

Aus den Institut für Obst, Gemüse und Weinbau
Universität Hohenheim
Fachgebiet: Weinbau
und dem Centrum Grüne Gentechnik der SLFA Neustadt / Weinstraße
PD Dr. Götz M. Reustle

**Molekulare Analyse des Himbeerringflecken
Nepovirus (RpRSV) und Herstellung eines
Konstrukts zur Induktion von RpRSV-Resistenz in
Reben**

Promotion
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Agrarwissenschaften

vorgelegt
der Fakultät Agrarwissenschaften
Universität Hohenheim

von
Rainer Ebel
Diplom Agrarbiologe
aus
Neustadt an der Weinstraße

2003

Die vorliegende Arbeit wurde am 27. März 2003 von der Fakultät II – Agrarwissenschaften – der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2003

Dekan:	Prof. Dr. K. Stahr
Berichterstatter, 1. Prüfer:	PD Dr. G. Reustle
Mitberichterstatter, 2. Prüfer:	Prof. Dr. H. Buchenauer
3. Prüfer:	Prof. Dr. R. Blaich

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Krankheiten der Rebe	1
1.2 Die Reissigkrankheit an Reben	2
1.3 Das Himbeerringflecken Virus	3
1.4 Nepoviren	4
1.5 Virusresistenz	6
1.6 Ziele der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Chemikalien, Kits , Enzyme, Antikörper und Primer	12
2.1.2 Bakterienstämme	13
2.1.3 Plasmide	13
2.1.4 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen	14
2.1.5 Virusmaterial	14
2.2 Inokulationstechniken	15
2.2.1 Vermehrung von RpRSV in <i>Chenopodium quinoa</i>	15
2.2.2 'Challenge Inokulation' mit RpRSV-ch	15
2.2.3 Inokulation von Nukleinsäuren	16
2.2.4 Serologischer Nachweis von RpRSV	16
2.3 Molekularbiologische Methoden	17
2.3.1 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren	17
2.3.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	20
2.3.3 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
2.3.4 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	22
2.3.5 Restriktion von DNA	23
2.3.6 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	23
2.3.7 Virusisolierung und Aufreinigung der viralen RNA	23
2.3.8 Herstellung doppelsträngiger cDNA	26
2.3.9 Amplifikation der viralen 5' Enden	29
2.3.10 Sequenzierung	29
2.3.11 RT-PCR	30

2.3.12	Aufreinigung von PCR – Produkten und Isolierung von DNA – Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.3.13	Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA	31
2.4	Gewebekulturtechniken	32
2.4.1	Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> mittels Agrobakterien	32
2.4.2	Transfer von <i>in vitro</i> Pflanzen ins Gewächshaus	34
2.5	Analyse der transgenen Pflanzen	34
2.5.1	Extraktion pflanzlicher Gesamt-DNA	34
2.5.2	PCR – Nachweis des RpRSV – Konstrukts	36
2.5.3	Nachweis des Transgens mittels Southern Hybridisierung	37
2.5.4	Isolierung pflanzlicher RNA	39
2.5.5	Northern Hybridisierung	41
3.	Ergebnisse	43
3.1	Vermehrung von RpRSV auf <i>Chenopodium quinoa</i>	43
3.2	Isolierung der viralen RNA	44
3.3	Herstellung der doppelsträngigen cDNA	45
3.4	Sequenzierung von RpRSV	46
3.4.1	Die Sequenzen von RpRSV-g und RpRSV-ch	46
3.4.2	Sequenzvergleiche zwischen RpRSV-g und RpRSV-ch	47
3.4.3	Sequenzvergleich von RpRSV-g und RpRSV-ch mit anderen Nepoviren	48
3.4.4	Motifs	50
3.4.5	Schnittstellenanalyse des Polyproteins der RNA1 von RpRSV-g und RpRSV-ch	51
3.5	Aufbau des RpRSV Konstrukts	54
3.6	Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> mittels Agrobakterien	59
3.7	Nachweis des RpRSV-Konstrukts mittels PCR	60
3.8	Testung der transgenen Pflanzen auf RpRSV-ch Resistenz	61
3.9	Northern Analyse	63
3.10	Southern Hybridisierung	66
3.11	Herstellung von „full length“ Klonen von RpRSV	67
4.	Diskussion	78
5.	Zusammenfassung	89
6.	Literatur	90

7. Anhang	100
7.1 Sequenz der RNA1 von RpRSV-ch	100
7.2 Sequenz der RNA2 von RpRSV-ch	102
7.3 Sequenz der RNA1 von RpRSV-g	103
7.4 Sequenz der RNA2 von RpRSV-g	106
8. Lebenslauf	107

Abkürzungsverzeichnis

Pflanzenviren:

AMV	<i>Alfalfa Mosaic Virus</i>
ArMV	<i>Arabidopsis Mosaic Virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Caulimovirus</i>
CLRV	<i>Cherry Leafroll Virus</i>
CMV	<i>Gurken Mosaik Virus</i>
CPMV	<i>Cowpea Mosaic Virus</i>
GCMV	<i>Grapevine Chrome Mosaic Virus</i>
GFLV	<i>Grapevine Fanleaf Virus</i>
GLRaV	<i>Grapevine Leafroll associated Virus</i>
PMMoV	<i>Pepper Mild Mosaic Virus</i>
PRMV	<i>Peach Rosette Mosaic Nepovirus</i>
PSbMV	<i>Pea Seed-borne Mosaic Potyvirus</i>
PVX	<i>Potato X Potexvirus</i>
PVY	<i>Potato Y Potyvirus</i>
RpRSV	<i>Raspberry Ringspot Virus</i>
TBRV	<i>Tobacco Black Ringspot Virus</i>
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TMV	<i>Tabak Mosaik Virus</i>
TomRV	<i>Tomato Ringspot Virus</i>
TVMV	<i>Tobacco Vein Mottling Potyvirus</i>
ZYMV	<i>Zucchini Yellow Mosaic Virus</i>

Sonstige Abkürzungen:

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CP	Coat protein

CPMR	<i>Coat protein mediated resistance</i>
CTAB	Cetyltrimethylammonium-bromid
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ds cDNA	doppelsträngige copy Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur
ds RNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GFP	Green Fluoreszenz Protein
GUS	β-D-Glucuronidase
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
ha	Hektar
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalaktosid
Kb	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
LB	<i>left border region</i>
LB-Medium	Luria-Bertrani Medium
MP	<i>Movement protein</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Murashige & Skoog Medium
NAA	1-Naphtylelessigsäure
NCR	Non coding region
nptII-Gen	Kanamycin Resistenzgen
nt	Nukleotide
NTB	Nucleotide binding protein
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PAT	Phosphinotricin-Acetyl-Transferase
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PNK	Polynukleotidkinase
PPT	Phosphinotricin
Prot	Protease

PTGS	<i>post-transcriptional-gene-silencing</i>
RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
RB	<i>right border region</i>
RMVR	<i>RNA-mediated virus resistance</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNA dep. RNA pol.	RNA abhängige RNA Polymerase
RNAi	Ribonukleinsäure interference
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	<i>single-stranded</i> (einzelsträngig)
si RNA	<i>small interfering</i> Ribonukleinsäure
TGS	<i>transcriptional-gene-silencing</i>
U	Unit
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-Galaktosid

Abkürzungen der natürlichen Aminosäuren im Einbuchstabencode

L-Alanin	A	L-Leucin	L
L-Arginin	R	L-Lysin	K
L-Asparagin	N	L-Methionin	M
L-Asparaginsäure	D	L-Phenylalanin	F
L-Cystein	C	L-Prolin	P
L-Glutamin	Q	L-Serin	S
LGlutaminsäure	E	L-Threonin	T
Glycin	G	L-Tryptophan	W
L-Histidin	H	L-Tyrosin	Y
L-Isoleucin	I	L-Valin	V

1. Einleitung

1.1 Krankheiten der Rebe

Die Rebe gehört zu einer der ältesten und kulturell bedeutendsten Kulturpflanzen. Weltweit beträgt die Rebenfläche etwa 10 Millionen Hektar, davon entfallen etwa ein Sechstel auf Tafeltrauben und Rosinen. 60 % der Weltreblächen (6 Mio. ha) befinden sich in Europa. Deutschland hat insgesamt 100.000 ha Rebflächen, dies entspricht 1 % der Weltrebläche. In Deutschland gibt es insgesamt 13 Weinanbaugebiete. Rheinhessen ist das größte Anbaugebiet, dicht gefolgt von der Pfalz. Wie alle Kulturpflanzen wird auch die Weinrebe von einem breiten Spektrum von Schaderregern befallen.

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts kam der Weinbau in Europa fast zum Erliegen. Die Ursachen waren die aus den USA eingeschleppten pilzlichen (echter Mehltau (*Ucinula necator*), falscher Mehltau (*Plasmopara viticola*)) sowie tierischen Pathogene (Reblaus (*Phylloxera vastatrix*)). Es gelang, die pilzlichen Pathogene durch Applikation von chemischen Verbindungen (Kupferbrühe gegen den Falschen und Schwefel gegen den Echten Mehltau) unter Kontrolle zu bekommen. Gegen die Reblaus als bodenbürtiges Pathogen waren chemische Pflanzenschutzmittel jedoch wirkungslos. Erst durch die Pfropfung der europäischen Rebsorten auf amerikanische Wildreben, deren Wurzeln resistent oder zumindest tolerant gegenüber der Reblaus sind, gelang es, auch die Reblaus unter Kontrolle zu bekommen. Inzwischen steht dem Weinbau ein breites Spektrum an Unterlagssorten und –klonen zur Verfügung, um eine bestmögliche Anpassung an Rebsorte, Kulturtechnik und Bodenbedingungen zu ermöglichen. Bei den in Deutschland verwendeten Unterlagsreben handelt es sich um Selektionen aus einer Kreuzung von *Vitis riparia* x *Vitis berlandieri*.

Neben den tierischen und pilzlichen Schaderregern stellen Viren die dritte Gruppe der Reben befallenden Pathogene dar. Zu den Viruserkrankungen der Reben zählen die Reissigkrankheit, die Blattrollerkrankungen und die Fleckkrankheit. Bei der Fleckkrankheit ist das Grapevine Fleck Virus der Krankheitsverursacher. Bei der Blattrollerkrankung handelt es sich um einen Krankheitskomplex, welcher von Closteroviren, vor allem dem Grapevine leafroll associated virus 1 bis 8 (GLRaV 1 – 8) sowie GVA und GVB verursacht wird. Die Reissigkrankheit ist ebenfalls ein Krankheitskomplex, der von verschiedenen Nepoviren verursacht wird.

1.2 Die Reisingkrankheit an Reben

Die Reisingkrankheit ist die bedeutendste virale Erkrankung der Reben (Hillebrand und Eichhorn, 1988). In Deutschland wird die Reisingkrankheit vom Grapevine Fanleaf Virus (GFLV), dem Arabis Mosaic Virus (ArMV) und dem Himbeerringflecken Virus (RpRSV) verursacht. Die Viren gehören zu der Familie der Nepoviren. Häufig treten die Viren als Mischinfektion auf, wobei sich ihre schädigende Wirkung noch verstärkt.

Die Symptome von reisingkranken Weinreben sind sehr vielfältig (Stellmach und Weischer, 1970; Stellmach und Querfurth, 1978; Hillebrand und Eichhorn, 1988). Die Pflanzen wirken aufgrund des starken Auftretens von Geiztrieben sehr buschig. Weiterhin sind die Pflanzentriebe stark gestaucht und zeigen eine verminderte Wüchsigkeit. Durch eine Verkürzung der Internodien zeigen die erkrankten Reben häufig sogenannte Doppelknoten. Die Blätter verlieren ihr sortentypisches Aussehen. So haben Blätter von infizierten Reben oft weit offene Stielbuchten oder sie sind ungewöhnlich gezahnt. Die Blätter haben oft Blattverfärbungen, wie gelbliche Flecken und Ringe und zeigen gelegentlich Panaschüre. Werden mit der Reisingkrankheit infizierte Reben zusätzlich noch von Blattgallmilben befallen, bilden sich um die Blattgallen herum gelbe Ringe. Ältere Blätter weisen auch häufig nekrotische Läsionen auf. Der Gescheinansatz kann stark vermindert sein und die Traubenblüten neigen zu starkem Verrieseln. Eine weitere Eigenschaft von befallenen Reben ist, dass das Holz nur unzureichend ausreift, was zu einer erhöhten Frostepfindlichkeit des Rebstockes führt.

Reisingkranke Reben verlieren ihre Leistungskraft bezüglich Qualität und Ertrag. Weiterhin kommt es durch die Viruserkrankung zu einer vorzeitigen Ermüdung der Rebstöcke, so dass auch die Wirtschaftlichkeit der Rebanlage durch die vorzeitigen Stockausfälle noch zusätzlich beeinträchtigt wird. Eine Virusinfektion wird erst nach einigen Jahren sichtbar, wobei ein latenter Befall bereits zu Ertragseinbußen führen kann.

Eine vorbeugende Maßnahme zur Bekämpfung der Nepoviren ist die Erstellung von virusfreien Rebanlagen. Hierzu muss die Neuanpflanzung des Weinbergs mit virusfreiem Pflanzenmaterial durchgeführt werden. Ein Problem ist jedoch, dass im Boden die virustragenden Nematoden angereichert werden, so dass auch Neupflanzungen sehr schnell reinfiziert werden. Unterlagsreben können auf solchen Böden überhaupt nicht mehr angepflanzt werden, da die Viren auch durch Pfropfung übertragen werden können. So ist es von besonderer Bedeutung, dass Unterlagsreben auf gesunden, virusfreien Böden angebaut werden. Eine Bodenentseuchung mit Nematiziden wie Dichlorpropen oder Methylbromid ist seit 1987 wegen umweltpolitischer Bedenken nicht mehr erlaubt. Die einzige Möglichkeit einer Nematodenbekämpfung wäre eine mehrjährige Brache, bei der der Kreislauf zwischen Weinreben und Nematoden unterbrochen wäre und sich somit der Gehalt an virustragenden Nematoden im Boden redu-

zieren würde. Der Nachteil ist jedoch, dass eine solche Brache starke finanzielle Einbußen mit sich bringt. Weiterhin ist nicht absolut gesichert, dass dies wirklich den Virustiter im Boden senkt, da vor allem ArMV und RpRSV auch krautige Pflanzen, die bei einer solchen Brache auftreten, infizieren können.

In Reben der Gattung *Vitis* sind keine natürlichen Resistenzgene gegenüber Pflanzenviren bekannt. Lediglich Vertreter der mit *Vitis* verwandten Gattung *Muscadinia* zeigen eine Resistenz gegenüber den Virus übertragenden Nematoden (Bouquet, 1981; Staudt and Weischer, 1992). Da die Kreuzung *Vitis* und *Muscadinia* sehr problematisch ist, ist es fast nicht möglich, mit einem klassischen Züchtungsansatz virusresistente Reben zu erzeugen.

1.3 Das Himbeerringflecken Virus

Das Himbeerringflecken Virus (RpRSV, abgeleitet von dem angelsächsischen Raspberry Ringspot Virus) wurde erstmals 1956 von Cadman an schottischen Himbeerpflanzen beschrieben. Synonyme von RpRSV sind „Raspberry Scottish leaf curl virus“ und „Red Current Ringspot Virus“. Bercks (1968) konnte RpRSV in Reben, die Symptome der Reisigkrankheit zeigten, nachweisen. Es wird in deutschen Weinanbaugebieten vor allem durch den Nematoden *Paralongidorus maximus* übertragen (Jones *et al*, 1994). Weitere übertragende Nematoden sind *Longidorus elongatus* und *Longidorus macrosoma*. In Deutschland gibt es zwei serologisch verschiedene Stämme von RpRSV: den „cherry“ – Stamm (RpRSV-ch) und den „grapevine“ – Stamm (RpRSV-g). RpRSV-ch ist in deutschen Rebflächen der bedeutendere (Abb. 1). Weiterhin verursacht RpRSV-ch die Pfeffinger Krankheit an Süßkirschen (*Prunus avium*) (Abb. 2). Eine weitere bedeutende Kulturpflanze, die von RpRSV befallen wird, ist die Erdbeere (*Fragaria vesca*) und Himbeere (*Rubus indaeus*). RpRSV ist auch in der Lage, krautige Pflanzen wie *Chenopodium quinoa* oder Tabak (*Nicotiana tabacum* und *N. benthamiana*) zu infizieren.



Abb. 1: RpRSV-g befallene Rebstöcke in einem Weinberg in Schweigen / Südliche Weinstraße



Abb. 2: RPRSV-ch befallene Kirschbäume in Südbaden. Links sind die infizierten Bäume, rechts die gesunden Kirschbäume zu erkennen

Bislang ist RPRSV das am wenigsten erforschte Virus im Komplex der Reisigkrankheit. Es existiert nur die Sequenz der RNA2 eines britischen Isolates (RPRSV-s) (Blok *et al.*, 1993). Dieses britische Isolat tritt in Deutschland jedoch nicht auf.

1.4 Nepoviren

Der Begriff Nepovirus leitet sich von der Art der Übertragung (Nematoden übertragbar) und deren Form (polyedrische Partikel) ab. Der Durchmesser eines Viruspartikels beträgt etwa 28 nm (Abb. 3).

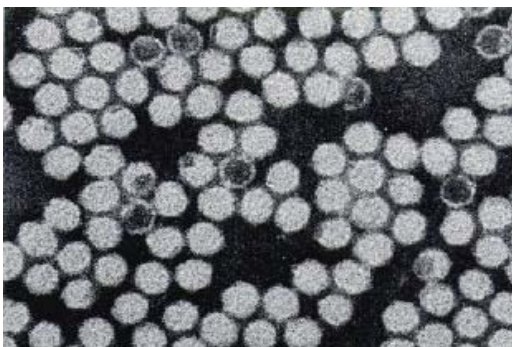


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme aufgereinigter Nepoviren (Murphy *et al.*, 1995)

Sämtliche Viren der Reisigkrankheit an Reben gehören zu der Gattung der Nepoviren. Die Nepoviren gehören zusammen mit den Fabaviren und den Comoviren zu der Familie der *Comoviridae* (Mayo and Martelli, 1993; Goldbach *et al.*, 1995). Zusammen mit anderen Virusfamilien gehören die Nepoviren zu der Gruppe der picornavirusartigen Viren (Mayo and Robertson, 1996). Nepoviren infizieren ein sehr breites Spektrum an Wirtspflanzen.

