflanzen der anderen rekombinanten Linien und der getesteten Wildtyp Pflanzen ergab sich eine um durchschnittlich 9 cm höhere Wuchshöhe (Abbildung 3.24). Folglich war für die GusT Linien eine deutliche Resistenz gegen TSWV messbar, die noch deutlicher wird, wenn man die Tatsache bedenkt, daß in dem Versuch Nachkommen von Primärtransformanten getestet wurden und die getesteten Pflanzen aus einer Population von homo- und hemizygoten sowie Wildtyp Pflanzen bestanden.

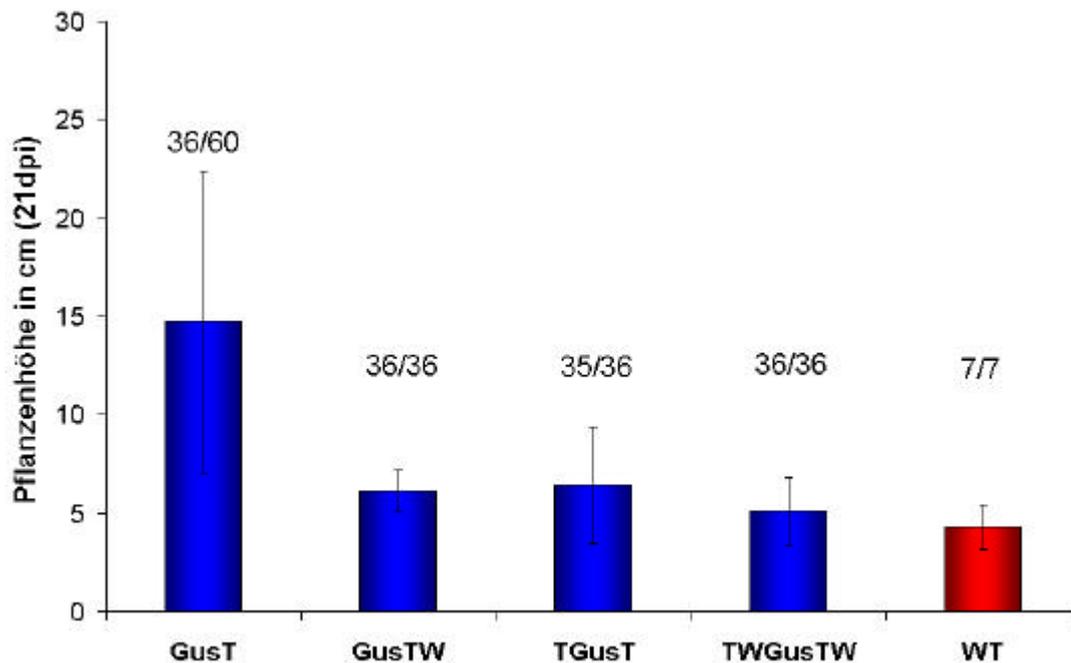


Abbildung 3.24 Durchschnittliche Pflanzenhöhe transgener *Nicotiana benthamiana* Linien 21 Tage nach Infektion mit TSWV

Die Werte geben die durchschnittliche Pflanzenhöhe und die Standardabweichung von mindestens neun Linien pro Konstrukt wieder, wobei pro Linie jeweils vier Pflanzen mit Virus inokuliert wurden. Die Zahlenangaben geben das Verhältnis von symptomatischen Pflanzen zu asymptomatischen Pflanzen am 21. Tag nach Inokulation wieder.

3.4.6 Quantifizierung der Bindungsstärke einer T-Pep-Gus Fusion an Tosspoviren N-Proteine

Wie in Kapitel 3.4.5 dargestellt, wurde für die GusT exprimierenden Linien eine Resistenz gegen TSWV beobachtet. Um einen Hinweis auf eine mögliche Resistenz gegen andere Tosspoviren zu erhalten wurden die beobachteten Proteininteraktionen des GusT Proteins im Zwei Hybrid System weitergehend analysiert. Hierzu wurde die Interaktionsstärke durch einen quantitativen Test der β Galaktosidaseaktivität mittels o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) bestimmt. Die genaue Vorgehensweise ist in Kapitel 2.2.3.6 beschrieben. In diesem Test wurde die Bindungsstärke des Gus und des GusT Proteins mit C-terminalen Deletionen der N-Proteine von TSWV, TCSV, GRSV, CSNV, INSV, IYSV, PSMV und WSMV gemessen. Als Indikator hierfür diente die β -Galaktosidase-Aktivität der verwendeten Hefezellen, welche die mehr oder weniger starke Promotoraktivität des *lacZ* Reportergens widerspiegelt. Für die Interaktionen von GusT mit den C-terminalen Deletionen von TSWV, TCSV, GRSV, CSNV und INSV

wurden hohe Enzymaktivitäten gemessen, die ca. 5 bis 6 mal höher waren als die Aktivität für die Interaktion einer N-terminalen Deletion des TSWV N-Proteins ($N\Delta 39$) mit der C-terminalen Deletion von TSWV N-Protein. Diese Interaktion geht auf die Bindung von jeweils einer Bindestelle pro Protein zurück (Uhrig et al. 1999). Unter den Interaktionen zeigte die Interaktion mit der C-terminalen Deletion von TSWV N-Protein den höchsten ONPG-Wert von 6,4, während die Interaktion mit der C-terminalen Deletion von INSV N-Protein den niedrigsten Wert von 4,9 ergab. Die Enzymaktivitäten für die Deletionen von TCSV, GRSV und CSNV lagen mit 6,0, 5,9 und 5,3 zwischen diesen Werten. In den Hefezellen, die Gus und je eine der C-terminalen Deletionen exprimierten wurde keine oder nur eine sehr geringe Aktivität gemessen. Gleiches galt für Hefezellen die GusT und eine C-terminale Deletion von IYSV, PSMV oder WSMV N-Protein exprimierten. Hefezellen, die lediglich die leeren Vektoren pACT2-1 und pAS2-1 enthielten wurden für die Definition des Nullwerts verwendet.

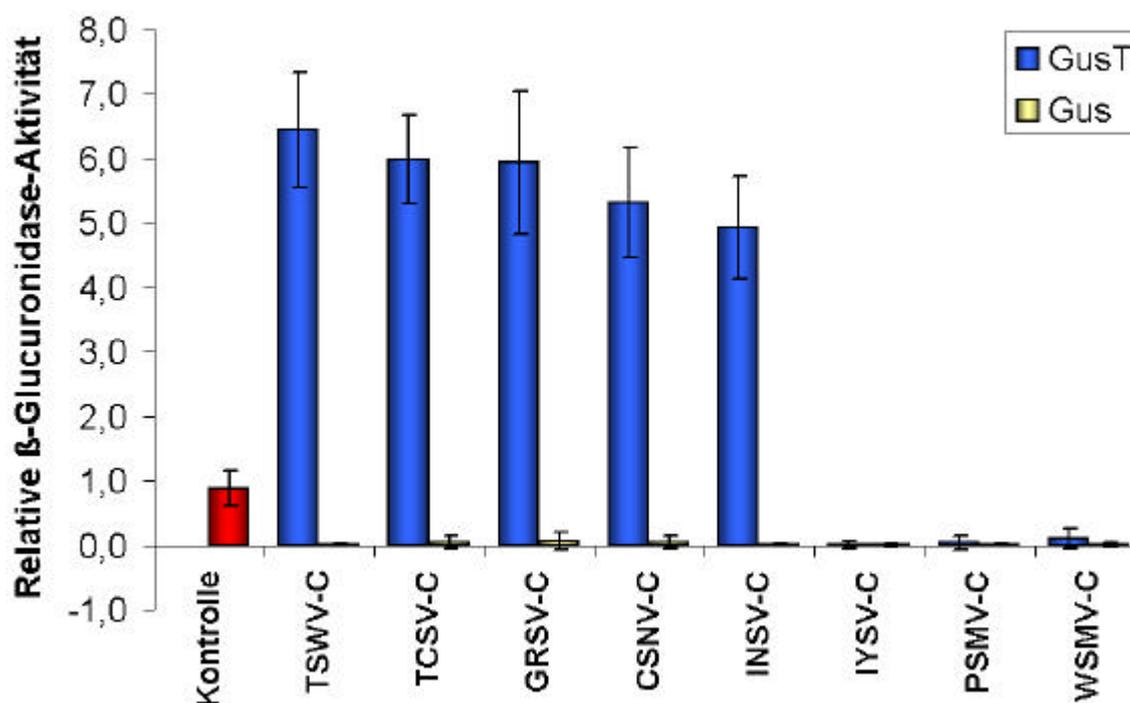


Abbildung 3.25 Quantifizierung der Proteininteraktionen von Gus und GusT mit C-terminalen Deletionen von Tospoviren N-Proteinen

Die jeweils gemessenen Werte für die β -Galaktosidase Expression für GusT sind durch blaue Säulen dargestellt, während gelbe Säulen die Werte für Interaktionen mit Gus darstellen. Als Vergleich und Kontrolle diente die Interaktion der C-terminalen Deletion von TSWV N-Proteins mit einer N-terminalen Deletion von TSWV N-Protein ($N\Delta 39$), in der nur noch die C-terminale Bindestelle aktiv ist. Als Negativ-Kontrolle wurden die leeren Vektoren pAS2-1 und pACT2-1 verwendet. Der erhaltene ONPG-Wert wurde als Null-Wert definiert.

3.4.7 Untersuchung der GusT Expression in rekombinanten *N. benthamiana* Pflanzen

Symptomlose Pflanzen der GusT Linien wurden im Gewächshaus bis zur Samenreife herangezogen und durch einen Kanamycin Resistenztest auf die Expression des *ntpII*-Gens getestet. Pflanzenlinien, deren Nachkommen vollständig gegen Kanamycin resistent waren wurden für weitere Resistenztests ausgewählt. Dieses betraf die Linien GusT 1.5, GusT 5.1, GusT 6.2 und GusT 8.1. Zusätzlich wurde die Linie Gus 5.a als Gus exprimierende Kontroll-Linie ausgewählt. Diese Linien wurden in einem nativen Gel mit anschließender Nachweis der Gus Aktivität auf Expression von Gus bzw. der Gus T-Pep Fusion überprüft. Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass die GusT exprimierenden Linien Gus-Proteine mit einer größeren Molekülgröße enthalten, da sie ein verändertes Laufverhalten in der Gelelektrophorese zeigen. In der getesteten Pflanzenlinie Gus 5.a, die Gus ohne Peptidfusion exprimieren sollte, befand sich eine Bande mit β -Glucuronidase Aktivität und dem gleichen Laufverhalten wie bei Proteinextrakten aus Wildtyp Pflanzen, denen 100ng einer grob gereinigten β -Glucuronidase aus *E. coli* zugemischt wurde. In Pflanzenextrakten aus Wildtyp Pflanzen wurde keine Enzymaktivität festgestellt (Abbildung 3.26).

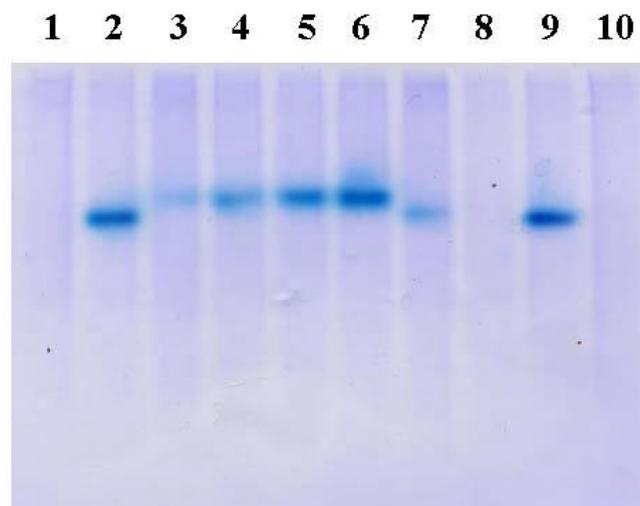


Abbildung 3.26 Nachweis der Gus-Peptid-Fusionen in Pflanzenextrakten

Die Abbildung zeigt ein natives PAA-Gel, in dem Proteinextrakte elektrophoretisch aufgetrennt und Gus Aktivität durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht wurde. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue unspezifisch angefärbt. In den Spuren 1, 2 sowie 8, 9 und 10 befindet sich Pflanzenextrakt von Wildtyp *N. benthamiana* Pflanzen. In den Spuren 2 und 9 wurde zusätzlich noch je 100 ng grob gereinigte β -Glucuronidase aus *E. coli* zugemischt. In den Spuren 3 bis 7 wurden je 20 μ g Proteinextrakt der Pflanzen GusT 1.2; GusT 5.1; GusT 6.2, GusT 8.1 sowie Gus 5.a nativ aufgetrennt..

Die β -Glucuronidase Aktivität der ausgewählten GusT Linien wurde durch einen quantitativen Mikrotiterplatten-Test bestimmt. Hierzu wurden Pflanzen der Linien GusT 1.5, GusT 5.1, GusT 6.2, GusT 8.1, Gus 5.a und Wildtyp Pflanzen im Gewächshaus bis zum Drei- bis Vierblattstadium herangezogen. Anschließend wurden Proteinextrakte aus dem dritten und vierten Blatt für die Aktivitätsbestimmung hergestellt und auf ihre Enzym-Aktivität überprüft. Die Linie GusT 8.1 zeigte die höchste Enzymaktivität mit dem relativen Wert von 2,0. Danach folgten die Linien GusT 5.1 mit 0,9, die Linie GusT 6.2 mit 0,7 und die Linie GusT 1.5 mit 0,4. Die Gus Linie Gus 5.a erreichte den Wert 0,5. Der Extrakt aus Wildtyp Pflanzen zeigte keinerlei Aktivität (Abbildung 3.27).