Die Übertragung der Viren findet durch bodenbürtige Nematoden der Familie *Longidoridae* statt. Die Nematoden sind kleine Fadenwürmer mit einer Länge von 0,5 bis 3 mm. Mit ihrem Mundstachel, dem sogenannten Stillet, stechen sie feine Wurzeln an, um die Zellinhaltsstoffe als Nahrung zu sich zu nehmen. Hierbei können sie auch Viren aufnehmen. Wandern nun diese virustragenden Nematoden zu einer gesunden Pflanze, um dort zu saugen, infizieren sie diese mit dem Virus. Es kommt somit zu einem herdartigen Auftreten der virusinfizierten Pflanzen. Die Nematoden können mehrere Monate infektiös bleiben (Martelli, 1978).

Ist das Wurzelsystem einer Pflanze mit einem Nepovirus infiziert, wandert dieses über das Phloem bis zu den Triebspitzen der Pflanzen (Langstreckentransport). Innerhalb eines Gewebes benutzen die Viren die Plasmodesmata, um von Zelle zu Zelle zu gelangen (Kurzstreckentransport). Aufgrund ihrer Fähigkeit, das Phloem für den Langstreckentransport zu nutzen, ist auch eine Übertragung durch Pfropfung möglich. Wurzeln erkrankter Pflanzen, die nach einer Rodung im Boden zurück bleiben, stellen noch über einen längeren Zeitraum eine Infektionsquelle dar. Weitere Übertragungsarten sind Samen und Pollen. Eine mechanische Übertragung durch Abreiben der Nepoviren auf Testpflanzen wie *Chenopodium quinoa* oder *Nicotiana benthamiana* ist ebenfalls möglich (Brückbauer und Rüdel, 1981).

Die Nepoviren besitzen zwei einzelsträngige, positiv orientierte RNA Stränge. Die RNA1 hat eine Größe von etwa 8000 Nukleotiden (nt) und die RNA2 eine Länge von etwa 4000 nt. Die RNA Stränge werden unabhängig voneinander in die Proteinhüllen verpackt (Wood, 1998). So zeigen sich für gewöhnlich bei Viruspartikeln aus infizierten Pflanzen drei unterschiedliche Typen: den „top“ (T), den „middle“ (M) und den „bottom“ (B) Typus, benannt nach ihrer Position nach einer Ultrazentrifugation im Saccharosegradienten. Beim T-Typ handelt es sich um leere Partikel, beim M-Typ um Partikel, die RNA2 enthalten und beim B-Typ um Viruspartikel mit der RNA1 (Mayo *et al*, 1973).

Beide RNA – Stränge sind am 3' Ende polyadenyliert und haben ein kovalent gebundenes Protein (VPg) am 5' Ende. Jeder RNA – Strang besitzt ein großes offenes Leseraster (ORF: „open reading frame“) flankiert von einer 3' und 5' nicht kodierenden Region (NCR: „non coding region“). Das offene Leseraster kodiert für ein großes Polyprotein, welches proteolytisch in kleinere funktionelle Proteine gespalten wird.

Die funktionellen Proteine der RNA1 sind die RNA abhängige RNA Polymerase (RNA dep. RNA pol.), eine Protease (Prot.), das VPg und eine Helikase (NTB: „nucleotide binding protein“). Weiterhin ist an der N-terminalen Region des RNA1 Polyproteins noch ein Protein, dessen Funktion noch nicht eindeutig geklärt ist. Es wird vermutet, dass es sich bei diesem Protein um einen Cofaktor der Protease handelt (Mayo and Robertson, 1996).

Die funktionellen Proteine der RNA2 sind das Hüllprotein (CP: coat protein), das Transportprotein (MP: movement protein) und das sogenannte 2A – Protein. Dieses 2A – Protein ist in den Replikationsprozess involviert (Gaire *et al.*, 1999). Die genomische Organisation eines Nepovirusgenoms ist in Abb. 4 dargestellt.

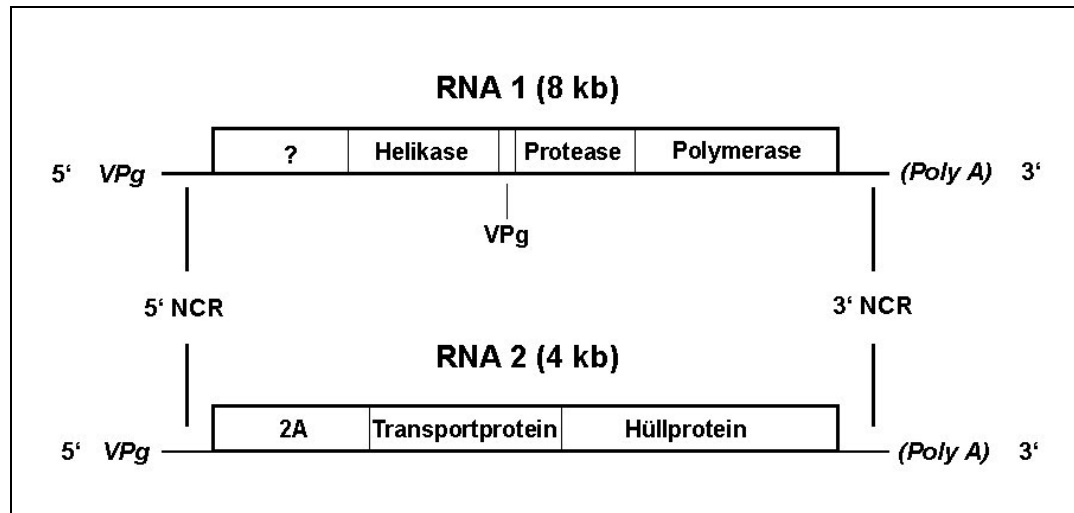


Abb. 4: Genomische Organisation eines Nepovirus

1.5 Virusresistenz

1985 wurde von Sanford und Johnston postuliert, dass Pflanzen, die einen Teil des Genoms eines Pathogens exprimieren, resistent gegenüber diesem Pathogen sind (Sanford and Johnston, 1985). Es wurde vermutet, dass die Expression dieses Teils des Pathogen-genoms den pathogenen Prozess unterbricht und somit die Resistenz auslöst. Der erste erfolgreiche Ansatz, der diese These aufnahm, wurde 1986 mit dem Tabak Mosaik Virus (TMV) durchgeführt (Abel *et al.*, 1986). Es wurden Tabakpflanzen der Gattung *Nicotiana tabacum*, die das Hüllprotein von TMV exprimierten, hergestellt. Hierbei war bei einigen Linien eine Verzögerung der Symptomausprägung zu beobachten, andere Linien zeigten keine TMV – Symptome. Dies ist jetzt bereits über 15 Jahre her, doch bis zum heutigen Zeitpunkt ist der Mechanismus dieser Resistenz noch nicht voll verstanden. Eine Vermutung lautet, dass das transgene Hüllprotein die Zusammensetzung der viralen Hüllproteine in den infizierten Zellen verhindert (Osborn *et al.*, 1989). Eine weitere Möglichkeit ist, dass das transgene Hüllprotein spezielle Rezeptoren, die für die Virusvermehrung essentiell sind, blockiert oder dass es als ein Elicitor der pflanzlichen Pathogenabwehr dient (Fitchen and Beachy, 1993). Bei diesem Ansatz der

Resistenzinduktion spricht man von Hüllprotein vermittelter Resistenz (CPMR: coat protein mediated resistance).

Basierend auf der CPMR wurden weitere transgene Tabakpflanzen erzeugt, die dieses Prinzip der Resistenzinduktion nutzten (Angenent *et al.*, 1990; Bardonnet *et al.*, 1994; Cuozzo *et al.*, 1998; Spielmann *et al.*, 2000). Untersuchungen von Golemboski *et al.* (1990) mit TMV und Tabakpflanzen, Anderson *et al.* (1992) mit dem Gurken Mosaik Virus (CMV) und Tabakpflanzen, Longstaff *et al.* (1993) mit dem Potato X Potexvirus (PVX) und Tabak und Beck *et al.* (1994) mit einem Potexvirus und Tabak zeigten, dass auch die Expression anderer viraler Komponenten, z.B. des Transportproteins oder der Replikase eine Resistenz induzieren kann. Die Erfahrung, dass das von der transgenen Pflanze exprimierte Hüllprotein eine Resistenz auslöst, indem es Effekte auf die Virionen hat, könnte bedeuten, dass eine transgen exprimierte Replikase einen Effekt auf die Virusreplikation, bzw. ein transgenes Transportprotein einen Effekt auf den Virustransport hat (Baulcombe, 1999). Man ging also immer von einem Effekt auf Proteinbasis aus.

Mit dem Replikasegen wurden viele transgene, virusresistente Pflanzen erzeugt. Braun and Hemenway (1992) stellten Tabakpflanzen her, die das Replikasegen von PVX exprimierten und resistent gegenüber PVX waren. Jones *et al.* (1998) exprimierten die Replikase des Pea Seed-borne Mosaic Potyvirus (PSbMV) in Erbsen und erhielten so resistente Erbsenpflanzen. Song *et al.* (1999) erzeugten Tabakpflanzen, welche die Polymerase von TMV exprimierten und resistent gegenüber TMV waren.

Auch mit dem Transportproteingen wurden virusresistente Pflanzen hergestellt. So stellten Sijen *et al.* (1996) Tabakpflanzen her, die das Transportprotein des Cowpea Mosaic Virus (CPMV) exprimierten und resistent gegenüber CPMV waren. Transgene Tabakpflanzen, die das Transportprotein des Tobacco Vein Mottling Potyvirus (TVMV) exprimierten, waren resistent gegenüber TVMV (Moreno *et al.*, 1998).

Es zeigten sich jedoch schnell einige Auffälligkeiten. Viele Pflanzen waren auch resistent, wenn die RNA nicht translatiert wurde, also kein Protein von der Pflanze exprimiert wurde (Jones *et al.*, 1998). Weiterhin gab es keine Korrelation zwischen dem Resistenzgrad und der Expression des Transgens (Baulcombe, 1996). Häufig waren sogar Pflanzen, die das Transgen nur wenig exprimierten, weniger anfällig als solche, die eine hohe Menge an Transgen zeigten. Es zeigte sich also, dass hier ein völlig anderer Resistenzmechanismus als der des CPMR vorliegt.

Einen ersten Hinweis zur Klärung dieses Phänomens erhielt man mit Tabakpflanzen, die einen Teil des Genoms des Tobacco Etch Virus (TEV) enthielten (Lindho *et al.*, 1993). Die Resistenz in einigen Linien dieser Pflanzen wurde durch TEV induziert. Mit Zunahme der

Resistenz nahm jedoch auch der Gehalt an transgener TEV RNA ab. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich um einen Mechanismus handelt, bei dem die Resistenz durch eine Degradierung der transgenen RNA induziert wird. Da TEV nur im Cytoplasma auftritt, ist dieser Mechanismus ebenfalls Cytoplasma gebunden (Lindho *et al.*, 1993). Diese Ergebnisse konnten in weiteren Experimenten mit PVX (Longstaff *et al.*, 1993) bestätigt werden. Kreuzungen von PVX transgenen Pflanzen zeigten, dass immer die Pflanzen resistent waren, die wenig transgene RNA enthielten. Es wurde somit von einem RNA – vermittelten - Mechanismus (RMVR: RNA-mediated virus resistance) gesprochen.

Gene silencing

Beim Gene silencing unterscheidet man zwischen dem „transcriptional-gene-silencing“ (TGS) und dem „post-transcriptional-gene-silencing“ (PTGS). Beim TGS handelt es sich um eine Inhibierung der Transkription, beim PTGS um eine Degradierung der mRNA. Aufgrund dessen, dass dem PTGS eine höhere Bedeutung zukommt, wird in den folgenden Ausführungen nur dieses näher behandelt. Ein PTGS führt zu einer Reduzierung von transgener RNA, dagegen führt ein schwaches oder fehlendes PTGS zu einer starken Anreicherung von transgener RNA (Hobbs *et al.*, 1990; Hobbs *et al.*, 1993; Elmayan and Vaucheret, 1996; English and Baulcombe, 1997). Man kann das PTGS auch als ein RNA-Silencing bezeichnen, da die Inaktivierung eines Gens durch einen gezielten Abbau der mRNA erfolgt (Baulcombe, 1999).

PTGS ist ein natürlicher Mechanismus zur Genregulation als auch ein antiviraler Abwehrmechanismus von Pflanzen. Lindbo *et al.* (1993) erkannten als erste einen Zusammenhang zwischen RNA-Silencing und Pflanzenviren. Sie konnten zeigen, dass die Pflanze nach einer Virusinfektion in der Lage ist, ein RNA-Silencing von virushomologen Transgenen in der Pflanze auszulösen. Die Aktivierung des Silencing führte zu einer Erholung der Wirtspflanze von der Ausgangsinfektion. Neu gewachsene Bereiche der Pflanzen waren symptom- und virusfrei. Die Pflanze hatte sich vollkommen von der Virusinfektion erholt. Weiterhin war die Pflanze resistent gegenüber einer weiteren Infektion mit dem selben Virus. Dieser Prozess wird als „Recovery“ bezeichnet. Er konnte sowohl bei dikotylen (Waterhouse *et al.*, 1999) als auch bei monokotylen Pflanzen (Ingelbrecht *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 1999; Heut *et al.*, 1999) beobachtet werden. Das „Recovery“ kann auch von verschiedenen Virusgattungen wie den Nepoviren (Ratcliff *et al.*, 1997) und den Caulimoviren (Covey *et al.*, 1997) induziert werden.

Das PTGS ist hoch sequenzspezifisch. So zeigten Pflanzen, welche die Hüllproteinsequenz von TEV enthielten, nur eine Resistenz gegenüber TEV, nicht jedoch gegenüber anderen Viren (Lindho *et al.*, 1993). Pflanzen, welche als Transgen eine Sequenz der Replikase eines europäischen Stammes von PVX enthielten zeigten Resistenz gegenüber anderen europäi-

schen PVX – Stämmen, keine Resistenz jedoch gegenüber südamerikanischen PVX - Stämmen (Longstaff *et al.*, 1993; Mueller *et al.*, 1995).

Der spezifische Auslöser des Gene silencing ist eine Nukleinsäure (Baulcombe, 1996). Da das Zielgen des PTGS in den meisten Fällen eine sense-RNA ist, wird angenommen, dass das antisense Produkt des Zielgens der Auslöser ist (Grierson *et al.*, 1991; Lindho *et al.*, 1993; Mueller *et al.*, 1995). Ein weiteres Indiz dafür, dass antisense RNA in das PTGS involviert ist, ist die Tatsache, dass antisense-RNA nicht natürlich in der Pflanze vorkommt. Sie tritt nur nach einem Befall mit Viren in der Pflanze auf. Es ist bekannt, dass antisense-RNA ein starker Inhibitor von Genexpression ist (Nellen and Lichtenstein, 1993; Wagner and Simons, 1994). Dieses Molekül bindet an den komplementären sense RNA Strang. Je nach Zielsequenz kann die antisense RNA die Translation verhindern oder die Stabilität des Zielgens beeinträchtigen. Weiterhin kann die gebildete doppelsträngige (ds) RNA von ds RNA abhängigen RNasen abgebaut werden (Nellen and Lichtenstein, 1993). Auch ds RNA kommt in Pflanzen nur bei einem Befall mit Pflanzenviren vor.

Neben der Herstellung der antisense RNA durch virale Polymerasen, gibt es zwei Möglichkeiten, antisense RNA in Pflanzen herzustellen. Die erste ist, transgene Pflanzen herzustellen, die die antisense RNA unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors selbst transkribieren (Grierson *et al.*, 1991). Die zweite Möglichkeit ist, dass die antisense RNA indirekt durch eine pflanzeigene RNA-abhängige-RNA-Polymerase (RdRP: RNA-de

pendent RNA polymerase), welche den sense-Strang als Matrize verwendet, hergestellt wird (Lindho *et al.*, 1993). Die Bildung einer solchen pflanzeigenen RdRP muss jedoch erst induziert werden.

Ein Indiz dafür, dass es sich bei der antisense RNA um einen Auslöser des Gene silencing handelt ist, dass in „*gesilenceten*“ Pflanzen kurze antisense RNA Sequenzen des Transgens gefunden wurden (Baulcombe, 1999). Die Sequenzen sind 21 - 23 Nukleotide lang und werden auch als „small interfering RNAs“ (siRNA) oder als „RNA interference“ (RNAi) bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass diese si RNA alle samt in der Lage sind, ein Gene silencing zu induzieren (Fire, 1999). Von der RdRP wird wahrscheinlich ein RNA antisense Strang des Transgens synthetisiert (Wassenegger and Pélissier, 1998). Die antisense RNA bindet an den sense Strang. Diese ds RNA wird dann von dem sogenannten „Dicer“ Komplex (einem Komplex aus RNase III ähnlichen Enzymen) in die siRNA zerlegt. Die siRNA selbst induziert nun sequenzspezifische Nukleasen, welche als RISC oder auch als RISC Komplex bezeichnet werden (Abb. 5; Baulcombe, 2002). Weiterhin kann die an den sense Strang gebundene siRNA auch als Primer für die RdRP dienen, was eine Verstärkung des silencing zur Folge hat (Hamilton and Baulcombe, 1999; Nishikura, 2001). siRNA wurden in transgenen Tabak-, Tomaten- und Arabidopsispflanzen, die eine PGTS aufwiesen, gefunden (Hamilton and Baulcombe, 1999; Dalmay *et al.*, 2000).

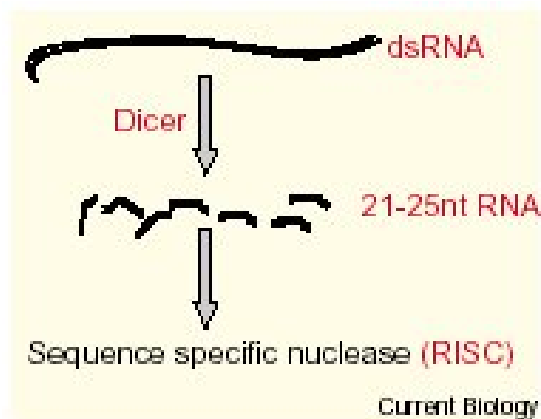


Abb. 5: Schematische Darstellung des RNA – Silencings bei Pflanzen (aus Baulcombe, 2002)

Neben dem Auftreten von siRNA gibt es noch eine molekulare Besonderheit bei „gesilenceten“ Pflanzen. Grierson *et al.*, 1991; Ingelbrecht *et al.* (1994); Smith *et al.* (1995); English *et al.* (1996) berichten über eine Methylierung des am silencing beteiligten Transgens. So wurde bei transgenem Tabak ein Zusammenhang zwischen der Stärke des Gene silencing und dem Grad an Methylierung des npt-Transgens festgestellt: die Methylierung war bei den Pflanzen am ausgeprägtesten, welche auch ein starkes Gene silencing zeigten (Smith *et al.*, 1995). Ein ähnliches Phänomen wurde bei transgenen Tabakpflanzen, die ein Silencing des GUS – Gens zeigten, beobachtet. Eine Methylierung war vor allem am 3' Ende des GUS – Transgens zu beobachten. Nach Grierson *et al.* (1991) ist dieses 3' Ende der resultierenden RNA das Ziel des Gene silencing. Bislang ist noch nicht bekannt, ob die Methylierung des Transgens Ursache oder Folge des PTGS ist. Es konnte jedoch eine Aufhebung des PTGS durch die Applikation von 5-Azacytidin erzielt werden (Palmgren *et al.*, 1993), welches die DNA-Methylierung hemmt.

Neben der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase (Lindho *et al.*, 1993) sind noch weitere Enzyme am Gene silencing beteiligt. Ketting *et al.* (1999) isolierten ein entsprechendes Gen welches ein Homologon eines RNA degradierenden Enzyms, der RNaseD ist. Weiterhin konnte das *qde-3* Gen kloniert werden, welches zu der Familie der RecQ DNA-Helikasen gehört. Diese Helikasen spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Gene silencing in *Neurospora* (Cogoni and Macino, 1999).

Die Herstellung virusresistenter Pflanzen durch Induktion des Gene silencing gelang sowohl durch Übertragung von Virussequenzen in das Genom der Pflanzen in sense (Beck *et al.*, 1994) als auch in antisense (Grierson *et al.*, 1991) Orientierung. Waterhouse *et al.*, (1998) entwickelten Genkonstrukte, die virale Sequenzen sowohl in sense als auch in antisense Orientierung beinhalteten. Diese sogenannten „inverted repeat“ – Konstrukte bilden vermutlich einen doppelsträngigen RNA-Strang, der sehr effizient Virusresistenz durch Gene silencing induzieren kann. Smith *et al.* (2000) konnte durch den Einbau eines Introns als Spacer zwi-

schen der sense und antisense Sequenz die Wahrscheinlichkeit immune Pflanzen zu erhalten nochmals erhöhen. Das Intron wird nach der Transkription herausgeschnitten (*splicing*), die komplementären RNA-Stränge bilden einen RNA-Doppelstrang, welcher dann das Gene silencing induziert.

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war die molekularbiologische Charakterisierung beider RpRSV – Stämme. Auf der Grundlage der erhaltenen Daten konnte ein Genkonstrukt entwickelt werden, welches nach Übertragung in Pflanzen Resistenz gegenüber RpRSV induzieren sollte. Vor der Übertragung des Konstrukts in Reben erfolgte eine Überprüfung in Tabak.

Die vollständige Sequenzierung der RpRSV-Stämme erlaubte auch die Entwicklung eines infektiösen Klons.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Kits, Enzyme, Antikörper und Primer

Alle für die Gewebekultur verwendeten Chemikalien, Medien, Hormone und Antibiotika wurden von der Firma Duchefa (Niederlande) bezogen. Chemikalien für Puffer und sonstige Lösungen stammten von der Firma Roth.

Die Kits zur Gelisolierung und Aufreinigung von PCR – Produkten sowie zur Miniprep-Plasmidpräparation wurden von der Firma Macherey-Nagel (Düren) bezogen. Das Kit zur Maxiprep-Plasmidpräparation stammte von der Firma QIAGEN (Hilden). Zur Plasmidpräparation aus *Agrobacterium tumefaciens* wurde das „WIZZARD Kit“ der Firma Promega (Mannheim) verwendet.

Sämtliche Restriktionsenzyme wurden, so weit nicht anders angegeben, von der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) bezogen, ebenso sämtliche Polymerasen und Nukleasen und weitere Enzyme. Die T4-Ligase stammte von der Firma Biolabs (USA).

Die Antikörper (IgG und Konjugat) für RpRSV-ch wurden von BIOREBA (Schweiz) geliefert. Die Antikörper für RpRSV-g stammten von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur GmbH (DSMZ).

Sämtliche Primer wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, in HPSF-gereinigter Qualität und einer Konzentration von 0,05 μmol bezogen. Die bioinformatischen Arbeiten (u. a. Sequenzvergleiche) wurden mit der Software „DNA-Star“ von Stratagene durchgeführt.

2.1.2 Bakterienstämme

Escherichia coli – Stämme:

Zur Klonierung von Plasmiden wurden die *E. coli* – Stämme DH5 α (Invitrogen) sowie JM101 (Stratagene) verwendet. Beide Stämme sind zur α - Komplementation fähig. In Verbindung mit Plasmiden, die das *lacZ* Gen enthalten, ist somit eine Blau–Weiß Selektion rekombinanter Bakterienkolonien auf IPTG/X-Gal haltigen Agaroseplatten möglich.

Agrobacterium tumefaciens – Stämme:

Für die Pflanzentransformationsexperimente wurde lediglich der *A. tumefaciens* – Stamm ATHV (Hood *et al.*, 1986) verwendet. Die Eigenschaften von ATHV sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Der für die Transformation von Pflanzen verwendete *A. tumefaciens* Stamm und dessen Eigenschaften

	Genomische Antibiotikaresistenz	Helferplasmid	Antibiotikaresistenz des Helferplasmids
ATHV	C58C1 Rif ^r	pEHA101	Km ^r deletiert

2.1.3 Plasmide

- pUC18/19 (Invitrogen) Standardklonierungsvektoren mit einer Ampicillinresistenz; wurde zur Klonierung von PCR – Produkten verwendet
- pCassII Plasmid, basierend auf pUC19 mit doppeltem 35S Promotor und Poly(A) Signal aus CaMV (Shi *et al.*, 1997)
- pRT101 Plasmid, basierend auf dem pUC-Vektor, welches den 35S Promotor und das Poly(A) Signal aus dem CaMV–Stamm „Cabb B-D“ enthält (Töpfer *et al.*, 1987)
- pPZPbar Binärer Vektor zur *Agrobacterium*-vermittelten Transformation von Pflanzen; enthält eine Spectinomycin/Streptomycin-Resistenz zur Selektion von transformierten Bakterien. Weiterhin enthält der Vektor das Gen für die Phosphinotricin-Acetyl-Transferase (PAT) unter

- der Kontrolle des nos-Promotors und nos-Terminators zur Selektion der transformierten Pflanzen.
- pPZPnptII
Binärer Vektor zur *Agrobacterium*-vermittelten Transformation von Pflanzen; enthält eine Spectinomycin/Streptomycin-Resistenz zur Selektion von transformierten Bakterien. Weiterhin enthält der Vektor das nptII-Gen (Kanamycinresistenz) unter der Kontrolle des nos-Promotors und nos-Terminators zur Selektion der transformierten Pflanzen.

2.1.4 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Für die Experimente wurden Pflanzen der Gattung *Chenopodium quinoa* sowie *Nicotiana benthamiana* Sorte „Evergrow“ verwendet. Die Samen der Pflanzen wurden in Pflanz Erde (Floraton 3, Floraton Oldenburg) ausgesät. Etwa 14 Tage nach der Keimung wurden die Keimlinge in Pflanz Erde der Sorte Floraton 1 (Floraton Oldenburg) pikiert. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus bei 26 °C und einem Tag/Nachtrhythmus von 16/8 Stunden.

2.1.5 Virusmaterial

- RpRSV-ch: Infektiöses Material wurde in Form von frischen, infizierten *C. quinoa* - Blättern von der Firma BIOREBA bezogen
- RpRSV-g: Infektiöses Material wurde in Form von getrockneten, infizierten *C. quinoa* – Blättern von der DSMZ bezogen

2.2 Inokulationstechniken und serologischer Nachweis von RpRSV

2.2.1 Vermehrung von RpRSV in *Chenopodium quinoa*

Ein halbes Gramm infiziertes Blattmaterial (von *C. quinoa*) wurde in 10 ml Inokulationspuffer homogenisiert und auf die ersten voll ausgebildeten Blätter von *C. quinoa* Pflanzen abgerieben. Die Pflanzen hatten zu diesem Zeitpunkt vier bis fünf Blätter voll ausgebildet. Nach Inokulation wurden die Pflanzen 24 Stunden unter einer Haube inkubiert. Anschließend wurden die abgeriebenen Pflanzen mit Wasser abgesprüht.

Pflanzen, die mit RpRSV-g inokuliert waren, wurden 14 Tage nach der Inokulation und die mit RpRSV-ch inokulierten Pflanzen wurden sechs Tage nach der Inokulation geerntet und getestet.

Inokulationspuffer:

0,03 M K_2HPO_4

0,05 M Glycin

pH 9,2 eingestellt mit 1 M KOH

1 % Bentonit

1 % Celite

Der Puffer wurde autoklaviert (121 °C, 20 min) und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2 'Challenge Inokulation' mit RpRSV-ch

Zur Testung der Resistenz in transgenen Pflanzen (*N. benthamiana*) wurden 'Challenge Inokulationen' mit RpRSV-ch durchgeführt. Die Testung erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben. Allerdings erfolgte die Inokulation nachdem drei Blätter voll entwickelt waren. Inokuliert wurden die ältesten zwei Blätter. Als Kontrolle wurden nicht transgene *N. benthamiana* Pflanzen mit RpRSV-ch inokuliert. Der Nachweis einer Infektion erfolgte mittels ELISA 6 und 13 Tage nach der Inokulation. Hierbei wurde der Extinktionswert bei 405 nm direkt nach Zugabe des Substrats und anschließend alle 30 Minuten gemessen.

2.2.3 Inokulation von Nukleinsäuren

Zur Inokulation von Nukleinsäuren wurden die Plasmide mit den full length Klonen im Verhältnis 1:3 in Inokulationspuffer aufgenommen.

Inokuliert wurden jeweils drei Blätter von *C. quinoa* (4 – 5 Blatt – Stadium). Die Pflanzen wurden direkt nach dem Inokulieren für vier Stunden im Schatten (nicht im Gewächshaus!) unter einer Haube inkubiert. Anschließend wurden sie mit etwas Wasser abgesprüht und unter einer Haube ins Gewächshaus gestellt. Nach 12 – 15 Stunden wurde die Haube entfernt und die Pflanzen wurden nochmals mit Wasser abgesprüht. Der Nachweis der Infektion erfolgte 13 Tage nach der Inokulation mittels ELISA.

2.2.4 Serologischer Nachweis von RpRSV

Als serologischer Nachweis des Virus wurde der ELISA verwendet. Die hierfür verwendeten ELISA-Platten wurden von der Firma Nunc bezogen. Folgendermaßen wurde beim ELISA vorgegangen:

1. Beschichten der Platte mit dem Antikörper
 - Antikörper in Coating-Puffer lösen (1 µl Antikörper je ml Puffer)
 - 100 µl in jede Zelle der ELISA-Platte
2. Inkubation bei 37 °C für vier bis fünf Stunden
3. Waschen der ELISA-Platte
 - 3 – 4 mal mit Waschpuffer spülen, hierbei den Waschpuffer etwa 2 min in den Zellen stehen lassen
 - Flüssigkeit gut abtropfen lassen
4. Zugabe des Pflanzenextrakts
 - 100 µl des Pflanzenextrakts je Zelle
5. Inkubation bei 4 °C für mindestens 16 Stunden
6. Waschen der ELISA-Platte (siehe Schritt 3)
7. Zugabe des konjugierten Antikörpers
 - lösen des Antikörpers in Konjugat-Puffer (1 µl (BIOREBA-Antikörper) bzw. 2 µl (DSMZ-Antikörper) konjugierter Antikörper je ml Puffer)
 - 100 µl in jede Zelle der ELISA-Platte
8. Inkubation bei 37 °C für fünf Stunden
9. Waschen der ELISA-Platte (siehe Schritt 3)
10. Zugabe des Substrats

→ lösen des Substrats (p-Nitrophenyl-Phosphat) in Substrat-Puffer (1 mg Substrat je ml Puffer)

→ 100 µl in jede Zelle der ELISA – Platte

11. Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln für mindestens ein bis zwei Stunden

12. Messung der Extinktion bei 405 nm

Das zu untersuchende Pflanzenmaterial (zwei Blattscheiben mit einem Durchmesser von einem cm) wurde in Extraktionsbeutel gegeben. Es wurden je Beutel 3 ml Extraktionspuffer zugegeben. Die Proben wurden mit einem Homogenisator (HOMEX) homogenisiert.

Verwendete Puffer

Waschpuffer, Coating-Puffer, Konjugate-Puffer und Substrat-Puffer wurden entsprechend der Anleitung von BIOREBA angesetzt. Der Extraktionspuffer wurde als 10x Stammlösung direkt von der Firma BIOREBA bezogen. Alle Lösungen (außer 10x Waschpuffer) waren bei 4 °C ein bis zwei Monate haltbar.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Linearisieren von Vektoren:

Um ein Fragment (z. B. ein PCR-Produkt) in einen Vektor zu ligieren, muss dieser zunächst linearisiert werden:

- 2,5 µg Vektor
- 40 U Restriktionsenzym (z. B. *Sma* I bei pUC18/19)
- 20 µl 10x Puffer
- mit H₂O auf ein Endvolumen von 200 µl
- 90-120 Minuten inkubieren (Temperatur ist abhängig vom gewählten Restriktionsenzym)
- 40 U Restriktionsenzym
- nochmals 90 – 120 Minuten inkubieren

Aufreinigung des linearisierten Vektors (Phenol/Chloroform – Aufreinigung mit anschließender alkoholischer Fällung):

- 200 µl Phenol/Chloroform (fertige Mischung der Firma Roth) und 200 µl Restriktionsansatz hinzu pipettieren und sehr gut mischen (Vortex)
- zwei Minuten bei 13.500 rpm und 4 °C zentrifugieren; wässrige Phase in ein neues Gefäß überführen
- 200 µl Chloroform hinzugeben, sehr gut mischen (Vortex)
- zwei Minuten bei 13.500 rpm und 4 °C zentrifugieren; wässrige Phase in ein neues Gefäß überführen
- 20 µl Natriumacetat (3M, pH 5,2) und 550 µl Ethanol (100 %) hinzugeben; gut mischen
- die DNA 30 – 60 Minuten bei –20 °C fällen
- 30 Minuten bei 13.500 rpm und 4 °C zentrifugieren; Flüssigkeit vorsichtig dekantieren
- Pellet mit 1.000 µl Ethanol (70 %) waschen
- 10 Minuten bei 13.500 rpm und 4 °C zentrifugieren; Flüssigkeit vorsichtig dekantieren und Pellet trocknen lassen
- Pellet in H₂O aufnehmen (20 µl bei einer anschließenden Dephosphorylierung; 43,5 µl bei einem anschließenden t-tailing)

Dephosphorylierung:

Um die Religation eines linearisierten Vektors bei der Ligation zur Klonierung eines Inserts zu vermeiden, wurden die 5' Phosphatgruppen der kompatiblen Enden des Plasmids entfernt. Hierzu wurde die Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) der Firma Roche, Penzberg verwendet.

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

- 20 µl linearisiertes Plasmid
- 2,5 µl 10x Dephosphorylierungspuffer
- 2,5 µl SAP (1 U/µl)

Es folgte eine Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37 °C. Bei einer Dephosphorylierung von klebrigen Enden genügte eine Inkubationszeit von 15 – 20 Minuten, bei glatten Enden war eine Inkubationszeit von 60 Minuten erforderlich. Die SAP wurde anschließend für 15 Minuten bei 65 °C inaktiviert. Das linearisierte und dephosphorylierte Plasmid wurde aliquotiert und konnte nun direkt für die Ligation verwendet werden. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C.

Herstellung von t-tailed Vektoren:

Da die *Taq* Polymerase am 5' Ende des PCR –Produkts ein Adenin anheftet, musste der Vektor, in den das PCR–Produkt ligiert werden sollte, t-tailed sein, d. h. ein Thymin musste an das 5' Ende des linearisierten Vektors gehängt werden.

t-tailing des Vektor:

- 43,5 µl linearisiertes Plasmid
- 5 µl 10x PCR-Puffer (mit Mg)
- 1 µl dTTP (100 mM)
- 0,5 µl *Taq* (5U/µl)

bei 72 °C für 90 – 120 Minuten inkubieren

mit H₂O auf 200 µl Gesamtvolumen auffüllen

Es folgte eine erneute Phenol/Chloroform Aufreinigung mit einer anschließenden alkoholischen Fällung. Das Pellet wurde in 50 µl H₂O gelöst und 1 µl wurde auf einem 1 %igen Agarosegel überprüft. Es wurden Aliquots von 1–2 µl angefertigt und bei –80 °C gelagert.

Phosphorylierung von Oligonukleotiden:

Um die Ligation von PCR–Produkten zu erleichtern, wurden die entsprechenden Primer vor der PCR an ihren jeweiligen 5' Enden phosphoryliert. Hierzu wurde die T4 Polynukleotidkinase (PNK) verwendet. Die PNK katalysiert den Transfer der γ – Phosphatgruppe des ATP an das 5'-Hydroxylende von DNA bzw. RNA.

Reaktionsansatz:

- 5 µl Oligonukleotid (10 µM)
- 2,5 µl 10x PNK-Reaktionspuffer
- 2,5 µl ATP (10 mM)
- 1 µl PNK (10 U/µl)
- 14 µl H₂O

Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für 15 min bei 37 °C. Anschließend wurde die PNK bei 75 °C für 10 min inaktiviert. Die Oligonukleotide konnten direkt für die PCR verwendet werden. Die phosphorylierten Oligonukleotide wurden bei –20 °C gelagert.

Ligation:

Für die Ligation der linearisierten Vektoren mit den entsprechenden Fragmenten wurde die T4-DNA Ligase verwendet. Um eine möglichst effektive Ligation zu erhalten, sollte das Verhältnis von Vektor zu klonierendem Fragment etwa 1:3 betragen. Eine Abschätzung der eingesetzten Volumina erfolgte anhand der Leuchtintensität der im Agarosegel aufgetrennten Fragmente.

Ligationsansatz:

- 8,5 µl Vektor und Fragment im Verhältnis 1:3
- 1 µl 10x Ligationspuffer
- 0,5 µl T4-DNA Ligase

Bei der Ligation eines vorbereiteten Vektors (z. B. einem t-tailed Vektor) mit einem PCR oder RT-PCR Produkt wurde folgender Ligationsansatz verwendet:

- 1 – 2 µl Vektor
- 2 – 3 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
- 1 µl 10x Ligationspuffer
- 0,5 µl T4-DNA Ligase
- mit Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl auffüllen

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 13 – 15 °C inkubiert. Für die Transformation wurden 2,5 µl Ligationsansatz verwendet.