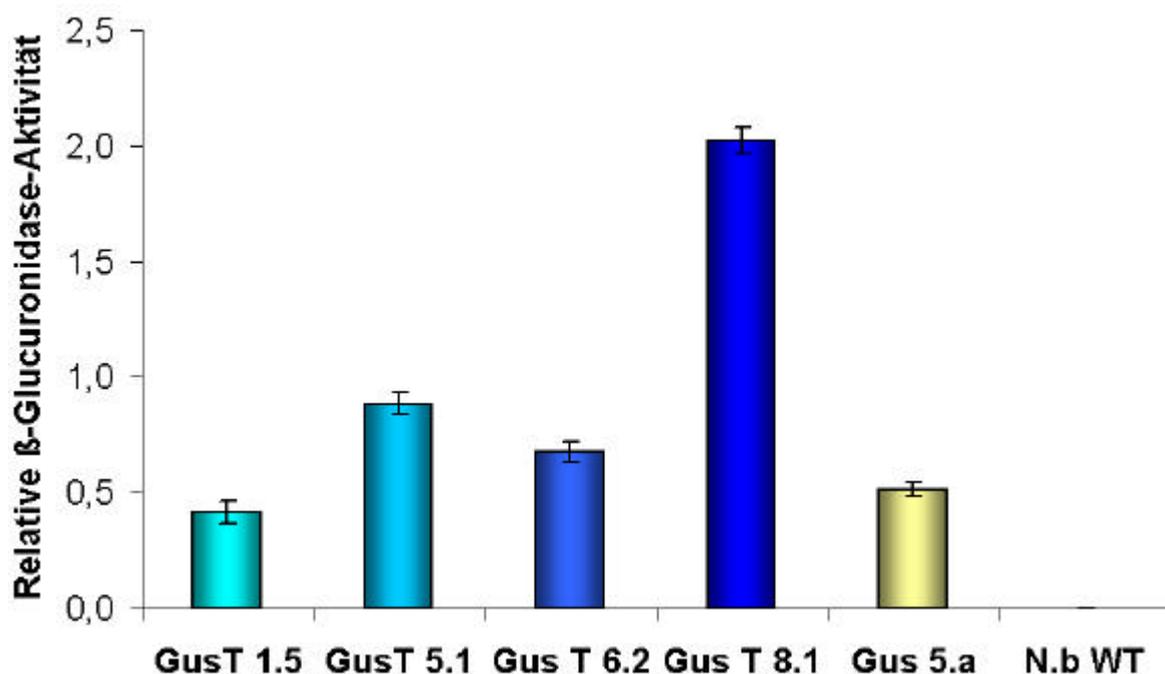


Abbildung 3.27 Quantifizierung der Gus Aktivität in Gus und GusT transgenen *Nicotiana benthamiana* Linien

Proteinextrakte aus dem dritten und vierten Blatt wurden in einem Mikrotiterplattentest auf β -Glucuronidase Aktivität überprüft. Die erhaltenen Werte wurden gegen den Proteingehalt der Extrakte normalisiert. Die Standardabweichung wurde aus vier Messungen ermittelt.

Parallel zur quantitativen Aktivitätsbestimmung wurde ein histologischer β -Glucuronidase Aktivitätstest durchgeführt (Abbildung 3.28). Hierdurch konnte β -Glucuronidase-Aktivität in Blatt-, Hypocotyl- und Wurzelgewebe nachgewiesen werden. Dies betraf die Pflanzenlinien GusT 1.5, GusT 5.1, GusT 6.2, GusT 8.1 und Gus 5.a. In Wildtyp Pflanzen konnte keine Färbung beobachtet werden.

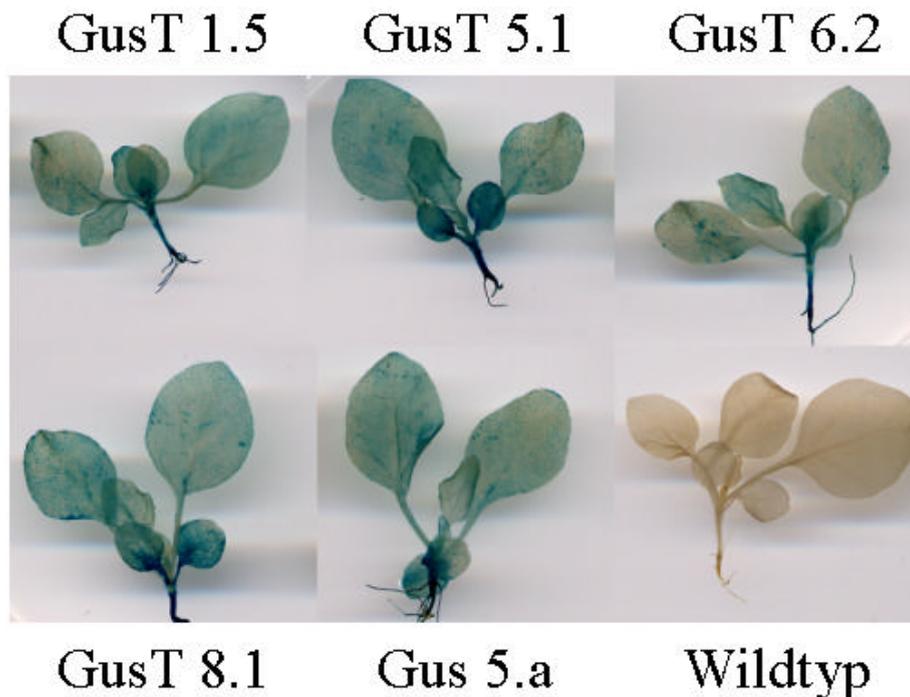


Abbildung 3.28 Histologischer β -Glucuronidase Aktivitätstest

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Linien GusT 1.5, GusT 5.1, GusT 6.2, GusT 8.1 eine β -Glucuronidase Variante exprimieren, deren Laufverhalten in einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf eine Peptidfusion hindeutet. Ein Vergleich dieser Linien ergab, dass die Linie GusT 8.1 eine ca. doppelt so hohe β -Glucuronidase Aktivität wie die Linie GusT 5.1 und eine ca. vierfach erhöhte Aktivität im Vergleich zur Linie GusT 1.5 zeigt. Die gemessene Enzymaktivität ließ sich für alle rekombinanten Linien in Blatt-, Hypocotyl- und Wurzelgewebe nachweisen. Die Linie Gus 5.a exprimiert ein β -Glucuronidase Molekül, welches ein nur geringfügig oder gar nicht geändertes Laufverhalten während einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufweist. Als Vergleich diente eine β -Glucuronidase, die aus *E. coli* gereinigt wurde. Die in allen getesteten Geweben nachgewiesene β -Glucuronidase Aktivität der Linie Gus 5.a bewegt sich zwischen der Aktivität, die für die Linie GusT 1.5 und GusT 6.2 gemessen wurde. Wildtyp Pflanzen zeigten weder in der nativen Gelelektrophorese noch im histologischen β -Glucuronidase Nachweis eine bemerkbare Enzymaktivität.

3.4.8 Resistenztests mit GusT exprimierenden Pflanzenlinien

Die GusT Linien wurden in Resistenztests gegen verschiedene Tospoviren Spezies eingesetzt. Diese Tests wurden wie in Kapitel 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde ein weiterer Resistenztest in einer Klimakammer durchgeführt, bei dem nur sechs Pflanzen pro Linie eingesetzt wurden. Sonst wurde der Test wie beschrieben durchgeführt (Kapitel 2.2.5.2). Die Pflanzen wurden in der Klimakammer nur ca. halb so groß wie Pflanzen, die in einer Gewächshauskammer gehalten wurden, deshalb wurden die in der Klimakammer gemessenen Pflanzenhöhen bei der Bestimmung der mittleren Pflanzenhöhe nicht berücksichtigt. Die erhaltenen Daten sind jedoch bei dem Verhältnis von symptomatischen zu asymptomatischen Pflanzen 23 Tage nach Inokulation berücksichtigt. Als Ergebnis der Resistenztests kann festgehalten werden, dass alle getesteten GusT exprimierenden Pflanzenlinien eine deutliche Resistenz gegen TSWV und GRSV aufweisen. Dies macht sich zum einen darin bemerkbar, dass sich bei diese Pflanzen nach TSWV Inokulation nur eine von 48 inokulierten Pflanzen Symptome aufwies. Bei Inokulation mit GRSV zeigten nur 6 von 96 inokulierten Pflanzen Symptome (Tabelle 3.3), die ca. 10 Tage später als bei der Linie Gus 5.a und den Wildtyp Pflanzen auftraten. In beiden Tests zeigten alle Pflanzen der Linie Gus 5.a sowie die Wildtyp Pflanzen deutliche Symptome und stellten ihr Wachstum ein, so dass sie im Durchschnitt eine Höhe von 6 cm (TSWV) bzw. 3,5 cm (GRSV) erreichten. Die GusT Linien erreichten hingegen eine durchschnittliche Pflanzenhöhe von 34 cm (TSWV) und 33 cm (GRSV) (Abbildung 3.29). Für den Resistenztest mit TCSV ergibt sich ein differenzierteres Bild. Hier zeigten 55 von 72 inokulierten GusT Pflanzen Symptome. Die durchschnittliche Pflanzenhöhe lag bei 11 cm, während die Linie Gus 5.a und der Wildtyp nur 4 cm groß wurden, da alle 18 Pflanzen beider Linien deutliche Symptome entwickelten. Die Linie mit der höchsten GusT Expression (GusT 8.1) zeigte nur bei 9 von 18 TCSV inokulierten Pflanzen Symptome und erreichte eine durchschnittliche Höhe von 19 cm. Nach Inokulation mit INSV zeigten lediglich 3 von 120 inokulierten Pflanzen der GusT Linien keine deutlichen Symptome, wobei aber auch diese Pflanzen im Wachstum zurück blieben. Von den 30 inokulierten Pflanzen der Linie Gus 5.a zeigte eine Pflanze von sechs keine Symptome in der Klimakammer. Alle 24 im Gewächshaus getesteten Pflanzen entwickelten hingegen deutliche Symptome und erreichten eine Höhe von 3 cm. Von den 30 Wildtyp Pflanzen zeigten alle Symptome und wurden nur 4 cm hoch. Die GusT Linien hingegen erreichten eine durchschnittliche Pflanzenhöhe von 5 bis 6 cm, wobei die Linie GusT 8.1 mit 7 cm am höchsten wurde. Dieses bessere Pflanzenwachstum der GusT Linien im Vergleich zu der Linie GusT 5.a und den Wildtyp Pflanzen wurde in drei unabhängigen Inokulationsversuchen beobachtet. In einem Fall

erreichte die hoch exprimierende Linie GusT 8.1 bei einer symptomatischen Pflanze eine Höhe von 19 cm, während alle 12 Pflanzen der Linie Gus 5.a im gleichen Versuch nur eine Höhe von 2 cm erreichten. Dieser Unterschied geht auf eine veränderte Symptomausprägung der GusT Linien zurück, die in dieser Form bei Pflanzen der Linie Gus 5a bzw. den Wildtyp Pflanzen nicht beobachtet wurde. So zeigten manche Pflanzen der GusT Linien deutliche Symptome, setzten ihr Spitzenwachstum aber nach einiger Zeit wieder fort. Die neu gebildeten Blätter zeigten weiterhin Symptome. Diese veränderte Symptomausprägung ist in (Abbildung 3.30) dargestellt. In den Resistenztests mit CSNV wiesen von je 18 Pflanzen des Wildtyps und der Linie Gus 5.a nur 9 bzw. 10 Pflanzen Symptome auf, was einer Infektionsrate von 50% bzw. 55% entspricht. Von den insgesamt 72 inokulierten GusT Pflanzen zeigte hingegen keine Symptome. Es kann also auch hier von einer Resistenz gesprochen werden, da eine deutlich reduzierte Infektionsrate beobachtet wurde. In Resistenzversuchen mit PSMV zeigten von den je 24 infizierten Gus 5.a und Wildtyp Pflanzen 16 bzw. 14 Pflanzen Symptome. Dies entspricht einer Infektionsrate von 67% bzw. 58%. In den GusT Linien wurden von 60 inokulierten Pflanzen 42 symptomatisch. Dies entspricht einer Infektionsrate von 70% und kann keine Resistenz gegen PSMV beobachtet werden (Tabelle 3.3).

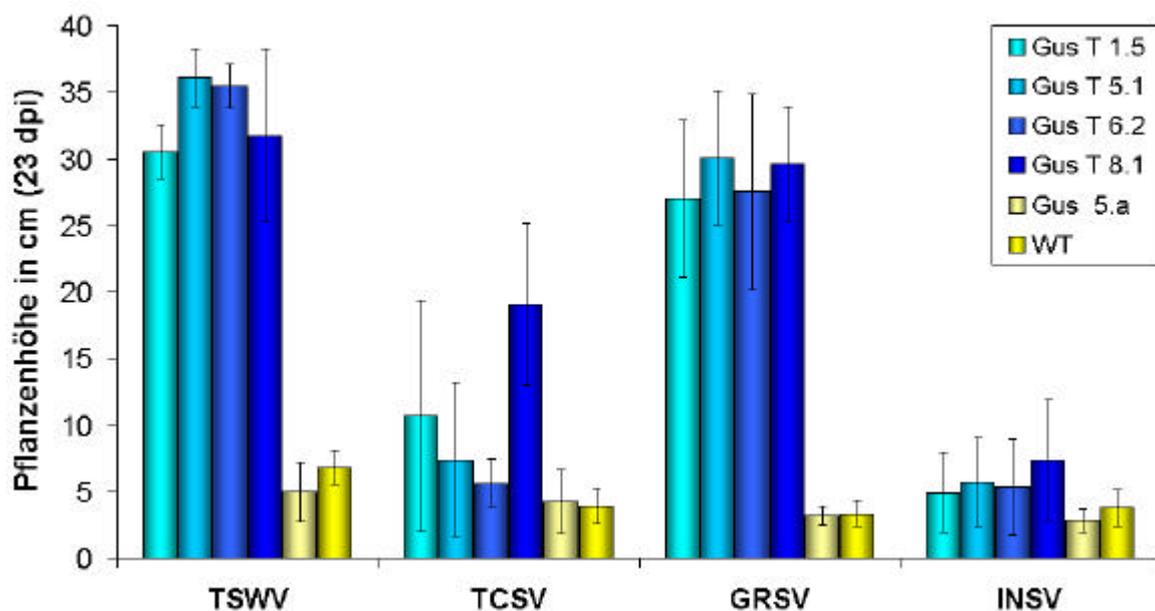


Abbildung 3.29 Durchschnittliche Pflanzenhöhe der GusT Linien 23 Tage nach Infektion mit verschiedenen Tospoviren

Die Fehlerbalken stellen die einfache Standardabweichung dar.

Zusammenfassend wurde eine hohe Resistenz der GusT Linien gegenüber TSWV und GRSV gezeigt. Gegen TCSV konnte eine Resistenz gemessen werden, die sich in einer Infektionsrate von 76% im Vergleich zu 100% bei der Linie Gus 5.a und dem Wildtyp äußert. Weiterhin wurde für CSNV eine deutlich reduzierte Infektionsrate festgestellt. Bei der Infektion mit INSV hingegen zeigten die GusT Linien keine reduzierte Infektionsrate. Es wurde aber beobachtet, dass die GusT Linien eine veränderte Symptomausprägung und hierdurch eine höhere durchschnittliche Pflanzenhöhe erreichten. Die Linie mit der höchsten GusT Expression (GusT 8.1) zeigte hier, ebenso wie bei der Infektion mit TCSV, den größten Effekt. Gegen PSMV konnte keine Resistenz festgestellt werden. Es wurde folglich gezeigt, dass die Expression einer Mikrodomäne aus dem TSWV N-Protein mit nur 29 Aminosäuren Länge eine sehr hohe Resistenz gegen TSWV und GRSV und eine deutliche Reduktion in der Infektionsrate für TCSV und CSNV sowie eine veränderte Symptomausprägung für INSV erzeugen kann. Damit ist für alle Viren der Interaktionsgruppe von TSWV N-Protein (Kapitel 3.2.1) eine Wirkung nachgewiesen worden, während für PSMV, welches zu einer anderen Interaktionsgruppe zählt, auch eine Wirkung ausbleibt. Eine Zusammenstellung der beobachteten Resistenz ist in Tabelle 3.3 zu sehen.

Tabelle 3.3 Das Verhältnis von symptomatischen zu asymptomatischen GusT *Nicotiana benthamiana* Pflanzen 23 Tage nach Infektion mit verschiedenen Tospoviren

	TSWV	TCSV	GRSV	CSNV	INSV	PSMV
Gust 1.5	0 / 12	13 / 18	1 / 24	0 / 18	30 / 30	11 / 12
Gust 5.1	0 / 12	17 / 18	0 / 24	0 / 18	29 / 30	7 / 12
Gust 6.2	0 / 12	16 / 18	5 / 24	0 / 18	29 / 30	10 / 12
Gust 8.1	1 / 12	9 / 18	0 / 24	0 / 18	29 / 30	14 / 24
Gus 5.a	12 / 12	18 / 18	22 / 22	10 / 18	29 / 30	16 / 24
Wildtyp	12 / 12	18 / 18	24 / 24	9 / 18	30 / 30	14 / 24

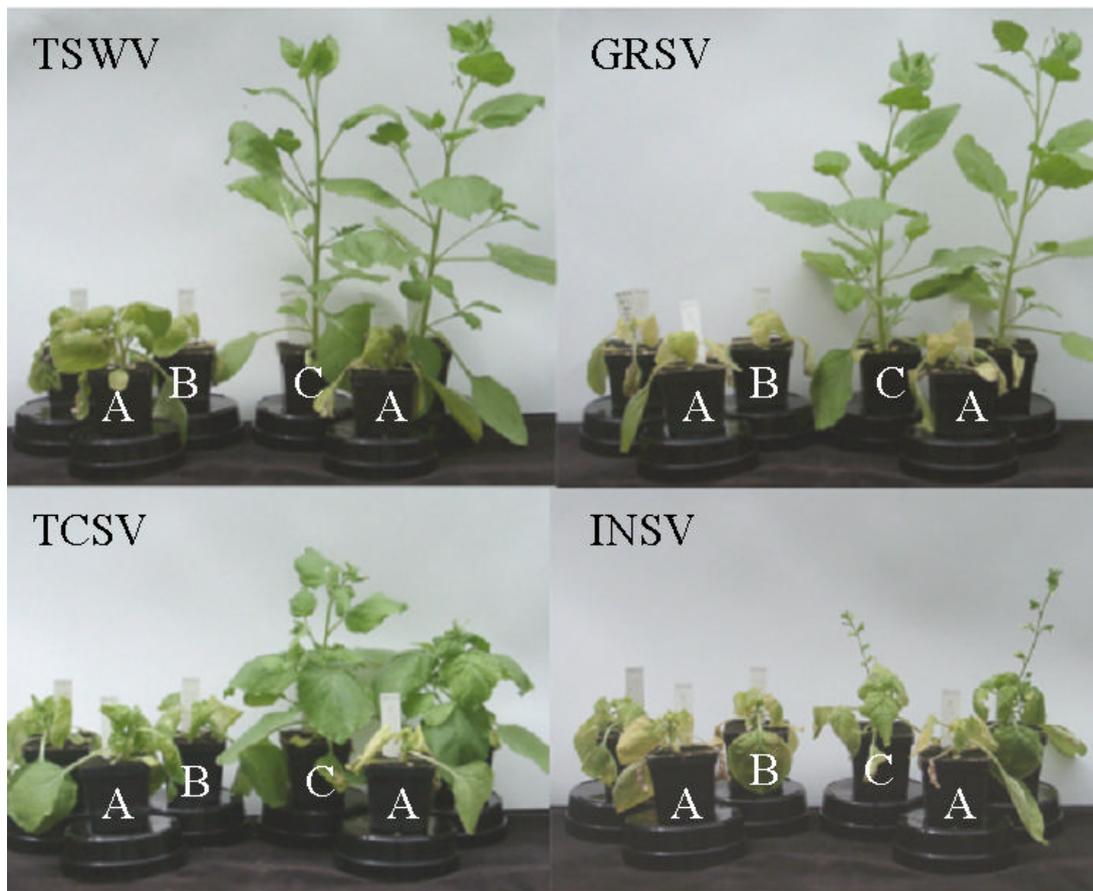


Abbildung 3.30 Abbildung von GusT transgenen Pflanzen im Vergleich zur Vektorkontrolle Gus 5.a sowie Wildtyppflanzen

In der jeweils linken oberen Ecke sind die inokulierten Viren notiert. Die mit A bezeichneten Pflanzen stellen Wildtyppflanzen dar, die als Infektionskontrolle dienen. Dahinter befinden sich je zwei Pflanzen der Vektorkontrolle Gus 5.a (mit B markiert) bzw. zwei Pflanzen der Linie GusT 8.1 (mit C markiert).

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen zur N-Protein vermittelten Resistenz

Für rekombinante Tabackpflanzen, die die Sequenz des TSWV N-Proteins enthalten, ist mehrfach Resistenz gegen TSWV beobachtet worden. Die Resistenz gliederte sich in zwei Gruppen. Pflanzen mit einem RNA vermittelten Resistenzmechanismus zeigten eine sehr hohe jedoch spezifisch gegen TSWV gerichtete Resistenz. Diese Pflanzen exprimierten kein oder nur sehr wenig N-Protein (de Haan et al. 1992; Pang et al. 1993). Pflanzen, die das N-Protein hoch exprimierten zeigten hingegen zusätzlich Resistenz gegen andere Tospoviren wie z.B. GRSV und INSV (Pang et al. 1992; Pang et al. 1993). Diese Resistenz hatte aber in der Regel nur eine verzögerte Symptomausprägung bzw. eine Reduktion der Infektionsrate zur Folge. Die Reduktion in der Infektionsrate kann aber auch bei N-Protein exprimierenden Pflanzen zu völliger Symptomfreiheit führen, wie für drei TSWV inokulierte Pflanzenlinien berichtet wurde (MacKenzie et al. 1992).

In der Arbeitsgruppe Schreier wurde an einer Variante der Nucleokapsidprotein vermittelten Tospovirus Resistenz gearbeitet (Schreier et al. 1994, 1996). Das Nucleokapsidprotein wurde hier unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors und einem translationalen Verstärkers aus Plum pox potyvirus exprimiert. Zwei der erhaltenen Pflanzenlinien (XL 8.28 und XL 7.1) zeigten völlige Symptomfreiheit nach Inokulation mit TSWV, TCSV und GRSV. Die Kontroll-Linie ohne den translationalen Verstärker (X 15.1), erwies sich als vollständig anfällig und zeigte in einigen Fällen sogar stärkere Symptome im Vergleich zum Wildtyp (Prof. Dr. Schreier mündliche Mitteilung) und (Schwach 2002). Immunodetektionen zeigten, dass die resistenten Linien ein modifiziertes Nucleokapsidprotein mit einer 23 Aminosäure langen N-terminalen Peptidfusion, die anfällige Linie aber ein unmodifiziertes N-Protein exprimierte. Die Peptidfusion geht auf ein Startcodon des gleichen Leserasters zurück, welches alternativ zum Startcodon des TSWV N-Proteins verwendet wird. Die Expression eines modifizierten Nucleokapsidproteins in Verbindung mit einer besonders hohen Resistenz zeigte starke Ähnlichkeit zu einer Hüllprotein vermittelten Resistenz gegen zwei Stämme von Potato Y Potyvirus (PVY) (Hefferon et al. 1997). Hier wurde ein Hüllprotein von PVY mit einer 14 Aminosäuren lange N-terminale Peptidaddition mittels eines translationalen Verstärkers aus Potato X potexvirus (PVX) exprimiert. Dies führte zu einer besonders starken Resistenz, die durch alleinige Expression des Hüllproteins nicht erreicht werden konnte.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob sich die als letzte erwähnte Resistenz grundsätzlich von der weiter oben erwähnten Tospovirus Resistenz unterscheidet.

4.1.1 Proteininteraktionen der Tospoviren N-Proteine und der N-Protein Peptid Fusionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Da in den resistenten Pflanzen eine N-Protein Variante mit einer 23 Aminosäuren langen Peptidaddition exprimiert wurde, war ein möglicher Resistenzmechanismus eine Störung des Nucleokapsidaufbaus. Es war bereits bekannt, dass das Nucleokapsidprotein (N-Protein) eine N-terminale und eine C-terminale Bindestelle besitzt, die sich gegenseitig binden können. Dies führte zu einem Modell der Proteinbindung (Uhrig et al. 1999), welches in der Abbildung 4.1 dargestellt ist. Die N-terminale Peptidaddition könnte die normale Wechselwirkung der N-Proteine beeinflussen und den Nucleokapsidaufbau behindern. Um dies zu überprüfen wurden die Proteinbindungseigenschaften von zwei N-Protein Varianten (M_2 und Art), die beide eine N-terminale Peptidfusion von 23 Aminosäuren trugen, im Vergleich zum TSWV N-Protein getestet. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde festgestellt, dass sich alle Proteine gleich verhielten (Kapitel 3.2).

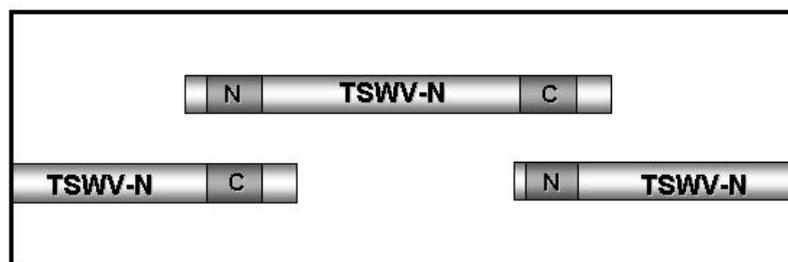


Abbildung 4.1 Modell zu N-Protein-Wechselwirkungen

In diesem Modell sind die Wechselwirkungen der N-Proteine über ihre jeweiligen N- und C-terminalen Bindestellen schematisch dargestellt.

Des weiteren wurde beobachtet, dass die N-Proteine von acht unterschiedlichen Tospovirenspezies zwei Interaktionsgruppen bilden, deren Mitglieder sich in beliebiger Kombination binden können. Eine Interaktionsgruppe umfasst die N-Proteine von TSWV, TCSV, GRSV, CSNV, und INSV. Eine andere Interaktionsgruppe umfasst die N-Proteine von IYSV, PSMV und WSMV. Es konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Bindestelle des N-Proteins (Uhrig et al. 1999), anhand eines Sequenzvergleiches vorausgesagt werden kann, indem C-terminale Deletionen aller verwendeten N-Proteine hergestellt und auf Interaktion getestet (Abbildung 3.5) wurden. Diese Tests ergaben, dass die Lage der C-terminalen Bindestelle bis zu Proteinen mit nur noch 26% Sequenzidentität zu TSWV N-Protein konserviert ist. Mittels C-terminalen Deletionen wurden festgestellt, dass die oben beschriebenen Interaktionsgruppen für beide Bindungsstellen gültig sind (Abbildung 3.4). Es gab lediglich zwei Ausnahmen bei denen

die N-terminale Bindestelle von IYSV N-Protein betroffen war, die keine Interaktion mit der C-terminalen Bindestelle von PSMV und WSMV N-Protein zeigte. Da die reziproken Interaktionen gezeigt werden konnten, geht dies wahrscheinlich auf konkurrierende Interaktionen der Wildtyp N-Proteine zurück, da diese noch zwei funktionsfähige Bindestellen besitzen und somit starke Bindungen eingehen können. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für die getesteten N-Proteine zwei Interaktionsgruppen bestehen, welche für beide Bindestellen der N-Proteine gültig sind. Die funktional wichtigen Aminosäuren innerhalb einer Interaktionsgruppe müssen daher stark konserviert sein. Die Lage der C-terminalen Bindestelle konnte genauer bestimmt werden, da die Peptide T-Pep und W-Pep alle N-Proteine der jeweiligen Interaktionsgruppe binden können (Abbildung 3.22). Ein Sequenzvergleich der jeweils homologen Aminosäuresequenzen aus zwölf N-Proteinen unter Berücksichtigung der C-terminalen Deletionen grenzt die Position der C-terminalen Bindestelle weiter ein. Sie befindet sich wahrscheinlich zum größten Teil im C-terminalen Bereich der Peptide. Hier befindet sich neben einer höheren Sequenzkonservierung, verglichen mit dem N-terminalen Bereich auch die für die C-terminale Bindestelle benötigten Phenylalanine F242 und F246 (Uhrig et al. 1999).