2.3.2 Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation der kompetenten DH5α – Zellen (Invitrogen) bzw. der kompetenten JM101 – Zellen (Stratagene) erfolgte nach Angaben der Hersteller. Die hierbei verwendeten LB- und SOC-Medien wurden nach Ausubel et al. (1994) angesetzt.

2.3.3 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Herstellung kompetenter *A. tumefaciens*

Im Gegensatz zu *E. coli* wurden die *A. tumefaciens* mittels eines Elektroschocks transformiert. Hierzu mussten zunächst elektrokompente *Agrobacterien* hergestellt werden:

- Einzelkolonie von einer Platte picken und in 8 ml LB bei 27 °C für 48 h auf einem Schüttler (180 – 250 rpm) kultivieren
- 5 ml der Bakteriensuspension in 200 ml LB überimpfen
- bei 300 rpm und 27 °C wachsen lassen bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,7 und 1,0
- die Bakteriensuspension in 50 ml Polyethylenröhrchen (Falcon) aliquotieren und 10 min. auf Eis stellen
- 10 min. bei 7500 rpm und 4 °C zentrifugieren; Überstand dekantieren
- die Bakterien in $\frac{2}{3}$ des Originalvolumens mit sterilem Wasser resuspendieren
- erneut zentrifugieren (5 min. bei 7500 rpm und 4 °C); Überstand verwerfen und die Bakterien in $\frac{1}{3}$ des Originalvolumens mit sterilem resuspendieren
- erneut zentrifugieren, den Überstand verwerfen und die Bakterien in 10 % Glycerol resuspendieren ($\frac{1}{10}$ des Originalvolumens)
- 5 min bei 5500 rpm und 4 °C zentrifugieren; Überstand verwerfen und die Pellets in 250 µl Glycerol (10 %) resuspendieren
- Aliquots zu je 50 µl anfertigen

Die Aliquots wurden entweder sofort aufgebraucht oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

Transformation

- kompetente *Agrobakterien* auf Eis auftauen lassen
 - 1 µl Plasmid-DNA zu 50 µl Bakterien pipettieren und gut mischen
 - eine Minuten auf Eis inkubieren lassen
 - Probe in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette pipettieren
 - Elektroporationsparameter: 2,5 kV, 25 µF, 200 Ω
 - Bakterien in 1 ml SOC-Medium aufnehmen, gut durchmischen und in ein frisches Gefäß überführen
 - 1 bis 2 Stunden bei 27 °C inkubieren
 - entsprechende Verdünnungen (10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3}) auf festes LB-Medium mit Antibiotika (verwendete Antibiotika hängen vom transformierten Plasmid ab) ausplattieren
- 2 - 3 Tage bei 27 °C inkubieren

2.3.4 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Alkalische Lyse:

Die Plasmidpräparation erfolgte in Anlehnung an Ausubel *et al.* (1994) nach einem modifizierten Protokoll.

Zunächst wurde 1 ml LB-Flüssigmedium mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Es folgte eine Inkubation der Bakterien über Nacht bei 37 °C und 200 rpm. Die Übernachtskultur wurde zur Plasmidisolierung verwendet.

- 1 ml Übernachtskultur zentrifugieren (5 min 13.500 rpm)
 - Pellet in 200 µl Puffer 1 (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA, 1 µg/ml RNaseA) resuspendieren (Vortex)
 - 200 µl Puffer 2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) zugeben; 6x invertieren
 - 200 µl Puffer 3 (3 M KAc pH 5,5) zugeben; 6x invertieren
 - 5 min auf Eis inkubieren
 - 10 min. zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit (wenn möglich bei 4 °C), Überstand in frisches Reaktionsgefäß überführen
 - 500 µl Isopropanol hinzugeben und 10 min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren (4 °C), Überstand verwerfen
 - 800 µl 70 %iges Ethanol zugeben, 5 min. zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit (4 °C), Überstand verwerfen
 - Pellet trocknen lassen, in 10 – 20 µl DEPC-H₂O aufnehmen
- 3 µl der Präparation wurden in einem Restriktionsverdau überprüft.

Die beschriebene Methode eignete sich zur Isolierung von Plasmiden mit einer hohen Kopienzahl (z. B. pUC18/19) und wurde zu Überprüfung bei einer großen Anzahl von Klonen verwendet. Bei *E. coli* vom Stamm JM101 oder bei *Agrobacterien* ließ sich diese Methode nicht einsetzen, da die Ausbeute an Plasmid-DNA und der Reinheitsgrad nicht ausreichend waren.

Plasmidpräparationen mit einem Plasmidpräparationskit:

Um größere Mengen an Plasmid-DNA mit einem hohen Reinheitsgrad zu erhalten, wurde ein Plasmidpräparationskit (Miniprep, Maxiprep; Qiagen) verwendet. Hierbei erfolgte die Präparation entsprechend der Anleitung beschrieben.

Die Qualität der Präparation wurde mittels Restriktionsverdau überprüft.

2.3.5 Restriktion von DNA

Zur Überprüfung einer Plasmidpräparation, zu speziellen Linearisierungen von Plasmiden bzw. zur Isolierung eines bestimmten Inserts aus einem Plasmid wurden Restriktionsverdauungen durchgeführt.

Folgender Reaktionsansatz wurde pipettiert:

- x µl Plasmid (abhängig von der Qualität und Menge des Plasmids)
- 1 µl 10x Restriktionspuffer (die Art des Puffers ist von den verwendeten Restriktionsenzymen abhängig)
- 2 U je Restriktionsenzym
- mit H₂O auf ein Endvolumen von 10 µl auffüllen

Der Ansatz wurde 2 – 3 Stunden in einem Wasserbad bei der erforderlichen Temperatur inkubiert.

2.3.6 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Nukleinsäure-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Bei der Messung wurde die optische Dichte (OD) der DNA bzw. RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Messung erfolgte an einem UV-16101PC Photometer (Shimadzu) in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Nach Sambrook *et al.* (1989) entspricht eine OD von 1 bei 260 nm einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (42 µg/ml für RNA).

2.3.7 Virusisolierung und Aufreinigung der viralen RNA

Arbeiten mit RNA erfolgten möglichst steril und RNase-frei um den Abbau durch RNasen zu verhindern. Hierzu war es notwendig, das verwendete Wasser mit Diethyl-Pyrocyanat (DEPC) zu inkubieren und zu autoklavieren. DEPC carboxyliert Aminosäurereste von Proteinen und inaktiviert diese. Beim Autoklavieren zerfällt DEPC zu H₂O und CO₂.

Die Virusisolierung und Aufreinigung der viralen RNA wurde in Anlehnung an le Gall *et al.* (1989) und Blok *et al.* (1992) durchgeführt. Die gesamte Isolierung erstreckte sich über drei Tage:

1. Tag:

- homogenisieren des infizierten Pflanzenmaterials in Extraktionspuffer (etwa 50 g Pflanzenmaterial in 100 ml Extraktionspuffer)

Zusammensetzung des Extraktionspuffers:

0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH7,0)
+ 0,1 M Ascorbinsäure
+ 0,01 M Na-EDTA

homogenisieren im Mixer oder mit Mörser und Pistill

- durch ein grobes Tuch filtrieren; Filtrat weiterverwenden
- Filtrat auf 8,5 % (v/v) Butanol einstellen; 15 – 30 min bei RT leicht rühren
- 20 min bei 10.000 g und 10 °C zentrifugieren
- Überstand auf 10 % PEG 6.000 und 0,17 M NaCl einstellen
- eine Stunde bei Raumtemperatur leicht rühren
- 20 min bei 10.000 g und 10 °C zentrifugieren
- Überstand abschütten und Pellets trocknen lassen
- Pellets in insgesamt 20 ml Na-Phosphat Puffer (0,1 M; pH 7,0) aufnehmen und bei 4 °C über Nacht rühren lassen

2. Tag:

- 5 min bei 8.000 g und 10 °C zentrifugieren; Überstand abziehen und weiter verwenden; sollte der Überstand noch trübe sein, gegebenenfalls nochmals zentrifugieren
- Überstand für 2,5 h bei 45.000 rpm und 4 °C zentrifugieren (der Rotor der Zentrifuge sollte vorgekühlt sein)
- Pellet in 0,5 ml sterilem Na-Phosphat Puffer (0,1 M; pH 7,0) aufnehmen; sollte aus dem Virusisolat die RNA sofort isoliert werden, wurde das Pellet in 0,5 ml Resuspensions-Puffer aufgenommen

Zusammensetzung des Resuspensions-Puffers:

10 mM Tris-HCl
50 mM NaCl
1 mM di-Na EDTA
pH 7,5

- 20 min bei RT rühren bzw. schütteln
- das Virusisolat aliquotieren

Das Virusisolat konnte ab diesem Zeitpunkt bei -80 °C gelagert werden.

Es folgte nun die eigentliche Isolierung der viralen RNA. Hierzu wurden zwei verschiedene Methoden verwendet:

Methode 1:

- 500 µl Virusisolat mit 500 µl Phenol versetzen und gut durchmischen (Vortex)
- 2 min bei 4 °C und 13.500 rpm zentrifugieren
- wässrige Phase in ein neues Gefäß überführen und mit 500 µl Phenol/Chloroform (1/1; Chloroform = Chloroform/Isoamylalkohol 20/1) versetzen und gut durchmischen (Vortex)
- 2 min bei 4 °C und 13.500 rpm zentrifugieren; wässrige Phase in ein neues Gefäß überführen
- 500 µl Chloroform hinzugeben und gut durchmischen (Vortex)
- 2 min bei 4 °C und 13.500 rpm zentrifugieren
- wässrige Phase abziehen und 50 µl NaAc (3 M; pH 5,2) und 1 ml Ethanol (100 %) hinzugeben und mehrmals invertieren
- RNA bei -20 °C über Nacht fällen
- 30 min bei 4 °C und 13.500 rpm zentrifugieren; Überstand abschütten
- Pellet mit 1,0 ml Ethanol (70 %) waschen
- 5 min bei 4 °C und 13.500 rpm zentrifugieren; Überstand abschütten
- Pellet trocknen lassen
- Pellet in 40 µl H₂O (DEPC!) aufnehmen

Methode 2:

- 250 µl Virusextrakt mit 20 µl SDS (20 %) und 5 µl Prot. K (10 mg/ml) versetzen und gut durchmischen
- 15 min bei 37 °C inkubieren
- 300 µl Phenol hinzugeben (Vortex)
- 2 min bei 4 °C und 13.500 rpm zentrifugieren; wässrige Phase abziehen
- wässrige Phase mit 300 µl Phenol/Chloroform (1/1; Chloroform = Chloroform/Isoamylalkohol 20/1) versetzen (Vortex)
- 2 min bei 4 °C und 13.500 rpm zentrifugieren; wässrige Phase in ein neues Gefäß überführen
- 300 µl Chloroform hinzugeben (Vortex)
- 2 min bei 4 °C und 13.500 rpm zentrifugieren; wässrige Phase abziehen
- 30 µl NaAc (3M, pH 5,2) und 750 µl Ethanol (100 %) hinzugeben (Vortex)
- die RNA 30 bis 60 Minuten bei RT fällen lassen
- 30 min bei 4 °C und 13.500 rpm zentrifugieren; Überstand abschütten
- Pellet mit einem ml Ethanol (70 %) waschen

- 5 min bei 4 °C und 13.500 rpm zentrifugieren; Überstand abschütten
- Pellet trocknen lassen
- Pellet in 40 µl H₂O (DEPC!) aufnehmen

Nach beiden Methoden wurde die Qualität der isolierten RNA gelelektrophoretisch überprüft. Die virale RNA wurde anschließend aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

2.3.8 Herstellung doppelsträngiger cDNA

Bei der Herstellung doppelsträngiger cDNA (ds cDNA) wurde ausgehend von einem viralem RNA Strang ein doppelsträngiger DNA Strang hergestellt. Die Methode wurde in Anlehnung an Gubler and Hoffman (1983) in einer leicht veränderten Form durchgeführt.

1. Denaturierung der viralen RNA

- 500 ng virale RNA
- 1 µl 0,1 M Methyl – Quecksilberhydroxid (MMH)
- mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 18 µl auffüllen
- 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 µl β-Mercaptoethanol (700 mM) hinzugeben
- 5 min bei Raumtemperatur inkubieren

Die Denaturierung der viralen RNA mit Hilfe von MMH hat sich vorteilhaft gegenüber der Denaturierung durch Hitze (70 °C) erwiesen. Die erhaltenen DNA – Fragmente waren hierbei deutlich länger. Durch die Zugabe von Mercaptoethanol wird verhindert, dass MMH im weiteren Reaktionsverlauf die Enzyme denaturiert.

2. Synthese der cDNA

- 20 µl denaturierte virale RNA (siehe oben)
- 7,5 µl Primer (zu Beginn wurde Oligo(dT) als Primer verwendet)
- 10 µl 5x 1st Strang Puffer
- 2,5 µl dNTP (10mM)
- 5 µl DTT (100 mM)
- 5 µl Reverse Transkriptase (1250 U)
- eine Stunde bei 42 °C inkubieren

Unter den oben genannten Bedingungen synthetisiert die Reverse Transkriptase den cDNA Strang. Die cDNA bleibt kovalent an der viralen RNA gebunden, so dass ein RNA-DNA Doppelstrang entsteht.

3. Synthese des zweiten cDNA – Strangs

- 50 µl cDNA Ansatz (siehe oben)
- 100 µl 2,5x 2nd Strang Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,2; 225 mM KCl; 7,5 mM MgCl₂; 7,5 mM DTT; 0,125 mg/ml Rinderserum Albumin (BSA); steril filtriert)
- 2,5 µl BSA (1 mg/mg)
- 3,5 µl DNA Polymerase 1 (35 U)
- 1,5 µl RNase H (8 U)
- 92,5 µl H₂O
- eine Stunde bei 16 °C und eine weitere Stunde bei 22 °C inkubieren

Die RNase H ist eine Endoribonuklease die spezifisch den RNA Strang bei RNA-DNA Hybriden abbaut. Die optimale Aktivität liegt bei 37 °C. Bei 16 °C ist die RNase H nicht in der Lage, den kompletten RNA – Strang abzubauen. Sie schneidet nur einzelne Fragmente aus der RNA heraus, so dass RNA Lücken im RNA-DNA Doppelstrang entstehen. Die DNA Polymerase 1 besitzt eine 5' → 3' Polymerase Aktivität und ist in der Lage, die im RNA-DNA Doppelstrang entstandenen RNA Lücken mit einem DNA Strang zu füllen. Als Primer dienen ihr hierzu die verbleibenden RNA Fragmente.

Durch die Erhöhung der Temperatur von 16 auf 22 °C baut die RNase H die verbleibende RNA ab. Die Polymerase 1 füllt nun die entstandenen Lücken erneut mit DNA auf. Als Primer dienen nun die DNA Fragmente, die bereits bei 16 °C synthetisiert wurden. Da die Polymerase 1 nur eine 5' → 3' Polymeraseaktivität besitzt, erhält man jedoch am 3' Ende des ersten cDNA Strangs einen einzelsträngigen Überhang, der in einem weiteren Versuch entfernt werden muss. Zunächst musste die erhaltene ds cDNA jedoch aufgereinigt und gefällt werden.

4. Phenol / Chloroform Extraktion und alkoholische Fällung

- 250 µl ds cDNA Ansatz
- 250 µl Phenol/Chloroform (Firma Roth); sehr gut mischen (Vortex), 2 min bei 13.500 rpm und 4 °C zentrifugieren; wässrige Phase in ein neues Gefäß überführen
- 250 µl Chloroform; sehr gut mischen (Vortex), 2 min bei 13.500 und 4 °C zentrifugieren; wässrige Phase in ein neues Gefäß überführen

- 200 µl Ammoniumacetat (4 M)
- 1 µl tRNA
- 1.000 µl Ethanol (100 %)
- gut durchmischen und 60 – 120 Minuten bei –20 °C präzipitieren
- 30 min bei 13.500 rpm und 4 °C zentrifugieren; Flüssigkeit vorsichtig abkippen
- Pellet mit 1.000 µl Ethanol (70 %) waschen
- 10 min bei 13.500 rpm und 4 °C zentrifugieren; Überstand verwerfen; Pellet trocknen lassen

5. Entfernen der überhängenden Enden

- Pellet in 38,5 µl H₂O lösen
- 10 µl 5x T4 DNA Polymerasepuffer
- 0,5 µl dNTP
- 1 µl T4 DNA Polymerase (10 U)
- 15 min bei 37 °C inkubieren
- 1 µl Klenow Fragment (1 U)
- 10 min bei Raumtemperatur und 5 min auf Eis inkubieren
- 2,5 µl EDTA (0,25 mM)

Die T4 DNA Polymerase füllt mit den dNTP den 3' Überhang des cDNA Stranges mit DNA. Die noch verbleibenden Überhänge werden vom Klenow Fragment entfernt. Ziel ist es, ds cDNA Stränge mit glatten Enden zu erhalten. Das EDTA stoppt alle enzymatischen Reaktionen.

Es folgte eine erneute Phenol/Chloroform Extraktion und eine anschließende alkoholische Fällung wie bereits im Punkt 4 beschrieben. Das getrocknete Pellet wird dann in 30 µl H₂O aufgenommen.

6. Ligation

Die ds cDNA wurde nun in einen linearisierten und dephosphorylierten Vektor ligiert.

- 1 µl Plasmid (pUC19)
- 7,5 µl ds cDNA
- 1 µl 10x T4-Ligationspuffer
- 0,5 µl T4 Ligase
- bei 15 °C über Nacht inkubieren lassen

Am darauffolgenden Tag wurden 2,5 µl des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli* Zellen (DH5α) transformiert. Die positiv erscheinenden Kolonien wurden von der Platte gepickt und das Plasmid mittels alkalischer Lyse isoliert und mit jeweils 2 U *EcoR* I und *Hind* III verdaut. Die positiven Klone mit möglichst langem Insert wurden sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden verglichen und mittels BLAST Search im Internet wurde ihre ungefähre Position auf der viralen RNA bestimmt. Anhand der gewonnenen Daten wurden neue Primer für die Herstellung der ds cDNA erstellt und der Versuch wurde mit den neuen Primern so lange wiederholt, bis man die virale RNA annähernd komplett sequenziert hatte.

2.3.9 Amplifikation der viralen 5' Enden

Mit der Methode zur Herstellung der ds cDNA konnte man nicht sicher sein, ob die ersten Basen des 5' Endes der viralen RNA amplifiziert wurden. Um diese zu amplifizieren, wurde ein sogenannter 5' RACE durchgeführt.