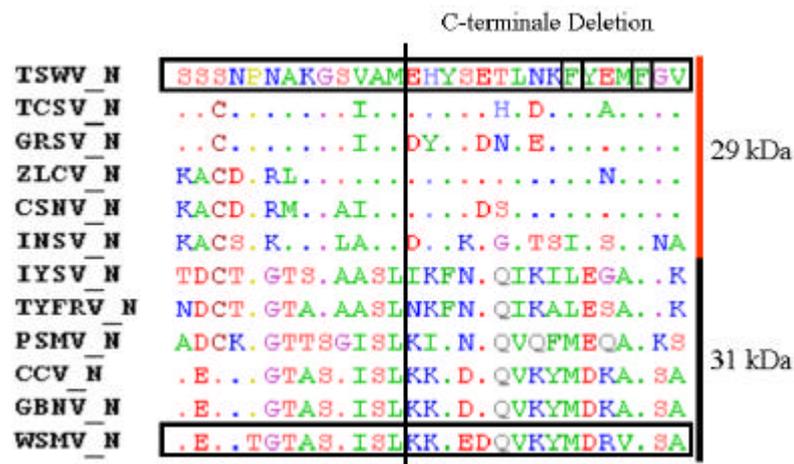


Abbildung 4.2 Sequenzvergleich der C-terminalen Binderegionen von zwölf N-Proteinen

Abgebildet sind die Aminosäuresequenzen von N-Proteinen, die jeweils homolog zu der Sequenz von T-Pep und W-Pep sind. Die Sequenzen sind im „Ein-Buchstaben-Kode“ wiedergegeben. Identische Aminosäuren zur TSWV Sequenz sind durch Punkte kenntlich gemacht. Die Sequenz von T-Pep ist in der entsprechenden TSWV Sequenz durch einen schwarzen Rahmen kenntlich gemacht. Weitere kleine Rahmen markieren die funktional wichtigen Phenylalanine (F) Nr. 242 und 246. In der Sequenz von WSMV ist die Sequenz von W-Pep mit einem schwarzen Rahmen kenntlich gemacht. Ein schwarzer bzw. roter Balken links neben den Sequenzen spiegelt die Zugehörigkeit zur jeweiligen Interaktionsgruppe wider. Neben den Balken für die Interaktionsgruppen ist das Molekulargewicht der jeweiligen Proteine in Kilodalton angegeben. Ein senkrechter schwarzer Balken in den Sequenzen gibt den Lage der C-terminalen Deletion des jeweiligen N-Proteins an, bei der alle Aminosäuren, die links neben dem senkrechten Balken liegen entfernt wurden.

Für die zweite Interaktionsgruppe von WSMV, PSMV und IYSV N-Protein führt der obige Sequenzvergleich ebenfalls zu der Annahme, dass sich die C-terminale Bindestelle in dem C-terminalen Bereich des W-Peptids befindet. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass das W-Peptid alle Mitglieder dieser Interaktionsgruppe binden kann, während die C-terminalen Deletionen ihre C-terminale Bindestelle verloren haben.

Die Tatsache, dass die Bindestellen über einen weiten Verwandtschaftsgrad der N-Proteine funktionell konserviert sind lässt darauf schließen, dass ein hoher Selektionsdruck auf den Bindestellen liegt. Dies ist verständlich, da sich eine veränderte Bindungskonstante auf den Nucleokapsidaufbau auswirken würde. Da aber das Nucleokapsid für die Transkription und Replikation des Virus und wahrscheinlich auch für den viralen Transport benötigt wird (Kormelink et al. 1994; Steinecke et al. 1998), wäre eine Virusmutante mit einem ineffizienten Nucleokapsidaufbau stark benachteiligt. Die Interaktionsgruppen verhalten sich analog zu dem Verwandtschaftsgrad der getesteten Viren, der anhand von N-Protein und NSm-Protein Sequenzähnlichkeiten aufgestellt wurde (Silva et al. 2001). Silva et al. teilen diese Viren in eine Amerikanische und in eine Eurasische Gruppe ein, wobei Viren beider Gruppen mittlerweile in beiden Verbreitungsgebieten zu finden sind. TSWV ist z.B. weltweit verbreitet. Eine phylogenetische Rekonstruktion, die anhand der N-Protein Sequenzen erstellt wurde ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Die Amerikanische Verwandtschaftsgruppe fällt mit der Interaktionsgruppe von TSWV, TCSV, GRSV, CSNV und INSV zusammen. Es kann daher vermutet werden, dass auch das nicht getestete N-Protein von ZLCV zu dieser Interaktionsgruppe gehört. Die zweite Interaktionsgruppe von WSMV, PSMV und IYSV fällt mit der Eurasischen Virengruppe zusammen, wobei PSMV bei Silva et al (Silva et al. 2001) nicht berücksichtigt wurde. Anhand des in Abbildung 3.7 gezeigten N-Protein Stammbaums lässt es sich aber in diese Gruppe einordnen.

4.1.2 Untersuchung der N-Protein vermittelten Resistenz in *N. tabacum* var.

Samsun und *N. benthamiana*

Es wurden rekombinante Pflanzenlinien hergestellt, die das TSWV N-Protein bzw. seine Variante mit einer N-terminalen Peptidfusion exprimierten. Von diesen wurden sechs *N. tabacum* var Samsun Linien und sechs *Nicotiana benthamiana* Linien für Resistenztests ausgewählt. Als Kontrolle dienten die jeweiligen Wildtyp Pflanzen und die Linien XL 8.28 und X 15.1 (Kapitel 4.1). Da infizierte Pflanzen das Längenwachstum einstellen bzw. stark verlangsamen, wurde die mittlere Pflanzenhöhe aller Pflanzen pro Linie verglichen und als Messgröße für die Stärke der Resistenz verwendet.

Eine ähnlich hohe TSWV-Resistenz wie die der Linie XL 8.28, die sich in völliger Symptommfreiheit äußerte, konnte nur mit einer neu hergestellten *N. tabacum* var Samsun Linie (M_2 / 3.1) nachvollzogen werden. Alle anderen Linien bewegten sich in ihrer Symptomausprägung und in ihrer erreichten Pflanzenhöhe zwischen der resistenten Linie XL 8.28 und der anfälligen Linie X 15.1 die im Verhältnis zum Wildtyp eine leicht verzögerte Symptomausprägung zeigte (Abbildung 3.10). Die hoch resistente *N. tabacum* Linie M_2 / 3.1 zeigt in einem DAS-ELISA mit Proteinextrakten aus Keimlingen Proteinexpression. In einer Immunodetektion mit Proteinextrakten aus dem dritten und vierten Blatt konnte für diese Linie aber keine Expression nachgewiesen werden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass in dieser Linie die hohe TSWV-Resistenz auf einen RNA vermittelten Mechanismus zurückgeht, der erst einige Zeit nach der Keimung voll etabliert wird. In der Literatur wird in mehreren Fällen ein sequenzspezifischer RNA Abbau beschrieben, der sich erst in älteren Pflanzen voll auswirkt (Elmayan et al. 1996; Sonoda et al. 2000). Dies wurde auch für rekombinante Salatpflanzen gezeigt, die das TSWV N-Gen exprimierten (Pang et al. 1996). Es kann für diese Linie folglich nicht entschieden werden, ob die hohe TSWV-Resistenz auf einem Protein oder RNA vermittelten Mechanismus beruht.

Vergleicht man die Expressionsstärke der verschiedenen Linien miteinander, so scheint keine Korrelation zwischen der Expressionsstärke der Proteine und der beobachteten Resistenz zu bestehen, da die Linie XL 8.28 am wenigsten Protein exprimiert aber die höchste Resistenz zeigt, während hoch exprimierende *N. tabacum* Linien wie die Linien X 15.1, M_1 / 1.1 und M_1 / 14.3 und die hoch exprimierenden *N. benthamiana* Linien M_1 / 3.2.1 und M_1 / 14.1.1. nur eine schlechte oder keine Resistenz zeigen. Es wurden aber auch hoch exprimierende Linien beobachtet, die eine relativ hohe Resistenz zeigen (z.B. *N. tabacum* Linie M_1 / 1.1) bzw. Linien, die wenig Protein exprimieren und anfällig sind (z.B. *N. benthamiana* Linie M_2 / 8.1).

Ob in den Pflanzen das TSWV N-Protein mit oder ohne N-terminale Peptidfusion exprimiert wird, hatte keinen Einfluß auf die Resistenz, da für beide Typen Linien gefunden wurden, die anfällig bzw. resistent waren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch für Wildtyp TSWV N-Protein exprimierende *N. tabacum* var Samsun Pflanzen eine Resistenz erzeugt werden kann, die sich zwar nicht in völliger Symptomlosigkeit äußert, aber eine deutlich verzögerte Symptomausprägung und somit ein höheres Pflanzenwachstum hervorruft (Linie Art / 1.1 in Abbildung 3.11). Es kann daher festgestellt werden, dass die vorgestellten Ergebnisse (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeiten sind (Gielen et al. 1991; MacKenzie et al. 1992; Pang et al. 1992). Die Unterschiede in der Resistenzausprägung zwischen den *N. tabacum* Linien XL 8.28 und X 15.1 scheinen eher Extremwerte für eine erreichbare Resistenz zu sein, als dass sie einen grundsätzlichen Unterschied im Resistenzmechanismus anzeigen. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass in mindestens drei *N. tabacum* var Samsun Linien, die ein TSWV N-Protein unter der Kontrolle eines doppelten CaMV 35S-Promoters exprimierten, völlige Symptomlosigkeit nach Inokulation mit TSWV auftrat (MacKenzie et al. 1992). Weiterhin wurde festgestellt, dass die Verwendung eines translationalen Verstärkerelements aus dem Plum pox potyvirus Genom keine besonders hohe Resistenz garantiert, da alle neu getesteten Konstrukte dieses Element enthielten und unter anderen auch stark anfällige Linien erzeugt wurden. Die in Kapitel 4.1 geäußerte Vermutung, dass die hohe Resistenz der Linie XL 8.28 in mechanistischer Weise von anderen TSWV N-Protein vermittelten Resistenzen verschieden und analog zu den Ergebnissen für eine besonders hohe PVY-Resistenz ist (Hefferon et al. 1997), kann daher nicht unterstützt werden.

Die sechs *N. benthamiana* Linien wurden in weiteren Resistenztests gegen TCSV, GRSV, CSNV, INSV, PSMV und WSMV getestet. Für die Viren TCSV und GRSV wurde wie für TSWV (siehe oben) eine Verzögerung der Symptombreitung und/oder eine reduzierte Infektionsrate beobachtet. Als beste Linien erwiesen sich die Linien M_1 / 12.4, M_2 / 4.3 und M_2 / 7.1. (Abbildung 3.15 und Tabelle 3.2). Die Resistenz verschlechterte sich für die Viren TCSV und GRSV, war aber immer noch gut sichtbar.

Gegen weiter entfernt verwandte Viren wie CSNV, INSV, PSMV und WSMV verhielten sich alle sechs getesteten Linien gleich d.h. alle Linien reagierten gegen ein Virus entweder mit einer sehr hohen Resistenz, oder waren komplett anfällig. Wie schon für die Resistenz gegen TSWV, TCSV und GRSV hatte die Art des exprimierten N-Proteins (Wildtyp oder M_2 Protein) keinen Einfluß auf die ausgeprägte bzw. nicht vorhandene Resistenz.

Nach Infektion mit INSV und PSMV trat völlige Symptomlosigkeit auf. Von allen 180 getesteten rekombinanten Pflanzen zeigte lediglich eine PSMV inokulierte Pflanze

verspätet auftretende Symptome. Bei Infektionsversuchen CSNV und WSMV konnte keine Resistenz beobachtet werden (Abbildung 3.15 und Tabelle 3.2).

4.1.3 Diskussion eines N-Protein vermittelten Resistenzmechanismus in *N. tabacum* var. Samsun und *N. benthamiana*

Man kann vermuten, dass eine vorhandene bzw. nicht vorhandene transgen vermittelte Pflanzenresistenz aus drei Komponenten resultiert. Erstens virale Fitness, die die Fähigkeit des Virus beschreibt, sich in der angesprochenen Pflanze effektiv vermehren und verbreiten zu können sowie evtl. vorhandene Gegenmaßnahmen der Pflanze zu unterbinden. Die zweite Komponente würde durch das Transgen geliefert, welches virale Prozesse in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst. Die dritte Komponente wäre der physiologischen Zustand der Pflanze, die z.B. bei einer chemisch induzierten Resistenz oder durch „Pathogen-induzierte-Resistenz“ einen Vorteil gegenüber dem Virus gewinnt. Für eine Resistenz gegen unterschiedliche Viren muss weiterhin bedacht werden, dass sich die Viren nicht nur in ihrer Fähigkeit zur effektiven Vermehrung und Ausbreitung in der Pflanze, sondern auch in ihrer Fähigkeit zur Unterbindung der viralen Abwehr unterscheiden. Zusätzlich kann die stärkste Beeinflussung unterschiedlicher viraler Funktionen durch ein multifunktionales Protein wie z.B. das TSWV N-Protein für verschiedene Viren unterschiedliche virale Prozesse betreffen. Eine breite Virusresistenz ist also das Resultat eines hoch komplexen Vorgangs, dessen Zustandekommen für unterschiedliche Viren auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen kann.

In den hier studierten Resistenzen traten zwei unterschiedliche Gruppen auf. Im Resistenzverhalten gegen TSWV, TCSV und GRSV reagierten die einzelnen Pflanzenlinien unterschiedlich stark auf das Virus und zeigten völlige Anfälligkeit oder eine stark reduzierte Virusausbreitung bzw. eine deutlich reduzierte Infektionsrate. Die Resistenz bzw. Anfälligkeit gegen CSNV, INSV, PSMV und WSMV, entsprach eher einer „Alles oder Nichts“-Reaktion, wobei entweder eine völlige Anfälligkeit aller Linien oder eine völlige Resistenz auftrat (Abbildung 3.15 und Tabelle 3.2). Diese klare Trennung von moderater Resistenz gegen nah verwandte Viren und hoher Resistenz gegen entfernt verwandte Viren deutet auf unterschiedliche Resistenzmechanismen hin. Die variable Resistenz gegen TSWV, TCSV und GRSV lässt sich nicht durch eine einfache RNA-vermittelte Resistenz erklären, da diese normalerweise zu einer völligen Immunität der Linie gegen TSWV und zu einer Anfälligkeit gegen TCSV und GRSV führen würde (de Haan et al. 1992) und (Prins et al. 1995). Es ist folglich anzunehmen, dass ein Protein vermittelter Mechanismus vorliegt. Häufig haben virale Hüll- bzw. Nucleokapsidproteine mehrere Funktionen (Callaway et al. 2001). Dies gilt auch für das TSWV N-Protein.

Zu diesen Funktionen sind neben dem Aufbau des Nucleokapside (Uhrig et al. 1999) und der Bindung an RNA (Riechmond et al. 1998), der Zell-zu-zell- und Langstreckentransport (Soellick 2000), eine vermutete Regulation der viralen RNA-Polymerase und eine Funktion bei der Bildung von Membran umhüllten Viruspartikeln zu zählen (Kormelink et al. 1994; Steinecke et al. 1998; Kikkert et al. 1999). Da das TSWV N-Protein mit den TCSV und GRSV im Hefe-Zwei-Hybrid-System interagiert, könnte das rekombinant exprimierte N-Protein über alle seine nachgewiesenen und vermuteten Funktionen mit der viralen Entwicklung interferieren.

Das rekombinant exprimierte TSWV N-Protein scheint virale Prozesse, für die nah verwandten Viren (TSWV, TCSV, GRSV), nicht zu unterbinden, sondern nur zu deregulieren. Dies könnte es wiederum der Pflanze ermöglichen rechtzeitig eine virale Abwehr aufzubauen, bevor dieser Vorgang von evtl. vorhandenen Pathogenitätsfaktoren des Virus unterbunden wird. Die Vermutung, dass die Resistenzen auf einer Deregulation viraler Funktionen beruht, wird dadurch unterstützt, dass auch hoch exprimierende Linien wie z.B. die *N. benthamiana* Linie M_1 / 14.1.1 oder die *Nicotiana tabacum* Linie X 15.1 gegen TSWV, TCSV und GRSV stark anfällig sein können und in den resistenten Pflanzen meist eine verzögerte Symptomausprägung anstelle einer völligen Resistenz beobachtet wird.

Die mangelnde Korrelation von Expressionsstärke und Resistenz könnte zumindest für TSWV auf einen Mischeffekt von Protein vermittelten Mechanismen und RNA vermittelter Resistenz zurückgehen, die sich gegenseitig beeinflussen würden. Ein direkter RNA vermittelter Effekt auf andere Viren wird nicht angenommen, da die RNA Sequenzidentitäten aller anderen Viren unter 80% liegen. Gleichfalls wurde bei RNA vermittelten Resistenzen gegen TSWV keinerlei Effekte auf andere Viren beobachtet, die weniger als 99% Sequenzidentität zu TSWV hatten (de Haan et al. 1992; Pang et al. 1993; Pang et al. 1994). Es wurde zwar gezeigt, dass ein Sequenzstück von 110bp Länge in einem chimären Gen mit einer Sequenzähnlichkeit von 100% zu TSWV ausreichend ist um eine Resistenz gegen TSWV auszulösen (Jan et al. 2000), es können aber in den Genomsequenzen der Viren TCSV und GRSV keine ähnlich langen Stellen gefunden werden, die zu 100% mit der RNA-Sequenz des rekombinant exprimierten Gens übereinstimmen. Für diese Viren wird ein RNA vermittelter Mechanismus daher ausgeschlossen.

Eine nicht vorhandene oder nur schlechte Korrelation zwischen Expressionsstärke und Resistenz tritt aber nicht nur für die N-Protein vermittelte Resistenz auf, sondern ist ein großes Problem in der Resistenzforschung und wurde mehrmals beobachtet (Stark et al. 1989; Barker et al. 1998; Jacquemond et al. 2001). Sollte dies nicht mit einer optimalen Expressionsstärke des Transgens zusammenhängen, so kann dies nur mit einem

unterschiedlichen Zustand der Pflanzen erklärt werden. Das TSWV N-Protein könnte in den Pflanzen in unterschiedlicher Form vorliegen, so könnte z.B. der Oligomerisierungsgrad oder die Lokalisation in der Zelle sowie die Expressionsstärke in einzelnen Geweben differieren. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass rekombinant exprimiertes N-Protein Veränderungen in der Pflanze hervorruft, die noch völlig unbekannt sind, aber zu einer erhöhten Tospovirus Resistenz führen. So ist z.B. bekannt, dass Tabak Pflanzen mit einer systemisch erworbenen Resistenz (SAR) eine um 80% reduzierte Anfälligkeit gegen TSWV zeigen (Oostendorp et al. 2001). Dies zeigt dass Änderungen im Expressionsmuster phänotypisch unauffälliger Pflanzen Tospovirus Resistenz erzeugen kann.

Bemerkenswert ist, dass das Spektrum der Virusresistenz nicht mit den N-Protein Interaktionsgruppen, die in Kapitel 3.2 beschrieben wurden und in Kapitel 4.1.1 diskutiert sind, übereinstimmt. Dies wird besonders deutlich für die hohe Resistenz aller Linien gegen PSMV, und die völlige Anfälligkeit aller Linien gegen CSNV. Es sei daran erinnert, dass PSMV N-Protein keine Interaktion zu TSWV N-Protein zeigt, CNSV N-Protein aber interagieren kann. Die Interaktion des rekombinant exprimierten N-Proteins mit dem N-Protein des inokulierten Virus scheint folglich keine oder nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die hohe Resistenz aller Linien gegen INSV und PSMV lässt darauf schließen, dass ein wichtiger Mechanismus des jeweiligen Virus gestört wird. Bedenkt man die Tatsache, dass diese Viren nur sehr entfernt verwandt mit TSWV sind und dass sich Bindedomänen für unterschiedliche Proteininteraktionen eines Proteins unterschiedlich schnell evolutiv verändern können, so erscheint es wahrscheinlich, dass das rekombinant exprimierte TSWV N-Protein zwar einige Funktionen der N-Proteine von INSV und PSMV weiterhin erfüllen kann, für andere Funktionen aber als Defekt-Mutante gelten kann. Das Virus würde daher in diesen Funktionen stark gestört werden. Dieser Mechanismus setzt aber gleichzeitig eine Funktion des N-Proteins voraus, die evolutiv so stark konserviert ist, dass das TSWV N-Protein mit der viralen Entwicklung interferieren kann.

Eine solche Funktion könnte z.B. die Enkapsidierung viraler Genomteile sein. Die stark konservierten Enden der Tospovirengenome enthalten Sequenzen, die mit hoher Affinität von TSWV N-Protein gebunden werden (Gregor Bucher, mündliche Mitteilung). Diese Enden sind nicht nur stark konserviert, sondern unterscheiden sich zwischen den einzelnen Genomsegmenten eines Virus stärker als zwischen den gleichen Genomsegmenten unterschiedlicher Virusspezies (Abbildung 4.3). Damit sind sie stärker konserviert als die Proteinsequenzen und wahrscheinlich auch stärker als die Protein-Protein-Interaktionen. Durch Transkapsidierung könnten so disfunktionale INSV und

PSMV Genomteile entstehen, die eine weitere Virusvermehrung stark beeinflussen könnten. Dieses Modell bedarf aber noch einer experimentellen Überprüfung.

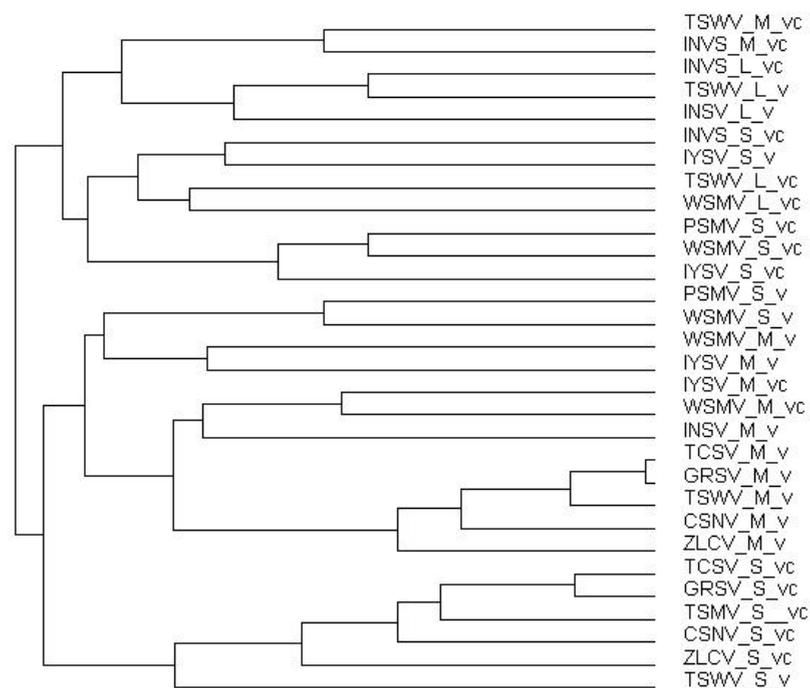


Abbildung 4.3 Sequenzvergleich verschiedener Tospoviren Genomen

Als Grundlage dieses Sequenzvergleiches wurden die ersten 100 Basen der 5' Enden von viralen (v) und viral komplementären (vc) Genomsegmenten gewählt. Die Genomteile sind mit den Abkürzungen S für das S-Segment, M für das M-Segment und L für das L-Segment versehen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich eine genaue Untersuchung von Hüllprotein und Nucleokapsidprotein vermittelten Resistenzmechanismen ausgesprochen schwierig gestaltet, da die exprimierten Proteine häufig mehrere Funktionen des Virus und evtl. auch der Pflanze beeinflussen (Callaway et al. 2001). Weiterhin kann es durch Sequenzähnlichkeiten auf RNA Ebene zwischen dem Transgen und dem Virus zu Überlagerung von Protein und RNA-vermittelter-Resistenz kommen, deren Bedeutung je nach Stärke des Virusinokulums (Goregaoker et al. 2000) (Pang et al. 1993) sowie dem Gewebe und Entwicklungszustand der Pflanze variieren kann (Pang et al. 1996), (Melian-Balmori et al. 2002). Unter diesen Umständen ist es vielleicht nicht verwunderlich, dass nach ca. 20 Jahren Forschung an Hüllprotein-vermittelter-Resistenz nur ein Protein vermittelter Mechanismus relativ gut aufgeklärt ist. Dies betrifft die Hüllprotein vermittelte Resistenz gegen TMV (Abel et al. 1986), die wahrscheinlich durch die verhinderte Freisetzung des Virusgenoms verursacht wird (Culver 2002) und für die gezeigt wurde, dass Hüllprotein-Varianten mit stärkerer Bindung aneinander eine höhere Resistenz vermitteln können (Bendahmane et al. 1997). Dieses Bild scheint aber noch nicht vollständig zu sein, da publiziert wurde, dass Effekte eine Rolle spielen, die auf

eine reduzierte Expression des Movementproteins zurückgehen (Bendahmane et al. 2002). Sollte sich der vorgeschlagene Mechanismus für die N-Protein vermittelte Tospoviren Resistenz als zutreffend erweisen, so wäre dies ein neuer Mechanismus, der auf Transkapsidierung beruht.

4.2 Diskussion der Peptid vermittelten Tospovirusresistenz in *N. benthamiana*

Wie in Kapitel 1.4 und 1.5 beschrieben erschweren die komplexen und noch größtenteils unbekanntes Regulationsvorgänge im viralen Lebenszyklus und der viralen Abwehr der Pflanze die mechanistische Aufklärung von Hüll- und Nucleokapsid vermittelter Virusresistenz. Dies erklärt warum der Erfolg Protein vermittelter Resistenzen nicht vorhergesagt werden kann und die bisher beobachteten Resistenzen oft über den Weg von „Versuch und Irrtum“ eher beobachtet als gezielt hervorgerufen wurden.