Die Durchführung des 5' RACE erfolgte mit einem Kit der Firma Invitrogen. Hierbei wurde sich genau an die mitgelieferte Anleitung gehalten.

2.3.10 Sequenzierung

Ausgewählte Plasmide, Klone und PCR – Produkte wurden sequenziert:

- etwa 300 ng – 700 ng DNA (photometrische Konzentrationsbestimmung oder Abschätzung mittels Agarosegel), bei PCR Produkten mit geringerer Größe (bis 500 bp) können 100-500 ng eingesetzt werden
- 1 µl Primer (10 pmol/µl)
- 4 µl Big Dye Terminatoren (fertiger Big Dye Mix der Firma GENterprise)
- mit H₂O auf ein Endvolumen von 20 µl auffüllen

Es folgte eine PCR:

1. 96 °C 15 sec
2. 55 °C 4 min
3. die Schritte 1 und 2 wurden insgesamt 30 mal wiederholt

Die Sequenzierreaktion wurde bei 4 °C gelagert.

Es folgte eine alkoholische Fällung der Sequenzierreaktion:

- Sequenzieransatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- 2 µl NaAc (3 M, pH 5,2) hinzufügen
- 50 µl Ethanol (100 %) hinzufügen
- mischen und 10 min auf Eis fällen
- 30 min bei Raumtemperatur und 13.500 rpm zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abheben, verwerfen
- Pellet mit 200 µl Ethanol 70 % waschen
- 10 min bei Raumtemperatur und 13.500 rpm zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abheben und das Pellet trocknen

Die Auswertung der Sequenzierreaktion erfolgte durch GENTERprise Sequenzierservice (Bacherweg 32, 55128 Mainz).

2.3.11 RT-PCR

Um ein Fragment direkt aus der viralen RNA zu amplifizieren, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurde zunächst mit einer Reversen Transkriptase (RT) an einem Teil der RNA ein cDNA Strang synthetisiert. In einem darauf folgenden PCR – Schritt wurde mit der cDNA als Template ein PCR-Produkt amplifiziert. Zu dieser RT-PCR wurde ein fertiges RT/*Taq* – Gemisch der Firma Invitrogen verwendet.

- x µl RNA (abhängig von der Qualität der RNA Isolierung)
- 12,5 µl 2x RT/*Taq* Puffer
- 1 µl sense – Primer (10 µM)
- 1 µl antisense – Primer (10 µM)
- 0,3 µl RT/*Taq* – Mix
- mit H₂O (DEPC) auf ein Endvolumen von 25 µl auffüllen

Der RT/*Taq* – Mix wurde als letztes gekühlt hinzugegeben.

Es folgte eine Amplifikation im Thermocycler:

Reverse Transkription	42 °C	30 min
Denaturierung der Proben	94 °C	2 min

Es folgten 30 Amplifikationszyklen:

Denaturierung	94 °C	30 sec
Primeranealing	x °C	30 sec
Elongation	72 °C	60 sec für 1 kb
Es folgte noch ein verlängerter Elongationsschritt und eine anschließende Lagerung der Probe		
Elongationsverlängerung	72 °C	2 min
Lagern der Probe	4 °C	

Die Anealingtemperatur war immer 3 – 5 °C niedriger als die Schmelztemperatur des jeweiligen Primers

2 µl des RT-PCR – Produktes wurden gelelektrophoretisch analysiert.

2.3.12 Aufreinigung von PCR – Produkten und Isolierung von DNA – Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von PCR – Produkten und Isolierung von DNA – Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „DNA – Purifikation Kit“ der Firma QIAGEN verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Originalanleitung.

2.3.13 Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte in horizontalen Gelelektrophoresekammern (Midi-S Harnischmacher, Arnsberg) in 1 – 1,5 %igen Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele und als Laufpuffer wurden TAE (Tris-Acetat-EDTA) für Fragmente > 600 bp oder TBE (Tris-Borat-EDTA) für Fragmente < 600 bp verwendet. Die Puffer wurden nach Sambrock *et al.* (1989) angesetzt. Zur Herstellung der Gelmasse wurde die erforderliche Menge Agarose in 40 ml Puffer gegeben und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nachdem das gelöste Gel auf etwa 60 °C abgekühlt war, wurde 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg EtBr/ml Sigma) hinzugegeben und das Gel wurde in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Als Standard wurde ein 1 kb DNA-Ladder bzw. 0,24-9,5 kb RNA Ladder (beide Invitrogen) aufgetragen. Die Proben wurden bei 5 – 8 Volt/cm aufgetrennt und im UV-Licht ausgewertet.

2.4 Gewebekulturtechnik

2.4.1 Transformation von *Nicotiana benthamiana* mittels *Agrobakterien*

Zur Transformation wurden *N. benthamiana* Pflanzen der Sorte „Evergrow“ verwendet. Die Transformation erfolgte in Anlehnung an Horsch *et al.* (1985) und Lavazza *et al.* (1990).

Anzucht des Pflanzenmaterials:

Als Pflanzenmaterial für die Cokultivierung mit *A. tumefaciens* wurden ca. 0,5 – 1 cm² große Blattscheiben von *in vitro* kultivierten *N. benthamiana* verwendet. Die Pflanzen waren auf MS-Medium (20 g/l Saccharose, 8 g/l Agar) ohne Phytohormone angezogen worden.

Anzucht der *Agrobakterien*:

- Transformierte *Agrobakterien* in 8 ml LB-Medium (+ Rifampicin (15 mg/l), + Streptomycin (300 mg/l), + Spectinomycin (300 mg/l)) aufnehmen
- bei 27 °C und 250 rpm für 16 Stunden inkubieren und anschließend
- bei 2.500 rpm und RT für 10 min zentrifugieren; Überstand verwerfen
- Pellet in 10 ml flüssigem MS-Medium (+100 mg/l Acetosyringon; + 1 mg/l BAP; + 0,1 mg/l NAA) (Murashige and Skoog, 1962) aufnehmen

Transformation:

Möglichst junge Blätter wurden der *in vitro* Kultur entnommen und ohne Blattstiele längs zur Mittelrippe in 2 – 3 Streifen geschnitten. Bei Bedarf wurden diese nochmals entlang ihrer Mittelrippe halbiert. Die Blattscheiben wurden in eine Petrischale gegeben und 5 ml Bakteriensuspension wurden hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken der Petrischale. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Blattscheiben aus der Bakteriensuspension herausgenommen, vorsichtig auf sterilem Filterpapier abgestreift und auf Co-Kulturmedium (MS-Medium + 8 g/l Agar, 30 g/l Glucose, 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA) gelegt. Hierbei wurden die Blattscheiben leicht angedrückt, um einen Kontakt der Wundflächen mit dem Medium zu gewährleisten. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 42 °C in Dunkelheit.

Selektion und Regeneration:

Nach der Infektionszeit wurden die Blattscheiben aus der Co-Kultur genommen und 3 – 4 mal in MS-Medium + 500 mg/l Carbenicillin gewaschen. Anschließend wurden sie auf sterilem Filterpapier abgetrocknet. Zur Selektion und Regeneration wurden die Blattscheiben auf Selektionsmedium (MS + Vitamine, 8 g/l Agar, 20 g/l Saccharose, 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA, 500 mg/l Carbenicillin und 100 mg/l Kanamycin bzw. 50 mg/l PPT) gelegt. Die Inkubation erfolgte in einer Klimakammer bei 24 °C und einem Licht/Dunkel Wechsel von 16/8 Stunden.

Der Transfer der Explantate auf frisches Medium erfolgte in 4-wöchigem Abstand. Regenerierende Sprosse wurden abgenommen und auf frisches Medium (MS mit Vitaminen, 8 g/l Agar, 20 g/l Saccharose, 500 mg/l Carbenicillin, 50 mg/l PPT bzw. 100 mg/l Kanamycin) zur weiteren Entwicklung und Bewurzelung überführt. Nur Pflanzen, die unter Selektionsbedingungen Wurzeln bildeten und *in vitro* eine normale Wuchsform zeigten, wurden ins Gewächshaus ausgepflanzt.

Zusammensetzung des MS-Mediums:

NH ₄ NO ₃	1.650,00 mg/l
KNO ₃	1.900,00 mg/l
KH ₂ PO ₄	170,00 mg/l
MgSO ₄	180,54 mg/l
CaCl ₂	332,02 mg/l
myo-Inositol	100,00 mg/l
Fe-Na-EDTA	36,70 mg/l
MnSO ₄ x H ₂ O	16,90 mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,60 mg/l
H ₃ BO ₃	6,20 mg/l
Glycin	2,00 mg/l
KJ	0,83 mg/l
Nicotinsäure	0,50 mg/l
Pyridoxin-HCl	0,50 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25 mg/l
Thiamin-HCl	0,10 mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025 mg/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025 mg/l

2.4.2 Transfer von *in vitro* Pflanzen ins Gewächshaus

Zur Überführung der *in vitro* Pflanzen ins Gewächshaus wurden die steril gehaltenen bewurzelten Sprosse aus der Petrischale herausgenommen. Das Medium wurde vorsichtig mit lauwarmem Wasser abgespült, die Wurzeln wurden auf eine Länge von etwa 3 cm zurückgeschnitten. Anschließend wurden die Pflanzen in eine gut angefeuchtete Mischung aus Pflanzenerde (Floraton 1, Floraton Oldenburg) und Perlit (Mischverhältnis 1:1) gesetzt. Die Pflanzen wurden unter einer Haube, die eine hohe Luftfeuchtigkeit gewährleisten soll, ins Gewächshaus (14 h Tageslänge, 24 °C) überführt. Um eine Infektion mit pilzlichen Pathogenen (z. B. Botrytis) zu vermeiden, wurden die transgenen Pflanzen 14 Stunden nach dem Auspflanzen mit einer 0,5%igen Rovral-Lösung (BASF, Ludwigshafen) besprüht.

Nach einer Woche wurde begonnen, die Haube schrittweise zu öffnen, um die Luftfeuchtigkeit langsam zu reduzieren und eine Adaptation der Pflanzen an die normalen Gewächshausbedingungen zu erreichen. Sobald die ersten Blüten gebildet waren, wurden diese mit Papiertüten eingetütet, um somit eine Selbstbefruchtung sicherzustellen. Nachdem die Pflanzen abgeblüht waren, wurden die Samen geerntet. Hierbei stellte jede einzelne Pflanze eine eigene Linie dar.

2.5 Analyse der transgenen Pflanzen

2.5.1 Extraktion pflanzlicher Gesamt-DNA

Extraktion nach Edwards *et al.* (1991):

Die Extraktionsmethode von Edwards *et al.* (1991) eignet sich besonders gut zur schnellen Extraktion von Gesamt-DNA und ermöglicht gleichzeitig eine Bearbeitung von vielen Proben.

- tiefgefrorenes Blattmaterial (ca. 1 - 2 cm²) mit einem Mikropistill fein zerreiben
- 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 2 % (w/v) SDS) hinzugeben und gut homogenisieren
- 30 min bei 65 °C (Wasserbad) inkubieren
- auf Eis kurz abkühlen lassen
- 400 µl Chloroform hinzugeben und gut mischen

- 2 min bei 13.500 rpm zentrifugieren
- 300 µl des Überstands vorsichtig in ein neues Gefäß überführen
- 300 µl eiskaltes (-20 °C) Isopropanol hinzugeben und dreimal invertieren
- 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 5 min bei 13.500 rpm zentrifugieren
- Überstand abkippen
- Pellet mit 1000 µl Ethanol (70 %) waschen und 5 min bei 13.500 rpm zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abkippen und Pellet trocknen lassen
- Pellet in 100 µl TE – Puffer (10 mM Tris – HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) resuspendieren
- 60 min bei 65 °C inkubieren

Nach der Extraktion wurden die Proben kurz zentrifugiert. 5 µl des Überstands wurden auf ein 1 %iges Agarosegel zur quantitativen und qualitativen Kontrolle aufgetragen. Für den PCR-Nachweis wurden 1 µl der Extraktion in einer Verdünnung von 1:10 verwendet.

Extraktion nach Rogers and Reizer (1988):

Die Methode der DNA Extraktion nach Rogers and Reizer (1988) ermöglicht die Gewinnung hoher Mengen an genomischer DNA mit einem wesentlich höheren Reinheitsgrad als bei der Methode nach Edwards *et al.* (1991). Allerdings ist die Extraktion auch zeitaufwendiger.

- 5 – 10 g tiefgefrorenes Blattmaterial zu Pulver zermahlen
- in 10 ml 65 °C 2x Cetyltrimethylammonium-bromid (CTAB)-Puffer aufnehmen
- Proteinase K bis auf eine Endkonzentration von 100 µg/l und RNaseA auf eine Endkonzentration von 10 µg/ml zugeben
- bei 65 °C unter gelegentlichem Schütteln für 30 min inkubieren
- ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugeben und gut mischen
- 10 min bei 4 °C und 12.000 rpm zentrifugieren, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführen
- 1/10 Volumen 65 °C warme 10%ige CTAB - Lösung und eine Volumeneinheit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugeben und gut mischen
- 10 min bei 4 °C und 12.000 rpm zentrifugieren, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführen
- ein Volumen CTAB-Präzipitationspuffer (65 °C) hinzugeben und den gebildeten CTAB-DNA-Komplex bei 20 °C für 10 min bei 12.000 rpm präzipitieren
- Pellet in 1,5 ml „High Salt“-TE-Puffer aufnehmen und bei 65 °C ca. 1 h lösen (wenn man DNA aus 2,5 – 3 g Blattmaterial extrahiert, wird die Probe nach der Inkubation auf drei Reaktionsgefäße verteilt)
- 2 Volumen kaltes Ethanol (96 %) hinzugeben und über Nacht bei –20 °C fällen

- 15 min bei 4 °C und 12.000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit kaltem Ethanol (70 %) waschen und erneut 15 min bei 4 °C und 12.000 rpm zentrifugieren
- DNA-Pellet trocknen und in 1 ml TE-Puffer aufnehmen

Zur Abschätzung der DNA-Ausbeute wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Verwendete Puffer:

2x CTAB-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 8,0
	20 mM EDTA
	1,4 M NaCl
	1 % PVP 40.000
	2 % CTAB

10 % CTAB-Lösung:	10 % CTAB
	0,7 M NaCl

CTAB-Präzipitationspuffer:	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM EDTA
	1 % CTAB

„High Salt“-TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA
	1 M NaCl

1x TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA

2.5.2 PCR – Nachweis des RpRSV – Konstrukts

Der Nachweis des RpRSV inverted repeat Konstrukts erfolgte durch PCR. Der Nachweis erfolgte ausschließlich in der T0 Generation.

Reaktionsansatz:

1 µl pflanzliche DNA – Extraktion
2,5 µl 10x PCR-Puffer mit 15 mM Mg²⁺
0,5 µl dNTP (10 mM)
0,5 µl Primer 1
0,5 µl Primer 2
0,3 µl *Taq* DNA Polymerase (5 U/µl)
19,7 µl H₂O

Amplifikation:

Denaturierung der Proben	94 °C	2 min
--------------------------	-------	-------

Es folgten 30 Amplifikationszyklen:

Denaturierung	94 °C	20 sec
Primeranealing	55 °C	20 sec
Elongation	72 °C	35 sec

Es folgte noch ein verlängerter Elongationsschritt und eine anschließende Lagerung der Probe

Elongationsverlängerung	72 °C	2 min
Lagern der Probe	4 °C	

5 µl des PCR – Produkts wurden auf einem 1 %igen TAE – Gel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

2.5.3 Nachweis des Transgens mittels Southern HybridisierungRestriktion der genomischen Gesamt-DNA:

DNA	15 µg	20 µg
Restriktionsenzym	75 U	100 U
10x Restriktionspuffer	40 µl	40 µl

mit Wasser auf ein Endvolumen von 400 µl auffüllen

Die Restriktion verlief über Nacht bei den für das verwendete Enzym optimalen Temperaturen. Die Überprüfung der Restriktion erfolgte elektrophoretisch (2 µl DNA; 1 % TAE-Agarose). Gegebenenfalls wurden nochmals 20 U des Restriktionsenzym hinzugegeben und

weitere drei bis vier Stunden inkubiert. Nach Abschluss der Restriktion wurde die DNA gefällt.

- ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) hinzugeben und gut mischen (nicht auf dem Vortex)
- 5 min bei 13.500 rpm und 4 °C zentrifugieren
- wässrige Phase vorsichtig abnehmen und mit $\frac{1}{10}$ Volumen NaAc (3 M, pH 5,2) sowie 2,7 Volumen Ethanol (100 %) versetzen
- bei -20 °C für 60 min inkubieren
- 30 min bei 13.500 rpm und 4 °C zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abschütten und Pellet mit 1 ml Ethanol (70 %) waschen
- 10 min bei 13.500 rpm und 4 °C zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abschütten und Pellet trocknen lassen
- Pellet in 60 – 80 µl TE – Puffer aufnehmen

Gelelektrophoretische Trennung der verdauten DNA Fragmente:

Die gelösten DNA Fragmente wurde mit 0,16 Volumen Ladepuffer versetzt. Die DNA Proben wurden bei geöffnetem Deckel für 10 min bei 70 °C inkubiert. Dies diente dazu, dass mögliche Ethanolreste verdampfen. Außerdem erfolgte eine Basentrennung der cohäsiven Enden der DNA-Fragmente. Anschließend wurden die Proben auf das Gel geladen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte über Nacht bei einer angelegten Spannung von 25 Volt (ca. 1 V/cm).

Kapillartransfer:

Nach der Gelelektrophorese wurden zunächst alle nicht benötigten Gelbereiche entfernt. Anschließend wurde das Gel zur Depurinisierung in Depurinisierungslösung (0,25 M HCl) gelegt. Hierbei erfolgte ein Farbumschlag des Laufpuffers von blau nach gelb. Nach diesem Farbumschlag ließ man das Gel noch 10 min in der Lösung. Die Depurinisierung ist notwendig, wenn Fragmente, die grösser als 5 kb sind, geblottet werden sollen. Das Gel wurde nun kurz in Wasser gewaschen. Anschließend wurde es zur Denaturierung der DNA zweimal 20 min in Denaturierungslösung inkubiert. Das Gel wurde erneut kurz in Wasser gewaschen und anschließend einmal 15 min und dann nochmals 20 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Das NaOH diente zur Denaturierung der DNA. Zwischenzeitlich wurde Whatman-Filterpapier 3MM und die Nylonmembran (Appligene® oncor®, Positive Membrane 0,45 µm) zurechtgeschnitten. Filterpapier 3MM und Membran wurden in einer 0,4 M NaOH / 1 M NaCl eingeweicht. Die

DNA wurde über Nacht mit einer 0,4 M NaOH / 1 M NaCl – Lösung auf die Nylonmembran transferiert. Bei diesem Kapillartransfer wird die DNA an die Membran gebunden.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran in Neutralisationspuffer (1 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7,2) gewaschen. Der Waschschrift diente der Neutralisation der Membran sowie dem Entfernen von Agaroseresten. Es folgte die Beschriftung und Trocknen der Membran. Die Membran wurde zwischen Filterpapier in Alufolie bis zur Hybridisierung bei 4 °C aufbewahrt.