Würde es gelingen Virusresistenzen über vorher bekannte Mechanismen zu erzeugen, so könnten Resistenzeigenschaften wesentlich besser vorhergesagt bzw. an neu auftretende Virusstämme angepasst werden. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit eine neue Resistenzstrategie erprobt. Diese Strategie beruht darauf einzelne bekannte Funktionen des Virus zu stören, indem lediglich Peptide bzw. Mikrodomänen viraler Proteine in der Pflanze exprimiert werden. Um solche Peptide zu identifizieren wurde eine Peptid-Bibliothek des TSWV N-Proteins auf Interaktion mit einem mutiertem N-Protein, dessen C-terminale Bindestelle durch die Mutationen F242A und F246A zerstört wurde (Uhrig et al. 1999), im Hefe-Zwei-Hybrid-System getestet. Es konnten zwei Peptide isoliert werden, die überlappende Aminosäuresequenzen zeigen (Abbildung 3.16) und beide eine Region beinhalten, die wichtig für die C-terminale Bindestelle des N-Proteins ist. Die Peptide enthalten eine konservierte und funktional wichtige Domäne des TSWV N-Proteins (Kapitel 3.2.2). Da Peptide in Pflanzenzellen nur sehr schlecht exprimiert werden, wurde die β -Glucuronidase aus *E. coli* als Trägerprotein ausgewählt. Die β -Glucuronidase ist ein häufig genutztes Reporterprotein. Es lässt sich gut in Pflanzenzellen exprimieren und durch Farbstoffe leicht nachweisen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass N- und C-terminale Proteinfusionen möglich sind, ohne die enzymatische Aktivität zu verlieren (Jefferson et al. 1986). Dass β -Glucuronidase nativ als Tetramer vorliegt, wurde als weiterer Vorteil angesehen, da hierdurch eine Vernetzung gebundener Proteine bzw. Nucleokapside erreicht werden könnte. Als Peptidsequenz für die Fusion mit der β -Glucuronidase wurde die Konsensussequenz der isolierten Peptide ausgewählt. Diese Sequenz wurde mittels Oligonukleotiden und PCR-Reaktionen vollkommen neu synthetisiert. Hierbei wurde die Nukleotidsequenz so gewählt, dass sie einen maximalen Unterschied zu der TSWV RNA Sequenz in der korrespondierenden Region hatte, während die Aminosäuresequenz des Peptids zu

100% identisch mit der entsprechenden Sequenz des TSWV N-Proteins war. Zusätzlich wurde anhand eines Sequenzvergleichs eine entsprechende Sequenz aus dem WSMV N-Protein ausgewählt, von der vermutet wurde, dass sie auch ein bindendes Peptid erzeugen würde. Diese Sequenz wurde in analoger Weise aus Oligonukleotiden zusammengesetzt, deren Nukleotidsequenz entsprechend den oben genannten Kriterien gewählt wurde. Die genauen Sequenzen auf Protein- und Aminosäure-Ebene sind in Abbildung 3.18 im Vergleich zu der jeweiligen homologen Sequenz aus TSWV und WSMV N-Protein dargestellt. Die Nukleinsäuresequenzen von diesen Peptiden stimmen zu 61% und 63% mit der homologen Sequenz aus dem TSWV bzw. WSMV N-Protein überein. Die Peptide wurden T-Pep, für die Peptidsequenz aus TSWV N-Protein, und W-Pep, für die analoge Sequenz aus WSMV N-Protein genannt. Diese Peptide wurden allein und in Kombination als N- und C-terminale Fusionen mit der β -Glucuronidase verknüpft. Eine schematische Darstellung der einzelnen Fusionen ist in Abbildung 3.21 zu sehen. Die entstandenen Fusionsproteine wurden im Hefe-Zwei-Hybrid-System auf Interaktion mit C-terminalen Deletionen der Tosopoviren N-Proteine (Kapitel 3.4.4) getestet. Hierbei wurde gezeigt, dass eine Fusion der β -Glucuronidase mit T-Pep (GusT) in der Lage war, an die C-terminal deletierten N-Proteine von TSWV, TCSV, GRSV, CSNV und INSV zu binden. Eine Kombination von T- und W-Pep am C-Terminus der β -Glucuronidase (GusTW) sowie eine Kombination beider Peptide an dem C- und N-Terminus (TWGusTW), konnte alle C-terminalen N-Protein Deletionen binden. Eine Fusion des T-Peptids an den N- und C-Terminus (TGusT) zeigte keine Interaktion. Da die Bindefähigkeit der C-terminalen Fusion mit T-Peptid jedoch bereits gezeigt wurde, ist dieses Ergebnis unerwartet und weist evtl. auf ein falsch gefaltetes, nicht kernlokalisiertes oder nicht exprimiertes Protein hin. Die Ergebnisse des Interaktionstests sind in Abbildung 3.22 dargestellt. Mittels Agrobacterium vermittelten Gentransfers wurden transgene *N. benthamiana* Pflanzen regeneriert. Tochterpflanzen wurden auf Resistenz gegen TSWV und Aktivität der β -Glucuronidase getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass Pflanzen mit der C-terminalen T-Pep-Fusion eine deutliche Resistenz gegen TSWV zeigten. Pflanzen mit anderen Fusionen zeigten hingegen keinen messbaren Unterschied zum Wildtyp (Abbildung 3.24). Wie Messungen der β -Glucuronidase Aktivität zeigten, korreliert dieses Resistenzverhalten mit der Enzymaktivität, da die Pflanzen mit der GusT Fusion eine hohe Aktivität aufwiesen, während Pflanzen mit anderen Fusionen eine deutlich niedrigere oder kaum vorhandene Aktivität hatten (Abbildung 3.23). Nachkommen der getesteten GusT-Pflanzen wurden für weitere Tests ausgewählt. Die Expression der Peptidfusionen wurde durch einen β -Glucuronidase Aktivitätstest nach Auftrennung von Pflanzenproteinextrakten in einem nativen Gel überprüft und die Enzymaktivität einzelner Linien durch einen quantitativen

Mikrotiterplattentest bestimmt. Die Ergebnisse zu beiden Tests sind in Abbildung 3.26 und Abbildung 3.27 zu sehen.

Die so vorgeprüften GusT Linien wurden in Resistenztests mit TSWV, TCSV, GRSV, CSNV, INSV und PSMV inokuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.29 zusammengefasst. Für alle Pflanzenlinien, die die GusT Fusion exprimierten ergab sich eine hohe Resistenz gegen TSWV (98%) und GRSV (96%) sowie für CSNV (100%). Für CSNV muß allerdings berücksichtigt werden, dass nur 53% der Kontrollpflanzen erfolgreich infiziert wurden. Für TCSV konnte eine um 24% reduzierte Infektionsrate gemessen werden. Für INSV zeigte sich keine Reduktion in der Infektionsrate. Einige transgene Pflanzen zeigten im Gegensatz zu den Kontrollen erneutes Spitzenwachstum. Dies deutet auf einen schwachen Schutz der Peptidfusion gegen dieses Virus hin. Für das Virus PSMV ergab sich keine veränderte Infektionsrate und auch keine veränderte Symptomausprägung.

Es kann festgehalten werden, dass durch die Expression einer Mikrodomäne aus dem TSWV NProtein, eine hohe Resistenz gegen drei Tospovirenspezies (TSWV, GRSV und CSNV) erzeugt wurde. Es deutet sich darüber hinaus eine reduzierte Infektionsrate für TCSV an. Die meisten Viren der TSWV Interaktionsgruppe, sind durch die Expression der GusT-Fusion stark beeinflusst. Ein Effekt auf ein Virus einer anderen Interaktionsgruppe blieb bisher jedoch aus. Die sehr ermutigenden Ergebnisse legen den Ausbau und die Verbesserung dieser Resistenz nahe.

4.3 Ausblick

Die bekannte Fähigkeit des T-Peptids an Tospoviren N-Proteine zu binden deutet darauf hin, dass der Wirkmechanismus auf einer Interaktion mit den N-Proteinen in der Pflanzenzelle beruht. Dies wird durch die Beobachtung verstärkt, dass GusT gegen alle getesteten Viren der gleichen Interaktionsgruppe Resistenz oder eine veränderte Symptomausprägung erzeugt, während es gegen ein Virus aus einer anderen Interaktionsgruppe keinen Effekt hat. Es ist aber weiterhin noch unklar, ob eine Bindung von GusT an virale Strukturen in der Pflanze stattfindet und ob dies zu einem Abbruch der Virusinfektion führt oder ob diese Interaktion das Virus nur soweit in seiner Entwicklung behindert, dass die Pflanze eine effektive virale Abwehr aufbauen kann. Um diese Fragen zu klären sind weitere Untersuchungen nötig.

Eine Zwei-Dimensionale-Gelelektrophorese mit Proteinextrakten aus erkrankten aber GusT exprimierenden Pflanzen, könnte beantworten, ob und in welchen Mengenanteilen Komplexe aus GusT und viralen Proteinen vorkommen, ob bevorzugt N-Protein Mono- oder Oligomere bzw. Nucleokapside gebunden werden und wie groß diese Komplexe sind. Elektronenmikroskopische Aufnahmen könnten weitere Daten zu Veränderungen in der viralen Entwicklung liefern. Beide Methoden könnten die Frage klären, ob die Assemblierung des Nucleokapsids und/oder der virale Transport in der Pflanze gestört ist. Weiterhin ist interessant, ob die Peptidbindung einen Einfluß auf die virale Replikation oder Transkription hat. Infektionsversuche mit GusT exprimierenden Protoplasten und anschließende Messungen der viralen Boten-RNA und Genomsegmente mittels Quantitativer PCR oder Northern-Analyse könnten hierzu Daten liefern. Hierdurch könnte geklärt werden, ob es in der Pflanze zu einem Abbruch der viralen Entwicklung kommt, die auf einer Deregulierung viraler Funktionen beruht oder ob das Virus in seiner Ausbreitung und Vermehrung negativ beeinflusst wird, so dass pflanzliche Abwehrmaßnahmen zu einem Abbruch der Infektion führen. Aus Untersuchungen zur N'-Gen vermittelten Resistenz gegen TMV kennt man zahlreiche Proteine, die bei der Resistenzgen vermittelten Virusabwehr induziert werden (Cooper 2001; Yamakawa et al. 2001; Yoda et al. 2002). Expressionsmuster dieser Gene in GusT exprimierenden Pflanzen vor und nach Virus Inokulation könnten hierzu weitere Erkenntnisse liefern.

Die Beobachtung, dass die GusT Fusion im Hefe-Zwei-Hybrid-System eine Bindung an C-terminalen Deletionen, aber keine Interaktion zu Wildtyp N-Proteinen zeigt, könnte ein einfaches System ermöglichen um nach Varianten zu suchen, die eine verbesserte Bindung oder ein anderes Bindungsspektrum zeigen. Eine solche Mutanten-Bibliothek könnte durch Mutagenese (z.B. durch „error-prone PCR“ (Light et al. 1995)) erstellt

werden. Die Resistenzeigenschaften solcher Pflanzen sollten Hinweise liefern wie genau die Eigenschaften Peptid vermittelter Resistenzen aufgrund von Protein Interaktionsdaten vorhergesagt werden können. Weiterhin wurde im Hefe-Zwei-Hybrid-System gezeigt, dass sich die Eigenschaften von zwei Peptiden an einem Trägermolekül addieren lassen. Dies könnte in rekombinanten Pflanzen ausgenutzt werden um besonders breite Virusresistenzen herzustellen. Durch eine Kombination unterschiedlicher Peptide könnten mehrere Wirkprinzipien kombiniert werden, die evtl. synergistischen Wirkungen zeigen würden. Es ist zu erwarten, dass diese Resistenzen besonders stabil sein sollten, da sie im optimalen Fall mehrere hoch konservierte Mechanismen des Virus unterbinden bzw. stören würden.

Betrachtet man eine infizierte Pflanzenzelle als ein molekularbiologisches Interaktions- und Regulationsnetzwerk, so konnte dieses Netzwerk durch die Expression von GusT an einem bekanntem Element beeinflusst werden, wodurch ein neuer Phänotyp (Tospoviren-Resistenz) in der Pflanze erzeugt wurde. Es erscheint folglich auch möglich andere Regulations-Netzwerke in der Pflanze durch die Expression von Peptiden gezielt zu beeinflussen und das Konzept der „dominant effector genetics“, welches bisher nur in tierischen Systemen und Hefe angewendet worden ist auf Pflanzen zu übertragen (Caponigro et al. 1998; Kolonin et al. 1998; Geyer et al. 1999). Dieses Konzept versucht die Wirkung einzelner Proteinfunktionen durch bindende Peptide zu beeinflussen. Die beobachteten Phänotypen könnten es erlauben auf die Bedeutung einzelner Proteinfunktionen zu schließen, was über die bisher üblichen Überexpressions- bzw. Verlustmutanten nicht möglich erscheint.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Protein vermittelte Tospovirus Resistenzen untersucht. Hierbei handelt es sich zum einen um eine Nucleokapsidprotein (N-Protein) vermittelte Resistenz und zum anderen um eine neuartige Peptid vermittelte Resistenz. Zusätzlich wurden die Bindungseigenschaften verschiedener Tospoviren N-Proteine auf ihre funktionelle Konservierung untersucht. Es wurde festgestellt, daß die acht untersuchten N-Proteine in zwei Interaktionsgruppen eingeteilt werden können, deren Mitglieder in beliebiger Kombination mit zwei Bindestellen interagieren können aber keine Interaktion mit N-Proteinen der jeweils anderen Interaktionsgruppe aufweisen. Hierdurch wurde gezeigt, dass die N-Protein Bindestellen, die für eine Polymerisierung des N-Proteins verantwortlich sind funktionell über einen weiten Verwandtschaftskreis konserviert sind. Weiterhin wurde ein Peptid aus einer N-Protein Peptid Bibliothek isoliert, welches die C-terminale Bindestelle des TSWV N-Proteins funktionell repräsentiert und alle Mitglieder der ersten Interaktionsgruppe binden kann. Durch einen Sequenzvergleich konnte ein zweites Peptid identifiziert werden, welches diese Funktion für die zweite Interaktionsgruppe erfüllen kann.

Für die N-Protein vermittelte Resistenz wurde gezeigt, dass sie eine sehr breite und zum Teil sehr hohe Resistenz gegen mehrere Tospoviren erzeugen kann. Weiterhin konnte durch Bindungsstudien im Hefe-Zwei-Hybrid-System gezeigt werden, dass diese Resistenz nicht auf der Interaktion von rekombinant exprimierten N-Protein mit dem viralen N-Protein beruhen kann, da eine hohe Resistenz gegen das Tospovirus PSMV festgestellt wurde, dessen N-Protein nicht mit dem rekombinant exprimierten TSWV N-Protein interagiert. Dadurch wurde gezeigt, dass der Mechanismus einer Nucleokapsidprotein vermittelten Resistenz sich von dem Resistenzmechanismus für die Hüllprotein vermittelte TMV Resistenz grundsätzlich unterscheidet, da die letztere auf starken Wechselwirkungen des rekombinanten Hüllproteins mit dem viralen Hüllprotein beruht.

Die zweite Resistenz gründet sich auf einen neuen Resistenzmechanismus, der hier zum ersten Mal nachgewiesen wird und der auf der Expression eines Peptids bzw. einer Mikrodomäne des TSWV N-Proteins beruht. Diese Mikrodomäne wird als Peptid-Fusion mit der β -Glucuronidase aus *E. coli* in *N. benthamiana* exprimiert und zeigt im Hefe-Zwei-Hybrid-System eine Bindung an mehrere Tospoviren N-Proteine. Das von ihr vermittelte Resistenzspektrum korreliert mit den Bindeeigenschaften des Peptids. Es konnte gezeigt werden, dass eine isolierte Funktion des N-Proteins ausreichend ist um Resistenz gegen mehrere Virusspezies zu erzeugen. Im Vergleich zu den oft hoch komplexen Wirkmechanismen, die über die Expression multifunktionaler Hüll- bzw. Nucleokapsidproteinen verursacht werden, steht durch dieses neue System eine Protein vermittelte breite Virusresistenz zur Verfügung, deren Resistenzphänotyp mit einer nachgewiesenen Bindefähigkeit korreliert. Dies könnte die Forschung an Protein vermittelter Virusresistenz in Zukunft deutlich erleichtern und bereichern.

6 Literaturverzeichnis

- Abel, P. P., R. S. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S. G. Rogers, R. T. Fraley and R. N. Beachy (1986): Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**(4751): 738-743.
- Adkins, S., T. J. Choi, B. A. Israel, M. D. Bandla, K. E. Richmond, K. T. Schultz, J. L. Sherwood and T. German (1996): Baculovirus expression and processing of tomato spotted wilt tospovirus glycoproteins. *Phytopathology* **86**: 849-855.
- Akad, F., E. Teverovsky, A. David, H. Czosnek, D. Gidoni, A. Gera and G. Loebenstein (1999): A cDNA from tobacco codes for an inhibitor of virus replication (IVR)- like protein. *Plant Mol Biol* **40**(6): 969-976.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**(17): 3389-3402.
- Barker, H., B. Reavy, K. D. McGeachy and S. Dawson (1998): Transformation of *Nicotiana benthamiana* with the Potato Mop-Top Virus Coat Protein Gene Produces a Novel Resistance Phenotype Mediated by the Coat Protein. *MPMI* **11**(7): 626-633.
- Beachy, R. N. (1999): Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci* **354**(1383): 659-664.
- Bendahmane, A., K. Kanyuka and D. C. Baulcombe (1999): The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* **11**(5): 781-792.
- Bendahmane, M., J. H. Fitch, G. Zhang and R. N. Beachy (1997): Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *J Virol* **71**(10): 7942-7950.
- Bendahmane, M., J. Szecsi, I. Chen, R. H. Berg and R. N. Beachy (2002): Characterization of mutant tobacco mosaic virus coat protein that interferes with virus cell-to-cell movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3645-3650.
- Brittlebank, J. C. (1919): Tomato diseases. *J. Agr. Victoria* **17**: 213-135.
- Bucher, G. L., C. Tarina, M. Heinlein, F. Di Serio, F. Meins, Jr. and V. A. Iglesias (2001): Local expression of enzymatically active class I beta-1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. *Plant J* **28**(3): 361-369.

-
- Callaway, A., D. Giesman-Cookmeyer, E. T. Gillock, T. L. Sit and S. A. Lommel (2001): The Multifunctional Capsid Proteins of Plant RNA Viruses. *Annu Rev Phytopathol.* **39**: 419-460.
- Caponigro, G., M. R. Abedi, A. P. Hurlburt, A. Maxfield, W. Judd and A. Kamb (1998): Transdominant genetic analysis of a growth control pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7508-7513.
- Cole, A. B., L. Kiraly, K. Ross and J. E. Schoelz (2001): Uncoupling resistance from cell death in the hypersensitive response of Nicotiana species to cauliflower mosaic virus infection. *Mol Plant Microbe Interact* **14**(1): 31-41.
- Cooper, B. (2001): Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor*. *Plant J* **26**(3): 339-49.
- Cooper, B., M. Lapidot, J. A. Heick, J. A. Dodds and R. N. Beachy (1995): A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* **206**(1): 307-313.
- Cortez, I., J. Saaijer, K. S. Wongjkaew, A. M. Pereira, R. Goldbach, D. Peters and R. Kormelink (2001): Identification and characterization of a novel tospovirus species using a new RT-PCR approach. *Arch Virol* **146**(2): 265-278.
- Culver, J. N. (2002): Tobacco mosaic virus assembly and disassembly: Determinants in Pathogenicity and Resistance. *Annu Rev Phytopathol* **40**: 287-308.
- de Haan, P., J. J. Gielen, M. Prins, I. G. Wijkamp, A. van Schepen, D. Peters, M. Q. van Grinsven and R. Goldbach (1992): Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. *Biotechnology (N Y)* **10**(10): 1133-1137.
- Duijsings, D., R. Kormelink and R. Goldbach (2001): In vivo analysis of the TSWV capsid-snatching mechanism: single base complementarity and primer length requirements. *Embo J* **20**(10): 2545-2552.
- Elmayan, T. and H. Vaucheret (1996): Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *The Plant Journal* **9**(6): 787-797.
- Fagard, M. and H. Vaucheret (2000): Systemic silencing signal(s). *Plant Mol Biol* **43**(2-3): 285-293.
- Feys, B. J. and J. E. Parker (2000): Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet* **16**(10): 449-455.
-

- Fraser, R. S. S. (2000a). Special Aspects of Resistance to Viruses. Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. A. Slusarenko, R. S. S. Fraser and L. C. van Loon, Kluwer Academic Publishers: 479-520.
- Geyer, C. R., A. Colman-Lerner and R. Brent (1999): "Mutagenesis" by peptide aptamers identifies genetic network members and pathway connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8567-8572.
- Gielen, J. J. L., P. DeHaan, A. J. Kool, D. Peters, M. Q. J. M. Van Grinsven and R. W. Goldbach (1991): Engineered resistance to tomato spotted wilt virus, a negative-strand RNA virus. *Bio/Technology* **9**: 1363-1367.
- Gietz, R. D. and R. H. Schiestl (1995): Transforming Yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. **5**(5): 255-269.
- Goldbach, R. and D. Peters (1996). Molecular and Biological Aspects of Tospoviruses. The Bunyaviridae. R. M. Elliott. New York, Plenum: 129-157.
- Gonsalves, D. and J. L. Slightom (1993): Coat protein-mediated protection: analysis of transgenic plants for resistance in a variety of crops. *Seminars in Virology* **4**: 397-405.
- Goregaoker, S. P., L. G. Eckhardt and J. N. Culver (2000): Tobacco mosaic virus replicase-mediated cross-protection: contributions of RNA and protein-derived mechanisms. *Virology* **273**(2): 267-275.
- Guo, A., G. Salih and D. F. Klessig (2000): Activation of a diverse set of genes during the tobacco resistance response to TMV is independent of salicylic acid; induction of a subset is also ethylene independent. *Plant J* **21**(5): 409-418.
- Hackbusch, J. (2000). Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV): Biochemische Charakterisierung des Nukleocapsidproteins. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln. Köln, Universität zu Köln: 1-98.
- Hall, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 667-560.
- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wie, K. Keyomarsi and S. J. Elledge (1993): The p21 Cdk-interacting Protein Cip1 is a Potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases. *Cell* **75**: 805-816.

- Hefferon, K. L., H. Khalilian and M. G. AbouHaidar (1997): Expression of the PVY⁰ coat protein (CP) under the control of the PVX CP gene leader sequence: Protection under greenhouse and field conditions against PVY⁰ and PVY^N infection in three potato cultivars. *Theoretical and applied genetics* **94**(2): 287-292.
- Higgins, D., J. Thompson, T. Gibson, J. D. Thompson, D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressively multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Hoekema, A., P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykaas and R. A. Schilperoort (1983): A binary plant vector strategy based on separation on Vir- and T-region of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* **303**: 179-180.
- Hoffmann, K., W. P. Qiu and J. W. Moyer (2001): Overcoming host- and pathogen-mediated resistance in tomato and tobacco maps to the M RNA of Tomato spotted wilt virus. *Mol Plant Microbe Interact* **14**(2): 242-249.
- Jacquemond, M., P. Y. Teycheney, I. Carrère, J. Navas-Castillo and M. Tepfer (2001): Resistance phenotypes of transgenic tobacco plants expressing different cucumber mosaic virus (CMV) coat protein genes. *Molecular Breeding* **8**: 85-94.
- James, P., J. Halladay and E. A. Crais (1996): Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436.
- Jan, F. J., C. Fagoaga, S. Z. Pang and D. Gonsalves (2000): A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. *J Gen Virol* **81 Pt 8**: 2103-2109.
- Jefferson, R. A., S. M. Burgess and D. Hirsh (1986): beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**(22): 8447-8451.
- Kikkert, M., J. Van Lent, M. Storms, P. Bodegom, R. Kormelink and R. Goldbach (1999): Tomato spotted wilt virus particle morphogenesis in plant cells. *J Virol* **73**(3): 2288-2297.
- Kolakofsky, D. (1991): Bunyaviridae. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **169**: 1-256.
- Kolonin, M. G. and R. L. Finley, Jr. (1998): Targeting cyclin-dependent kinases in *Drosophila* with peptide aptamers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14266-14271.

- Kormelink, R., M. Storms, J. Van Lent, D. Peters and R. Goldbach (1994): Expression and subcellular location of the NSM protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* **200**(1): 56-65.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Landsmann, J., D. Llewellyn, E. S. Dennis and W. J. Peacock (1988): Organ regulated expression of *Parasponia andersonii* haemoglobin gene in transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet* **214**(1): 68-73.
- Langland, J., L. Langland and D. Roth (1998): Differential localisation and accumulation of the plant double stranded RNA-dependent protein kinase during virus infection. *Plant Physiol. Biochem.* **36**(5): 395-400.
- Li, W. X. and S. W. Ding (2001): Viral suppressors of RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol* **12**(2): 150-4.
- Liang, Q. and T. Richardson (1992): A simple and rapid method for screening transformant yeast colonies using PCR. *Biotechniques* **13**: 730-735.
- Light, J. and R. A. Lerner (1995): Random mutagenesis of staphylococcal nuclease and phage display selection. *Bioorg Med Chem* **3**(7): 955-967.
- Liu, Y., M. Schiff, R. Marathe and S. P. Dinesh-Kumar (2002): Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J* **30**(4): 415-429.
- Lomonosoff, G. P. (1995): Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu Rev Phytopathol.* **33**: 323-343.
- MacKenzie, D. J. and P. J. Ellis (1992): Resistance to tomato spotted wilt virus infection in transgenic tobacco expressing the viral nucleocapsid gene. *Mol. Plant Microbe Interact* **5**: 34-40.
- Melian-Balmori, E., R. M. McDiarmid, D. L. Beck, R. C. Gardner and R. L. S. Forster (2002): Sequence-, Tissue-, and Delivery-Specific Targeting of RNA During Post-Transcriptional Gene Silencing. *MPMI* **15**(8): 753-763.
- Milne, R. G. and R. I. B. Francki (1984): Should tomato spotted wilt virus be considered as a possible member of the family Bunyaviridae? *Intervirology* **22**: 72-76.
- Moore, C. J., P. W. Sutherland, R. L. Forster, R. C. Gardner and R. M. MacDiarmid (2001): Dark green islands in plant virus infection are the result of posttranscriptional gene silencing. *Mol Plant Microbe Interact* **14**(8): 939-946.