Herstellung der DIG markierten Sonde mittels Polymerase Kettenreaktion:

Mittels PCR wurde eine DIG markierte DNA – Sonde zum Nachweis des Transgens mittels Southern Hybridisierung hergestellt. Die Herstellung der DIG markierten Sonde erfolgte nach Originalanleitung mit dem „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Roche). Die Lagerung der Sonde erfolgte bei – 20 °C.

Hybridisierung und Detektion:

Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit dem „Dig-Easy-Hyb-Kit“ der Firma Roche. Die Durchführung erfolgte nach Originalanleitung mit folgender Modifikation: die Inkubationszeit der Membran in „Dig-Easy-Hyb“-Lösung wurde auf 60 min verlängert.

Die Detektion wurde mit dem „DIG Luminescent Detection Kit“ (Roche) nach Originalanleitung durchgeführt. Lediglich die Waschschriffe mit dem Waschpuffer wurden verdoppelt. Weiterhin wurde die Membran nach Zugabe des Substrats 60 min anstatt 10 min bei 37 °C inkubiert.

2.5.4 Isolierung pflanzlicher RNA

Blattscheiben wurden mit einem sterilen Korkbohrer geerntet und sofort nach der Probenahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert. Bis direkt vor der Aufarbeitung mussten die Blattscheiben gefroren bleiben. Diese durchgehende Kühlkette war wichtig, um die Gefahr eines Abbaus der RNA durch RNasen möglichst gering zu halten.

- Blattscheibe (Durchmesser etwa 0,5 cm) im gekühlten Zustand mit einem gekühlten Mörser zerstoßen
- 500 µl EB – Puffer hinzugeben und gut homogenisieren
- 500 µl Phenol hinzugeben und die Proben gut durchmischen (Vortex)
- 2 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugieren
- Überstand abziehen und mit 500 µl Phenol/Chloroform versetzen (Vortex)
- 2 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugieren
- Überstand erneut abziehen und mit 500 µl Chloroform versetzen (Vortex)
- 1 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugieren
- Überstand (400 µl) mit 1.000 µl Ethanol (100 %) versetzen
- RNA bei –20 °C für mindestens 30 min fällen
- 15 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 600 µl Ethanol (70 %) waschen
- 2 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugieren
- Pellet trocknen lassen und in 40 µl H₂O (DEPC) aufnehmen

Die RNA-Isolierung wurde elektrophoretisch analysiert. Hierzu wurden 3 µl RNA-Isolierung mit 3 µl FDE Loading Dye versetzt und 5 min bei 75 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und auf einem 1 %igen TAE-Gel elektrophoretisch getrennt.

Verwendete Puffer:

EB – Puffer (Extraction Buffer)

Zunächst wird eine 10 fach Stammlösung des Puffers angesetzt:

- 7,7 g Glycin
- 5,8 g NaCl
- 20 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0)
- mit sterilem Wasser auf 100 ml auffüllen und steril filtrieren

Der Puffer kann bei 4 °C in einer dunklen Flasche aufbewahrt werden.

Kurz vor Gebrauch wird der 1 x EB – Puffer angesetzt:

- 10 ml 10x EB
- 2 g SDS
- 1 g Lauroyl – Sarcosin
- mit sterilem Wasser auf 100 ml auffüllen

Dieser Puffer sollte gekühlt sofort verwendet werden und kann nicht gelagert werden.

FDE Loading Dye:

- 900 µl Formamid
- 20 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0)
- 80 µl H₂O
- einige mg Bromphenolblau

2.5.5 Northern Hybridisierung

Elektrophoretische Trennung der RNA:

Gelkammer, Gelträger und Kamm mussten vor der Elektrophorese mindestens 14 Stunden mit einer 3 % H₂O₂ Lösung behandelt werden.

Für die Herstellung des Agarosegels wurden 3 g Agarose mit 230 ml Wasser und 28 ml 10x Mops – Puffer versetzt und gekocht. Nachdem die Agarose auf 60 °C abgekühlt war, wurde noch zusätzlich 21 ml Formaldehyd hinzugegeben. Das Gel wurde anschließend in einen vorbereiteten Gelträger gegossen.

6,3 µl RNA wurden mit 12,6 µl RNA – Ladepuffer versetzt und für 10 min. bei 70 °C denaturiert. Anschließend wurde die RNA auf Eis gestellt und auf das Gel geladen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer Spannung von 5 – 8 Volt/cm in 1x Mops – Puffer.

Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (blotting):

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel zweimal zehn Minuten in sterilem Wasser gewaschen und zehn Minuten in 10 x SSC äquilibriert. Zwischenzeitlich wurde Laborpapier, Whatman-Filterpapier 3MM und die Nylonmembran (Appligene® oncor®, Positive Membrane 0,45 µm) auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Whatmanpapier 3MM und Membran wurden anschließend in 10 x SSC eingeweicht. Die RNA wurde über Nacht mit 10 x SSC auf die Nylonmembran transferiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran für 5 Minuten in 1 x SSC inkubiert, zwischen Filterpapier gepackt und angetrocknet. Ein Temperatur-Crosslink (90 – 120 min bei 80 °C) der RNA wurde durchgeführt. Die Membran wurde zwischen Filterpapier in Alufolie bis zur Hybridisierung bei 4 °C aufbewahrt.

Die Herstellung einer DIG markierten DNA – Sonde mittels Polymerase – Kettenreaktion sowie die Hybridisierung und Detektion erfolgte wie in 2.5.3 beschrieben.

verwendete Lösungen:

Mops – Puffer

Vom Mops – Puffer wurde eine 10x Stammlösung hergestellt.

Mops (4-Morpholinpropansulfonsäure) 200 mM

Natriumacetat 50 mM

EDTA 10 mM

pH auf 6,8 einstellen

20x SSC

3,0 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

pH 7,0 mit HCl

(Autoklavieren, RT)

RNA – Ladepuffer

10x Mops 30 µl

Formaldehyd 5 µl

Formamid 10 µl

Blue Juice 1,6 µl

Steriles Wasser 0,4 µl

Blue Juice

Steriles Wasser 10 ml

Bromphenolblau 15 mg

Ficoll 1,5 g

EDTA 0,5 M pH 8,0 0,4 ml

3. Ergebnisse

3.1 Vermehrung von RpRSV auf *Chenopodium quinoa*

Zur Erhaltung und Vermehrung des Virusmaterials für weitere Versuche, wurde RpRSV (beide Stämme) auf *C. quinoa* vermehrt. Die beiden Stämme von RpRSV zeigten einen unterschiedlichen Verlauf der Infektion und auch unterschiedliche Symptome.

Die mit RpRSV-ch inokulierten Blätter zeigten schon vier Tage nach der Inokulation erste lokale Chlorosen (Abb. 6). Die Chlorosen gingen dann innerhalb weniger Tage in Nekrosen über. Etwa 10 Tage nach der Inokulation waren die infizierten Blätter abgestorben. Auf den systemischen Blättern zeigten sich etwa nach einer Woche die ersten Symptome. Auch hier waren dies zunächst Chlorosen, die dann im weiteren Verlauf der Infektion nekrotisch wurden. Etwa drei Wochen nach der Inokulation waren die Pflanzen nahezu abgestorben.



Abb. 6: Symptome von RpRSV-ch auf einem infizierten Blatt von *C. quinoa*, 5 Tage nach der Inokulation

Die mit RpRSV-g inokulierten Blätter zeigten erst nach etwa sieben Tagen die ersten Virus-symptome. Es handelte sich hierbei um leichte chlorotische Aufhellungen, die dann nach weiteren zwei Tagen in deutlich sichtbare chlorotische Läsionen und schließlich Nekrosen übergingen. Die systemischen Blätter zeigten mit einer Verzögerung von etwa zwei Tagen die gleichen Symptome wie die inokulierten Blätter. Zusätzlich traten noch einzelne chlorotische Ringflecken auf (Abb. 7). Diese Ringflecken waren nicht auf RpRSV-ch infizierten Pflanzen zu erkennen. Die Blätter der RpRSV-g infizierten Pflanzen starben nicht oder nur sehr langsam ab. Die infizierten Pflanzen waren jedoch in ihrem Wachstum gestört. Junge nachwach-

sende Blätter infizierter Pflanzen hatten oft eine länglichere Form als die entsprechenden Blätter gesunder Pflanzen. Oftmals waren die nachwachsenden Blätter auch leicht deformiert. Im Gegensatz zu RpRSV-ch infizierten Pflanzen starben die RpRSV-g infizierten jedoch nicht ab.



Abb. 7: Symptome von RpRSV-g auf einem systemischen Blatt von *C. quinoa* 12 Tage nach der Inokulation

In einem Infektionsexperiment mit RpRSV-g wurden nach fünf, sieben und 12 Tagen Proben von inokulierten und systemischen Blättern genommen und mittels ELISA auf eine RpRSV-g Infektion untersucht. Es zeigt sich, dass bereits fünf Tage nach der Inokulation die lokalen Blätter stark und die systemischen Blätter leicht infiziert waren, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch keine Symptome sichtbar waren. Nach sieben Tagen, mit dem ersten Auftreten der Symptome auf den lokalen Blättern, waren die lokalen und systemischen Blätter bereits gleich stark infiziert.

Beide Stämme infizierten immer 100 % der inokulierten Pflanzen. Die mit RpRSV-ch infizierten Blätter wurden etwa eine Woche und die mit RpRSV-g infizierten Blätter etwa zwei Wochen nach der Inokulation geerntet. Die Blätter wurden bei -80°C eingefroren.

3.2 Isolierung der viralen RNA

Die in 2.3.7 beschriebenen Methoden zur Extraktion der viralen RNA aus infiziertem Blattmaterial lieferten bezüglich der Ausbeute gleich gute Ergebnisse.

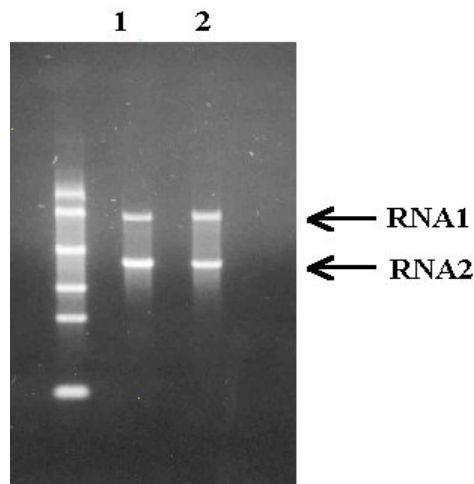


Abb. 8: Elektrophoretische Auftrennung (1 % TAE) der viralen RNA von RpRSV-g. 1 = Isolierung nur mit Phenol/Chloroform Extraktion; 2 = Isolierung mit einem Verdau des Hüllproteins und anschließender Phenol/Chloroform Extraktion. Als Standard diente ein 0,24-9,5 kb RNA Ladder (Invitrogen).

In Abb. 8 sind die RNA1 mit einer Größe von etwa 8.000 nt und die RNA2 mit einer Größe von etwa 4.000 nt dargestellt. In den Versuchen zeigte sich jedoch, dass bei der Methode 2 die virale RNA häufig mit SDS verunreinigt war. Da SDS Proteine denaturieren kann, waren diese Proben nur bedingt für die weiteren Versuche geeignet. Aus diesem Grund wurde in späteren Isolierungen nur noch die Phenol/Chloroform Extraktion angewendet.

3.3 Herstellung der doppelsträngigen cDNA

Bei der Herstellung der ds cDNA konnten Fragmentlängen bis zu 2.800 bp synthetisiert werden. Produkte, die mit dem „Oligo dT“ – Primer synthetisiert worden sind, waren maximal 1.000 bp lang. Immer die längsten Fragmente einer ds cDNA Synthese wurden sequenziert. Etwa 90 % der ds cDNA, die mit dem „Oligo dT“ – Primer synthetisiert wurden, waren RNA2 Fragmente. Für die RNA2 von RpRSV-g und RpRSV-ch musste zweimal ds cDNA und für die RNA1 von RpRSV-g musste dreimal ds cDNA hergestellt werden. Die noch fehlenden 5' Enden wurden anschließend mit einem 5' Race – Kit amplifiziert. Für die Sequenzierung der RNA1 von RpRSV-ch wurde keine ds cDNA synthetisiert. Hierfür wurden RT – PCR's zuerst mit Primer der RNA1 von RpRSV-g und anschließend mit spezifischen Primern durchgeführt.

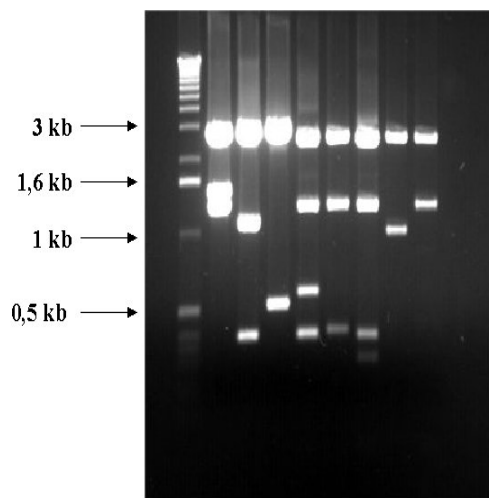


Abb. 9: Elektrophoretische Trennung (1 % TAE) ausgewählter ds cDNA Klone verdaut mit *EcoR* I und *Hind* III. Als Standard diente ein 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)

3.4 Sequenzierung von RpRSV

3.4.1 Die Sequenzen von RpRSV-g und RpRSV-ch

RpRSV-g und RpRSV-ch wurden vollständig sequenziert (Tab. 2). Die Sequenzen der Viren sind im Anhang dargestellt.

Tab. 2: Länge der einzelnen RNA Stränge (Nukleotide (nt)) und Größe der entsprechenden Polyproteine (kDa) von RpRSV-g, RpRSV-ch sowie RpRSV-s (Blok *et al.*, 1992)

	RNA1	RNA2	RNA1 Polyprotein	RNA2 Polyprotein
RpRSV-g	7935 nt	3912 nt	263,0 kDa	123,8 kDa
RpRSV-ch	7935 nt	3915 nt	263,1 kDa	123,7 kDa
RpRSV-s	Nicht sequenziert	3928 nt	Nicht sequenziert	123,5 kDa

Die Länge der RNA1 von RpRSV-g und RpRSV-ch entsprechen sich, ebenso die molaren Größen der RNA1 Polyproteine. Daten der RNA1 von RpRSV-s liegen nicht vor (Blok *et al.*, 1992). Die RNA2 von RpRSV-ch ist 3 nt länger als die RNA2 von RpRSV-g. Das RNA2 Polyprotein von RpRSV-g ist jedoch um 0,1 kDa größer als das Polyprotein der RNA2 von RpRSV-ch. Der RNA2 Strang von RpRSV-s ist um 16 nt bzw. 13 nt länger als der von RpRSV-g und RpRSV-ch.

3.4.2 Sequenzvergleiche zwischen RpRSV-g und RpRSV-ch

RNA1:

Da von der RNA1 noch keine Proteaseschnittstellen bekannt sind, konnten nur die nicht kodierende Regionen, das offene Leseraster sowie das Polyprotein verglichen werden (Abb. 10).

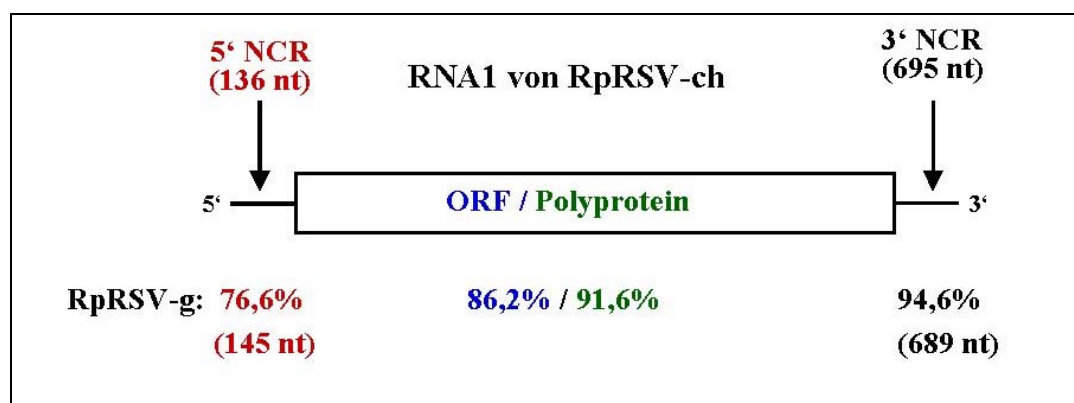


Abb. 10: Sequenzvergleich der RNA1 von RpRSV-ch mit der RNA1 von RpRSV-g

Die 5' NCR von RpRVs-ch ist 136 nt, die von RpRV-g 145 nt lang. Die 5' NCR der beiden Stämme hat eine Identität von 76,6 %. Die Nukleinsäuresequenz des ORF von RpRSV-ch ist 7104 nt (kodieren für 2.367 Aminosäuren) lang, während die Sequenz des ORF von RpRSV-g drei Nukleinsäuren kürzer ist (7.104 nt, kodieren für 2.366 Aminosäuren). Die Homologie des ORFs beträgt 86,7 % und die des Polyproteins 91,6 %. Die 3' NCR hat eine Länge von 695 nt (RpRSV-ch) bzw. 687 nt (RpsRV-g) lang und eine Identität von 94,6 %.

RNA2:

Aus den Untersuchungen von Blok *et al.* (1992) und Scott *et al.* (2000) sind die Proteaseschnittstellen der RNA2 von RpRSV-s bekannt. Durch die Übertragung der Schnittstellen auf die ermittelten Daten der vorliegenden Arbeit war ein Vergleich der funktionellen Proteine und der entsprechenden Sequenzen möglich (Tab. 3).