-
- Morita, M., K. Asami, Y. Tanji and H. Unno (2001): Programmed *Escherichia coli* Cell Lysis by Expression of Cloned T4 Phage Lysis Genes. *Biotechnol. Prog.* **17**: 573-576.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**: 473-497.
- Murphy, A. M. and J. P. Carr (2002): Salicylic acid has cell-specific effects on tobacco mosaic virus replication and cell-to-cell movement. *Plant Physiol* **128**(2): 552-563.
- Murphy, A. M., S. Chivasa, D. P. Singh and J. P. Carr (1999): Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends Plant Sci* **4**(4): 155-160.
- Murphy, A. M., A. Gilliland, C. E. Wong, J. West, D. P. Singh and J. P. Carr (2001): Signal transduction in resistance to plant viruses. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 121-128.
- Nault, L. R. (1997): Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. *Annals of the entomological Society of America* **90**(5): 521-541.
- Nielsen, K. and R. S. Boston (2001): Ribosome-inactivating proteins: A Plant Perspective. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 785-816.
- Oostendorp, M., W. Kunz, B. Dietrich and T. Staub (2001): Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 19-28.
- Pang, S.-Z., J. H. Bock, C. Gonsalves, J. L. Slightom and D. Gonsalves (1994): Resistance of transgenic *Nicotiana benthamiana* plants to tomato spotted wilt and impatiens necrotic spot tospovirus: Evidence of involvement of the N protein and the N gene RNA in resistance. *Phytopathology* **84**: 243-249.
- Pang, S.-Z., F. J. Jan, K. Carney, J. Stout, D. M. Tricoli, H. D. Quemada and C. Gonsalves (1996): Post-transcriptional transgene silencing and consequent tospovirus resistance in transgenic lettuce are affected by transgene dosage and plant development. *Plant Journal* **9**(6): 899-909.
- Pang, S. Z., F. J. Jan and D. Gonsalves (1997): Nontarget DNA sequences reduce the transgene length necessary for RNA-mediated tospovirus resistance in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15): 8261-8266.
- Pang, S.-Z., P. Nagpala, M. Wang, J. L. Slightom and D. Gonsalves (1992): Resistance to heterologous isolates of tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco expressing its nucleocapsid protein gene. *Phytopathology* **82**: 1223-1229.

- Pang, S. Z., J. L. Slightom and D. Gonsalves (1993): Different mechanisms protect transgenic tobacco against tomato spotted wilt and impatiens necrotic spot Tospoviruses. *Biotechnology (N Y)* **11**(7): 819-824.
- Peters, D. (1998). An updated list of plant species susceptible to tospoviruses. Recent Progress in Tospovirus and Thrips Research. Forum International Symposium on Tospoviruses and Thrips in floral and Vegetable Crops, Wageningen, The Netherlands.
- Prins, M., P. de Haan, R. Luyten, M. van Veller, M. Q. van Grinsven and R. Goldbach (1995): Broad resistance to tospoviruses in transgenic tobacco plants expressing three tospoviral nucleoprotein gene sequences. *Mol Plant Microbe Interact* **8**(1): 85-91.
- Prins, M., R. O. Resende, C. Anker, A. van Schepen, P. de Haan and R. Goldbach (1996): Engineered RNA Mediated Resistance to Tomato Spotted Wilt Virus Is Sequence Specific. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 416-418.
- Resende R. de, O., P. de Haan, A. C. de Avila, E. W. Kitajima, R. Kormelink, R. Goldbach and D. Peters (1991): Generation of envelope and defective interfering RNA mutants of tomato spotted wilt virus by mechanical passage. *J Gen Virol.* **72**: 2375-2383.
- Richmond, K. E., K. Chenault, J. L. Sherwood and T. L. German (1998): Characterization of the nucleic acid binding properties of tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein. *Virology* **248**(1): 6-11.
- Ryabov, E. V., G. Fraser, M. A. Mayo, H. Barker and M. Taliansky (2001): Umbravirus gene expression helps potato leafroll virus to invade mesophyll tissues and to be transmitted mechanically between plants. *Virology* **286**(2): 363-372.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1981). Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbour, N. Y. USA, Cold Spring Harbour Laboratory.
- Samuel, G., J. G. Bald and H. A. Pittman (1930): Spotted wilt of tomatoes. *Aust. CSIRO Bull.* **44**.
- Sanford, J. C. and S. A. Johnson (1985): The concept of parasite-derived resistance - deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J. Theor. Biol.* **113**: 395-405.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977): DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5436-5467.

- Schreier, P. H., K. Stenzel, G. Adam and E. Maiss (1994). Desoxyribonukleinsäuren, die Pflanzenvirus Sequenzen kodieren. European Patent EP 0 626 449 A3.
- Schreier, P. H., K. Stenzel, G. Adam and E. Maiss (1996). DNA Comprising Plum Pox Virus And Tomato Spotted Wilt Virus CDNAs For Disease Resistance. United States, Bayer Aktiengesellschaft Leverkusen Germany.
- Schwach, F. (2002). Aufklärung des Resistenzmechanismus gegen Tospoviren von TSWV-N-transgenen Pflanzen mit ohne PPF-Leader-Sequenz. Fachbereich Biologie der Universität Hamburg. Hamburg, Universität Hamburg: 1-108.
- Silva, M. S., C. R. Martins, I. C. Bezerra, T. Nagata, A. C. de Avila and R. O. Resende (2001): Sequence diversity of NS(M) movement protein of tospoviruses. *Arch Virol* **146**(7): 1267-1281.
- Smith, P. G. (1944): Reaction of *Lycopersicon* spp. to spotted wilt. *Phytopathology* **34**: 504-505.
- Soellick, T., J. F. Uhrig, G. L. Bucher, J. W. Kellmann and P. H. Schreier (2000): The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(5): 2373-2378.
- Soellick, T. R. (2000). Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV): Die Interaktionen der viralen Proteine als molekulare Grundlage des Infektionszyklus. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln. Köln, Universität zu Köln: 1-98.
- Sonoda, S. and M. Nishiguchi (2000): Delayed activation of post-transcriptional gene silencing and de novo transgene methylation in plants with the coat protein gene of sweet potato feathery mottle potyvirus. *Plant Science* **156**(2): 137-144.
- Spasova, M. I., T. W. Prins, R. T. Forkertsma, R. M. Klein-Lankhorst, J. Hille, R. W. Goldbach and M. Prins (2001): The tomato gene Sw-5 is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding* **7**((2)): 151-161.
- Stark, D. M. and R. N. Beachy (1989): Protection against potyvirus infection in transgenic plants: evidence for broad spectrum resistance. *Biotechnology* **7**: 1257-1262.
- Steinecke, P., C. Heinze, E. Oehmen, G. Adam and P. H. Schreier (1998): Early events of tomato spotted wilt transcription and replication in protoplasts. *New Microbiol* **21**(3): 263-268.

- Storms, M. M., R. Kormelink, D. Peters, J. W. Van Lent and R. W. Goldbach (1995): The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* **214**(2): 485-493.
- Strittmatter, G. and D. Wegener (1993): Genetic Engineering of Disease and Pest Resistance in Plants: Present State of the Art. *Z. Naturforsch.* **48**(c): 673-688.
- Tacke, E., F. Salamini and W. Rohde (1996): Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. *Nat Biotechnol* **14**(11): 1597-1601.
- Töpfer, R., V. Matzeit, B. Gronenborn, J. Schell and H. Steinbiß (1987): A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucl. Acids Res.* **15**: 5890-5895.
- Ueki, S. and V. Citovsky (2002): The systemic movement of a tobamovirus is inhibited by a cadmium-ion- induced glycine-rich protein. *Nat Cell Biol* **4**(7): 478-486.
- Uhrig, J. F., T. R. Soellick, C. J. Minke, C. Philipp, J. W. Kellmann and P. H. Schreier (1999): Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt tospovirus: identification and characterization of two interacting domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(1): 55-60.
- Vaira, A. M., L. Semeria, S. Crespi, V. Lisa, A. Allavena and G. P. Accotto (1995): Resistance to tospoviruses in *Nicotiana benthamiana* transformed with the N gene of tomato spotted wilt virus: correlation between transgene expression and protection in primary transformants. *Mol Plant Microbe Interact* **8**(1): 66-73.
- Waterhouse, P. M., M. B. Wang and T. Lough (2001): Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**(6839): 834-842.
- Wijkamp, I., J. van Lent, R. Kormelink, R. Goldbach and D. Peters (1993): Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *J Gen Virol* **74**(Pt 3): 341-349.
- Yamakawa, H., I. Mitsuhashi, N. Ito, S. Seo, H. Kamada and Y. Ohashi (2001): Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *Eur J Biochem* **268**(14): 3916-3929.
- Yoda, H., M. Ogawa, Y. Yamaguchi, N. Koizumi, T. Kusano and H. Sano (2002): Identification of early-responsive genes associated with the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants. *Mol Genet Genomics* **267**(2): 154-161.

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln, in den Abteilungen von Prof. Dr. Jeff Schell (Abt. Genetische Grundlagen der Pflanzenzüchtung) und von Prof. Dr. Francesco Salamini (Abt. Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie) unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. Peter H. Schreier angefertigt.

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 anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Peter H. Schreier betreut worden.

Christoph Rudolph

Teilpublikationen:

Rudolph, C., Schreier, P.H., Uhrig, J.F.

The nucleocapsidprotein mediated Tosspovirus resistance is not dependent on nucleocapsidprotein interactions.

(in Vorbereitung)

Rudolph, C., Schreier, P.H., Uhrig, J.F.

Peptide mediated broad virus resistance in plants.

(in Vorbereitung)

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. Schell und Herrn Prof. Dr. Salamini danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und ihr fortwährendes Interesse an viralen Resistenzen.

Herrn Prof. Dr. Schreier und Dr. Joachim Uhrig danke ich für die Förderung und die vielen anregenden wissenschaftlichen Diskussionen die meine Arbeit auch in schwierigen Zeiten begleitet und unterstützt haben. Durch sie habe ich viel über wissenschaftliche Arbeit gelernt.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Ippazio Cicerello, ohne den die Gewächshausversuche in dieser Form nicht möglich gewesen wären und dem ich viele Kenntnisse über die Pflanzenwelt außerhalb der Laborwände zu verdanken habe.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Labors:

Gregor Bucher, Christina Philipp, Verena Spieß, Peter Porschewski, Tim Söllick, Jana Hackbusch, Ilona Zimmermann, Klaus Richter, Olaf Müller. Sie unterstützen mich nicht nur in den vielen kleinen Dingen des Labor-Alltags, sondern schufen eine freundschaftliche Atmosphäre, in der zu Arbeiten eine Freude war.

Auch möchte ich meine Dankbarkeit gegenüber den Mitgliedern der btS Köln/Düsseldorf ausdrücken, mit denen ich im Institut und im Verein zusammen gearbeitet habe: Melanie Bey, Andrea Eicker, Thomas Greb, Markus Rhiel, Holger Nickel, Julia Frey, Carl-Henning Reschke.

Abstract:

Tospoviruses are important plant pathogens causing an estimated yearly loss of one billion US\$. The genome of this virus group consists of three parts of negative and ambisense RNA molecules which code for five proteins in total. One protein is the nucleocapsidprotein (N-protein) which forms nucleocapsids through binding to the viral RNA genome parts. Important viral processes like RNA transcription and replication as well as viral movement depend on these structures. Because the N-protein is therefore crucial for the viral life cycle it was often used for pathogen derived resistance strategies. The resulting resistance phenotypes were not predictable in such way, that the resulting resistance phenotypes were highly variable.

To get more information about N-protein mediated resistance, plant lines were produced expressing the N-protein of TSWV. These plant lines were tested for resistance to TSWV, TCSV, GRSV, CSNV, INSV, IYSV, PSMV und WSMV. A moderate to high resistance for TSWV, TCSV and GRSV was detected in *Nicotiana benthamiana* plant lines. For INSV and PSMV a very high resistance could be measured, while plants inoculated with CSNV, IYSV and WSMV behaved like the wild type. Because it that protein mediated resistance is thought to be due to protein interactions, protein interactions of N-proteins of all mentioned tospoviruses were investigated in the yeast-two-hybrid-system. Two interaction groups could be detected, in which all possible combinations of N-proteins showed interactions. N-proteins of different groups showed no interaction. One interaction group contains the N-proteins of TSWV, TCSV, GRSV, CSNV and INSV. The other interaction group consists of the N-proteins of IYSV, PSMV and WSMV. Further experiments showed that these groups are valid for both binding sites of the N-proteins.

In other experiments a peptide based resistance strategy was established in transgenic plants which expressed a microdomain containing the C-terminal binding site of the TSWV N-protein fused to Gus. These plants showed a high resistance to TSWV, GRSV and CSNV and a moderate resistance to TCSV as well as changed disease symptoms for INSV. They showed no resistance to PSMV. Therefore effects, ranging from high resistance to changed disease symptoms could be detected for all viruses belonging to the interaction group of TSWV. All N-Proteins belonging to this group showed interactions to the Gus-peptide fusion. The PSMV N-protein shows no interaction to the TSWV N-protein or the Gus-peptide fusion. Accordingly peptide expressing plants showed no resistance to PSMV. This correlation offers the possibility for "designed" resistance phenotypes and therefore a better understanding of protein mediated virus resistance in plants.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name	Christoph Rudolph
Geburtsdatum/-ort	25.05.72 in Schwalmstadt
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung und Schulabschluss

07/78 – 06/82	Grundschule: Altenburgschule Bad Zwesten
07/92 – 06/91	Gymnasium: Jugenddorf-Christopherusschule-Oberurff
06/91	Abitur

Wehrdienst

07/91 – 06/92	Wehrdienst als Vermessungssoldat der Panzer-Artillerie
---------------	---

Studium

10/92 – 09/94	Grundstudium der Diplom-Biologie Universität-Gesamthochschule-Kassel
10/94 – 12/98	Hauptstudium der Diplombiologie Universität Stuttgart-Hohenheim

Prüfungen und Studienabschluss

10/94	Diplom-Vorprüfung:
05/99	Diplom-Abschluß an der Universität Hohenheim: Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Köln unter Anleitung von Prof. Dr. A. Pfitzner; angefertigt in der Arbeitsgruppe von Dr. G. Jach (Abt. Prof. Dr. Jeff Schell)

Promotion:

07/99 – 12/02	Promotion an der Universität zu Köln Promotionsarbeiten am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Köln unter Anleitung von Prof. Dr. Peter H. Schreier (Abt. Prof. Dr. Jeff Schell und Prof. Dr. Francesco Salamini)
---------------	--

Berichtersteller:

**Prof. Dr. Peter H. Schreier
Prof. Dr. Martin Hülskamp**

Tag der mündlichen Prüfung:

03. Dezember 2002