Tab. 3: Die Länge der Nukleinsäuresequenz und die Größe des Proteins der funktionellen Proteine der RNA2 von RpRSV-g und RpRSV-ch. 2A = 2A Protein, MP = Transportprotein, CP = Hüllprotein

	2A Nukleotide	2° Protein	MP Nukleotide	MP Protein	CP Nukleotide	CP Protein
RpRSV-g	729 nt	27,6 kDa	1050 nt	38,9 kDa	1.542 nt	57,3 kDa
RpRSV-ch	726 nt	27,5 kDa	1050 nt	38,9 kDa	1.542 nt	57,2 kDa

Die Längen der Nukleinsäuresequenzen von Transport- und Hüllprotein sowie die Größen der entsprechenden Proteine sind identisch. Die Nukleinsäuresequenz des 2A-Proteins von RpRSV-g ist um drei Nukleinsäuren länger (Tab. 3).

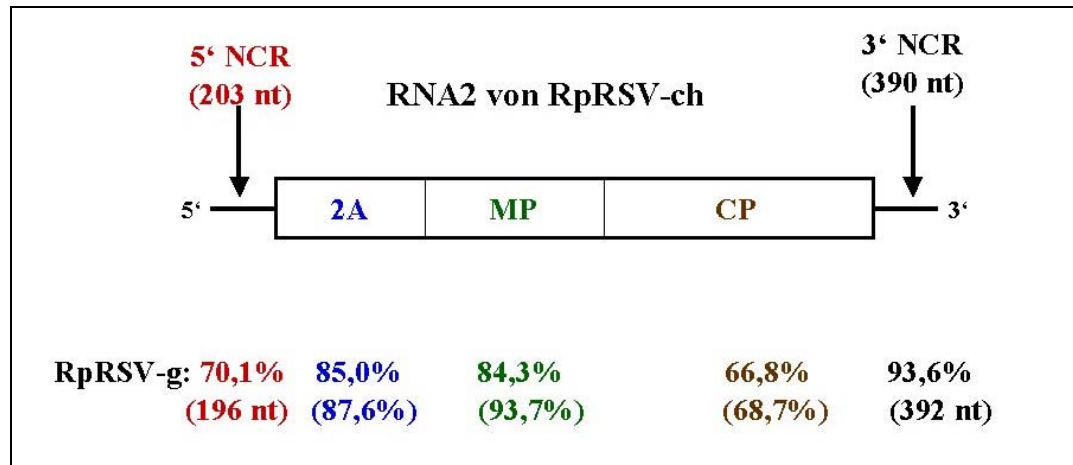


Abb. 11: Sequenzvergleich der RNA2 von RpRSV-ch mit der RNA1 von RpRSV-g (Prozentzahlen in Klammern geben die Identität auf Proteinebene an, die Prozentzahlen ohne Klammer die Identität auf Nukleinsäureebene).

Wie bei der RNA1 weisen auch bei der RNA2 die nicht kodierenden Regionen (NCR) unterschiedliche Längen auf. Die Identität in der 5' NCR liegt bei 70,1 %. Die Homologie in der 3' NCR beträgt 93,6 %. Die Identitäten des 2A Proteins betragen 85,0 % (Nukleinsäuresequenz) bzw. 87,6 % (Protein). Die Homologien der Transportproteine betragen 84,3 % (Nukleinsäureebenen) bzw. 93,7 % (Proteinebene), die des Hüllproteins 66,8 % auf Nukleinsäureebene und 68,7 % Proteinebene (Abb. 11).

3.4.3 Sequenzvergleich von RpRSV-g und RpRSV-ch mit anderen Nepoviren

RNA1 von RpRSV-g und RpRSV-ch:

Die Sequenzen des RNA1 ORF und Polyproteins von RpRSV-g und RpRSV-ch wurden mit den RNA1 ORF und Polyproteinsequenzen des Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) (Ritzenthaler *et al.*, 1991), des Grapevine Chrome Mosaic Virus (GCMV) (le Gall *et al.*, 1989) und des Tomato Ringspot Virus (TomRV) (Rott *et al.*, 1995) verglichen (Tab. 4).

Tab. 4: Sequenzvergleich des RNA1 ORF und Polyproteins von RpRSV-g und RpRSV-ch mit dem ORF und Polyproteinen von GFLV, GCMV und TomRV.

	GFLV (6.855 nt; 252,9 kDa)	GCMV (6.759 nt; 249,9 kDa)	TomRV (6.594 nt; 244,1 kDa)
RpRSV-g (7.101 nt) Nukleinsäureebene	22,1 %	14,1 %	18,5 %
RpRSV-g (263,0 kDa) Proteinebene	31,2 %	29,1 %	31,4 %
RpRSV-ch (7.104 nt) Nukleinsäureebene	14,9 %	14,9 %	15,2 %
RpRSV-ch (263,1 kDa) Proteinebene	32,1 %	29,1 %	31,4 %

Die Übereinstimmung von RpRSV-g und RpRSV-ch zu den anderen Nepoviren sind sehr gering. So liegen die Übereinstimmungen auf Nukleinsäureebene zwischen 14,1 % und 22,1 %. Die Homologien in den Polyproteinen liegen zwischen 29,1 % und 32,1 % (Tab. 4).

RNA2 von RpRSV-g und RpRSV-ch:

Der Vergleich der RNA2 von RpRSV-g und RpRSV-ch mit der RNA2 Sequenzen von RpRSV-s (Blok *et al.*, 1992) ist Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Sequenzvergleich der nicht kodierenden Regionen und funktionellen Proteine der RNA2 von RpRSV-g und RpRSV-ch mit RpRSV-s (Blok *et al.*, 1992)

	5' NCR	2A	MP	CP	3' NCR
RpRSV-g Nukleinsäureebene	59,4 %	85,6 %	80,7 %	66,1 %	78,8 %
RpRSV-g Proteinebene	Kein Protein	89,3 %	92,0 %	67,7 %	Kein Protein
RpRSV-ch Nukleinsäureebene	64,3 %	80,1 %	83,6 %	82,7 %	78,4 %
RpRSV-ch Proteinebene	Kein Protein	80,2 %	95,7 %	88,5 %	Kein Protein

Bei der 5' NCR liegt die Identität bei 59,4 % (RpRSV-g mit RpRSV-s) bzw. 64,3 % (RpRSV-ch mit RpRSV-s). Vergleicht man hier die Homologie zwischen RpRSV-g und RpRSV-ch, so liegt dort die Identität mit 70 % höher. Bei der 3' NCR liegen die Homologien bei 78 %.

Auch hier sind die Homologien deutlich niedriger als beim Vergleich zwischen RpRSV-g und RpRSV-ch. Dort beträgt die Homologie 93,6 %.

Die Homologien der funktionellen Proteine entsprechen den Werten des Vergleichs der RNA2 RpRSV-g und RpRSV-ch. Die Homologie im Hüllprotein zwischen RpRSV-ch und RpRSV-s mit 82,7 % (Nukleinsäureebene) und 88,5 % (Proteinebene) ist deutlich höher als die Homologie zwischen RpRSV-g und RpRSV-ch (siehe 3.4.2). Von allen funktionellen Proteinen der RNA2 zeigt das Transportprotein die höchste Homologie.

Die RNA2 Sequenzen der ORF von RpRSV-g und RpRSV-ch wurden mit den ORF des GFLV (Wetzel *et al.*, 2001), GCMV (le Gall *et al.*, 1989) und ArMV (Wetzel *et al.*, 2001) verglichen. ArMV und GFLV wurden ausgewählt, da diese wie RpRSV zu dem Komplex der Reisigkrankheit in Deutschland gehören. Außerdem stammen die beiden Sequenzen aus infizierten Reben (Tab. 6).

Tab. 6: Sequenzvergleich des RNA2 ORF und Polyproteins von RpRSV-g und RpRSV-ch mit dem ORF und Polyproteinen von GFLV, GCMV und ArMV

	GFLV (3.330 nt; 122,7 kDa)	GCMV (3.975 nt; 147,8 kDa)	ArMV (3.255 nt; 119,0 kDa)
RpRSV-g (3.324 nt) Nukleinsäureebene	20,3 %	21,5 %	21,9 %
RpRSV-g (123,8 kDa) Polyprotein	13,0 %	13,2 %	13,2 %
RpRSV-ch (3.321 nt) Nukleinsäureebene	21,7 %	22,8 %	20,4 %
RpRSV-ch (123,7 kDa) Polyprotein	13,1 %	14,6 %	13,0 %

Ähnlich wie beim Vergleich der RNA1 mit den anderen Nepoviren sind auch die Homologien der RNA2 relativ gering. Sie liegen zwischen 20,3 % und 22,8 % auf Nukleinsäureebene und zwischen 13,0 % und 14,6 % auf Proteinebene.

3.4.4 Motifs

Motifs sind hoch konservierte Bereiche von Proteinen, die über die Gattungsgrenzen hinaus vorhanden sind. So gibt es Motifs, die bei nahezu allen RNA – Viren vorhanden sind. Auch für Nepoviren sind eine Reihe von Motifs beschrieben (Mayo and Robertson, 1996). Alle dort

beschriebenen Motifs sind auch bei der RNA1 von RpRSV-g bzw. RpRSV-ch zu finden. So befindet sich beispielsweise das GDD Motif der RNA abhängigen RNA-Polymerase auf Position 1.941 – 1.943 (RpRSV-g) bzw. 1.942 – 1.944 (RpRSV-ch).

Auch die bei Mayo und Robertson (1996) beschriebenen konservierten Bereiche bei Nepoviren sind bis auf wenige Ausnahmen alle vorhanden. Anhand dieser konservierten Bereiche konnte ungefähr die Position einiger funktioneller Proteine der RNA1 bestimmt werden.

3.4.5 Schnittstellenanalyse des Polyproteins der RNA1 von RpRSV-g und RpRSV-ch

Da von der RNA1 von RpRSV noch keine Proteaseschnittstellen bekannt sind, wurde eine Schnittstellenanalyse zur Feststellung möglicher Schnittstellen durchgeführt. Zunächst wurde die Aminosäuresequenz der RNA1 Polyproteine mittels „BLAST Search“ im Internet (www.ncbi.nlm.nih.gov) mit bekannten Proteinen verglichen. Hierbei wurden konservierte Regionen festgestellt. Anhand dieser funktionellen Regionen konnten erste Bereiche der funktionellen Proteine festgelegt werden. So ließen sich die ungefähre Lage der RNA abhängigen RNA Polymerase (RNA_dep_RNA_pol) und der Helikase (RNA_helicase) festlegen (Abb. 12). Bei der Helikase handelt es sich um das Nukleotid bindende Protein (NTP).

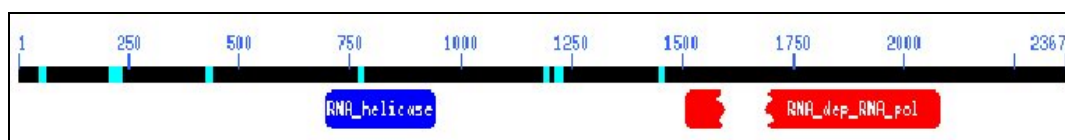


Abb. 12: Darstellung der ersten funktionellen Regionen der RNA1 von RpRSV-g und RpRSV-ch, ermittelt durch einen Internetvergleich mit „BLAST Search“

Zur weiteren Analyse wurde mit Hilfe des Proteanprogramms (DNA-Star) und bekannter Schnittstellensequenzen von Nepoviren (le Gall *et al.*, 1989; Carrier *et al.*, 1999) potentielle Protease-Schnittstellen auf den Polyproteinen der RNA1 von RpRSV-ch und RpRSV-g detektiert (Abb. 13, 14).

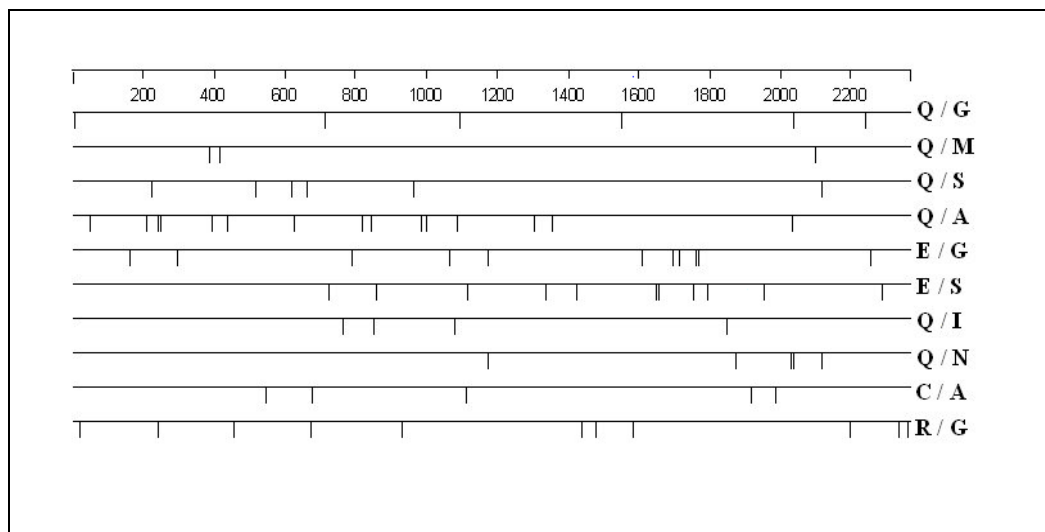


Abb. 13: Schema der potentiellen Proteaseschnittstellen auf dem Polyprotein der RNA1 von RpRSV-ch

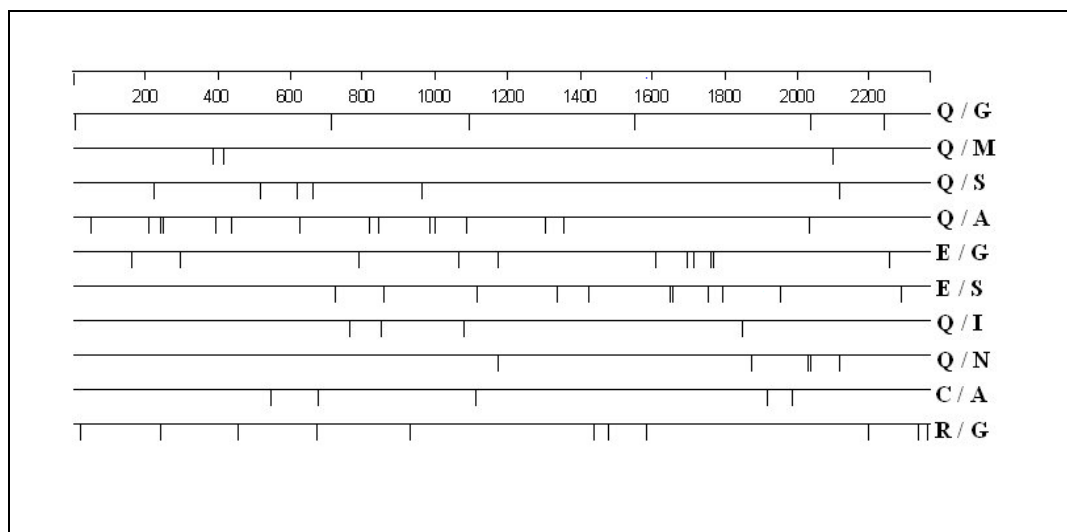


Abb. 14: Schema der potentielle Proteaseschnittstellen auf dem Polyprotein der RNA1 von RpRSV-g

Die Polyproteine der RNA1 von RpRSV-g und RpRSV-ch haben ein nahezu identisches Schnittstellen-Diagramm. Für die Ermittlung der Schnittstellen wurden folgende Annahmen getroffen:

1. Die Proteaseschnittstellen von RpRSV-g und RpRSV-ch sind identisch
2. Die sechs Aminosäuren vor der Schnittstelle sind identisch, da es sich hierbei um die Erkennungsstellen handelt

zwischen den Aminosäuren L-Cystein / L-Alanin. Hieraus ergibt sich die Größe des VPg mit 2,4 kDa (RpRSV-g und RpRSV-ch).

Bei der vierten und damit letzten vermuteten Schnittstelle handelt es sich um die Aminosäuresequenz A C V P D I **R / G**. Die Protease schneidet zwischen den Aminosäuren L-Arginin / Glycin. Die Schnittstelle befindet sich auf der Position 1.478 (RpRSV-g) bzw. 1.479 (RpRSV-ch). Mit dieser Schnittstelle werden die Größen der beiden letzten funktionellen Proteine der RNA1, der Protease und die RNA abhängige RNA Polymerase (RNA dep RNA Polymerase) festgelegt. Die Größe der Protease beträgt 39,9 kDa (RpRSV-g) bzw. 40,3 kDa (RpRSV-ch). Die Größe der Polymerase beträgt 100,5 kDa (RpRSV-g) bzw. 100,1 kDa (RpRSV-ch).

3.5 Aufbau des RpRSV Konstrukts

Das RpRSV-Konstrukt soll ein Silencing der viralen RNA von RpRSV-ch bzw. RpRSV-g induzieren. Hierfür war es notwendig, eine Nukleinsäuresequenz mit einer möglichst hohen Homologie zwischen RpRSV-ch und RpRSV-g für das Konstrukt auszuwählen. Auf der Grundlage des in Abb. 11 dargestellten Vergleiches wurde eine Sequenz aus der 3' NCR der RNA2 von RpRSV-ch für das Konstrukt ausgewählt. Weiteres Kriterium für die Auswahl war die in dem Sequenzbereiches vorliegenden Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Die Sequenz hat eine Länge von 354 nt und eine Homologie von 95 % zu der entsprechenden Sequenz in der 3' NCR von RpRSV-g. Im Folgenden wird der Aufbau des RpRSV-Konstrukts beschrieben:

Amplifikation des Fragments:

Mittels RT-PCR wurde die ausgewählte Sequenz amplifiziert. Folgende Primer wurden hierfür verwendet:

ch-K-Pst1(f): 3' ctg cag GCT TAA GAA CAA AAT AAA AT 5'

ch-K-Pst1(f) ist der antisense Primer für die Amplifikation der Konstruktsequenz. Die Sequenz in Großbuchstaben ist komplementär zu den Nukleotiden 3.870 – 3.889 auf der RNA2 von RpRSV-ch. Die Sequenz in Kleinbuchstaben ist die Sequenz einer *Pst* I Restriktionsschnittstelle.

ch-K-Bgl2(r): 3' aga tet CCC TGT GGC TCC GGG TTA AT 5'

ch-k-Bgl2(r) ist der sense Primer für die Amplifikation der Konstruktssequenz. Die Sequenz in Großbuchstaben entspricht den Nukleotiden 3.535 – 3.554 auf der RNA2 von RpRSV-ch. Die Sequenz in Kleinbuchstaben ist die Sequenz einer *Bgl* II Restriktionsschnittstelle.

Das entstandene RT-PCR-Produkt wurde in einen *Sma* I linearisierten und t-tailed pUC19 Vektor kloniert. Zur Überprüfung der Orientierung erfolgte ein Verdau des Vektors mit *Pst* I. Für die weiteren Klonierungsschritte war es notwendig, dass die RT-PCR-Produkt interne *Bgl* II Schnittstelle auf der selben Seite wie die *Pst* I Schnittstelle des Vektors lag (Abb.16).

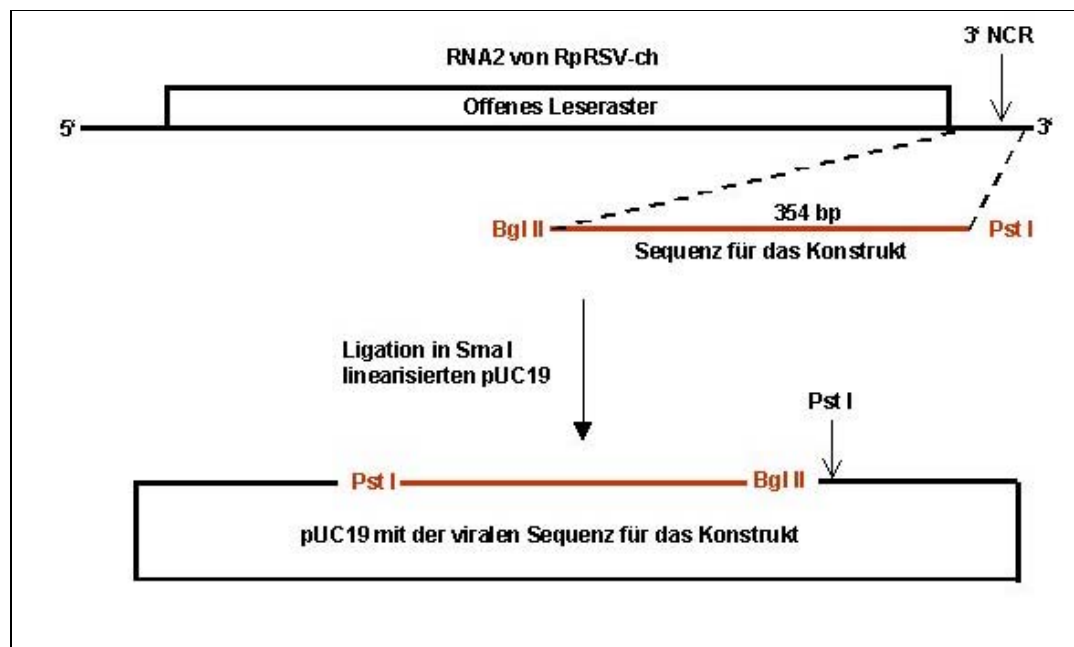


Abb. 16: Amplifikation des RpRSV – Fragments und Ligation in pUC19

Klonierung des Introns:

Die Intron-Sequenz des Nitritreduktase – Gens aus der Buschbohne (*Phaseolus vulgaris*) war bereits von Elisabeth Johansen im Bluescript SK+ Vektor der Firma Stratagen kloniert worden (Johansen, 1996). Das Plasmid wurde von Elisabeth Johansen zur Verfügung gestellt. Der Vektor mit dem Intron wurde mit *Nsi* I linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Die RpRSV Sequenz wurde mit *Pst* I aus dem pUC19 Vektor ausgeschnitten und mit dem Intron-Vektor ligiert. Dies war möglich, da *Nsi* I und *Pst* I kompatible Schnittstellen sind. Durch die Ligation wurden die *Pst* I / *Nsi* I Schnittstellen unbrauchbar. Zur Kontrolle der Orientierung

erfolgte ein Verdau mit *Pst* I und *Bgl* II. Bei richtiger Orientierung (antisense) ergab sich ein Fragment mit etwa 900 bp.

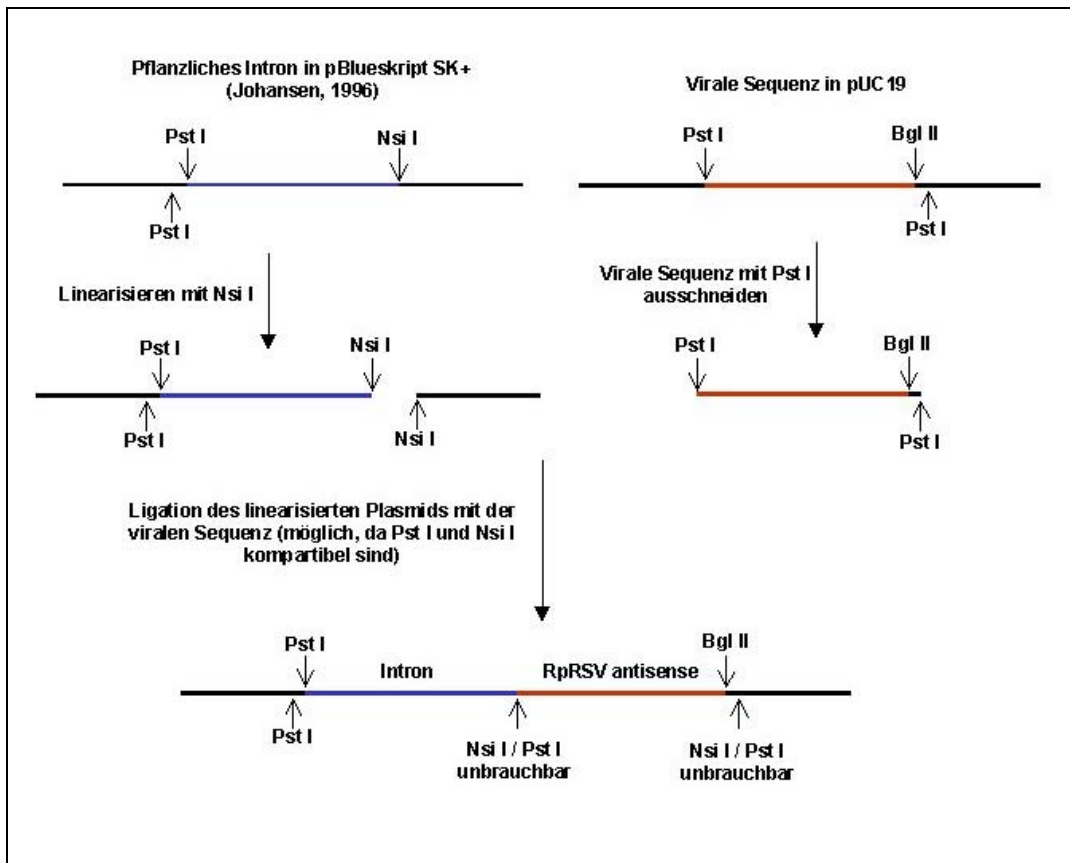


Abb. 17: Klonierung der Intron-Sequenz sowie der RpRSV-Sequenz in antisense

Klonierung der „sense“ Sequenz:

Zur Klonierung der viralen Sequenz in „sense“ in das Konstrukt wurde der Vektor (pBluescript mit Intron und RpRSV Sequenz in antisense) mit *Pst* I linearisiert und dephosphoryliert. Die virale Sequenz wurde mit *Pst* I aus dem Vektor pUC19 mit der viralen Sequenz ausgeschnitten und in den linearisierten Vektor ligiert (Abb. 18). Zur Kontrolle der Orientierung wurde ein Verdau mit *Bgl* II durchgeführt. Ergab dieser Verdau ein Insert mit einer Länge von etwa 1.250 bp war die RpRSV Sequenz in der richtigen Orientierung ligiert.

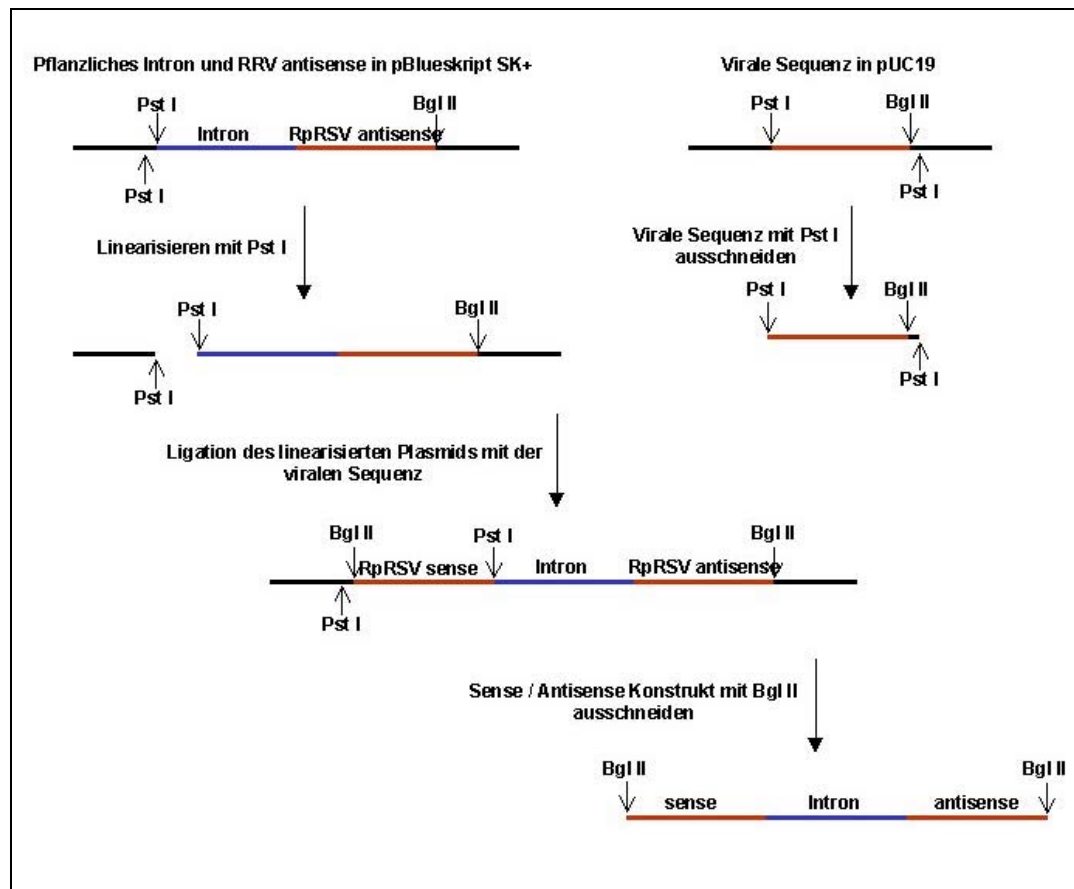


Abb. 18: Klonierung der viralen Sequenz in „sense“

Klonierung des Konstrukts in pRT101:

Das sense/antisense Konstrukt mit dem pflanzlichen Intron wurde in eine Expressionskassette (pRT101, Töpfer *et al.*, 1987) kloniert (Abb. 19). Hierzu wurde das sense/antisense Konstrukt mit *Bgl* II ausgeschnitten und in den mit *Bam*H I linearisierten und dephosphorylierten Vektor pRT101 ligiert. Da die *Bam*H I und die *Bgl* II Schnittstellen kompatibel sind, konnten die beiden Produkte ligiert werden, wobei die *Bam*H I / *Bgl* II Schnittstellen unbrauchbar wurden. Eine Überprüfung der Orientierung war hierbei nicht notwendig. Die Herstellung des inverted repeat Konstrukts war hiermit abgeschlossen.

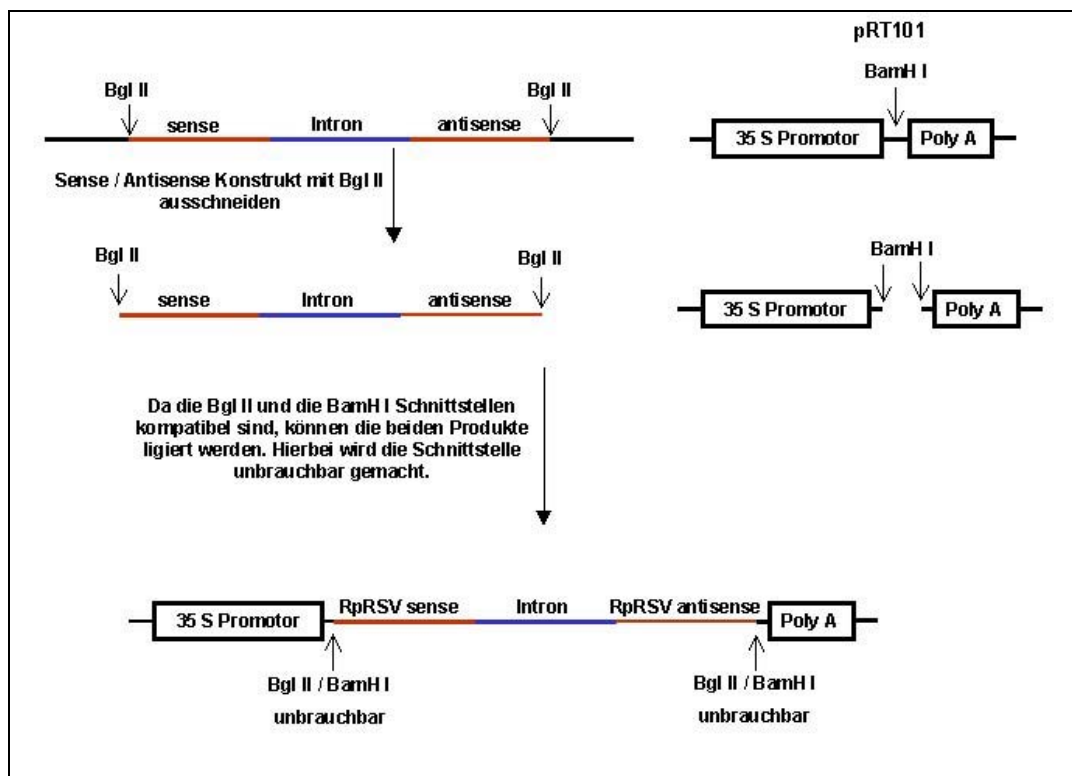


Abb. 19: Klonierung des sense/antisense Konstrukts mit dem pflanzlichen Intron in pRT101

In einem letzten Arbeitsschritt wurde das Konstrukt noch in einen Transformationsvektor eingebaut. Hierfür wurden die binären Vektoren pPZPbar und pPZPnptII verwendet. Das Konstrukt wurde über *Hind* III in die Vektoren kloniert (Abb. 20).

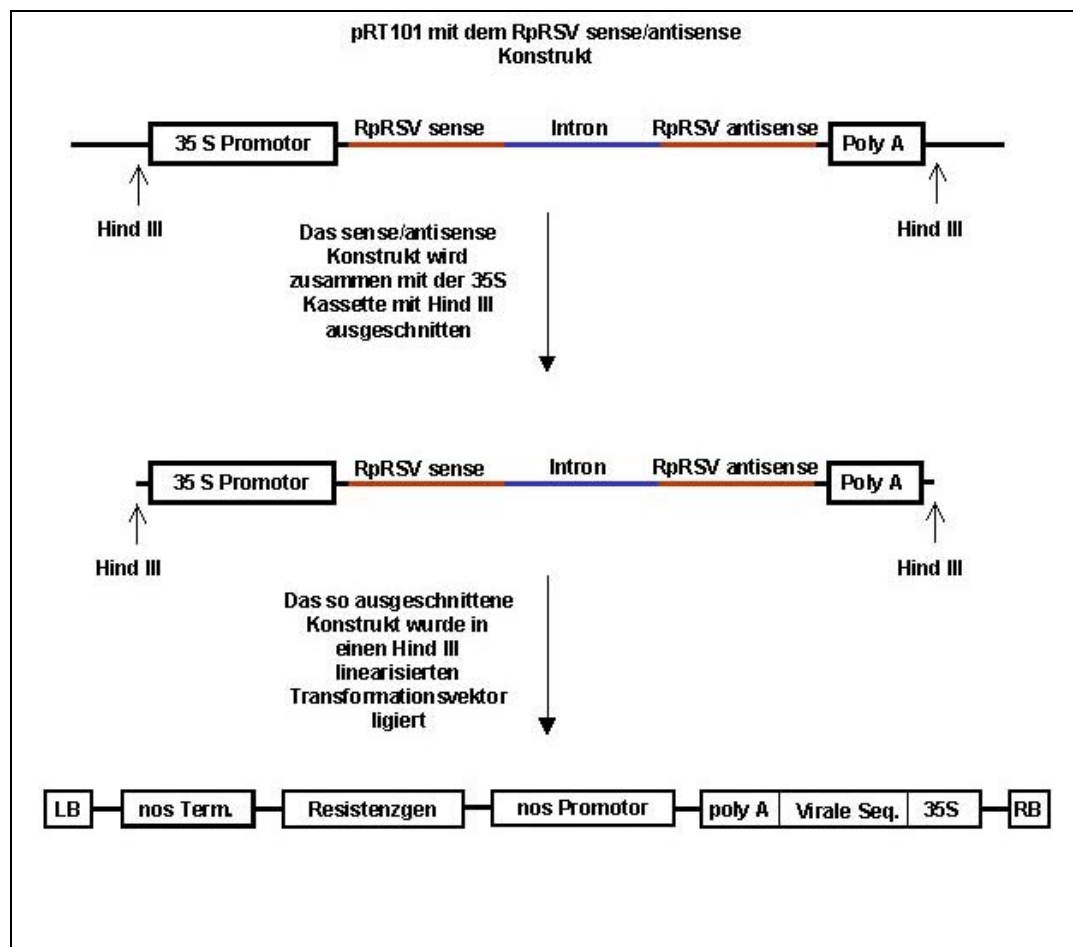


Abb. 20: Klonierung des inverted repeat Konstrukts in einen Transformationsvektor

3.6 Transformation von *Nicotiana benthamiana* mittels *Agrobakterien*

Die Transformationsvektoren wurden in *Agrobacterium tumefaciens* (ATHV) transformiert. Mit diesen transformierten *Agrobakterien* wurde eine *Agrobakterien*-vermittelte Transformation von *Nicotiana benthamiana* durchgeführt. Die Selektion der transgenen Pflanzen erfolgte unter den, für die jeweiligen Transformationsvektoren üblichen Selektionsbedingungen.

Auf dem Selektionsmedium war nach zwei Wochen die Entwicklung von Kallus an den Wundstellen der Blattstücke festzustellen. Nach weiteren zwei Wochen hatten sich aus dem Kallus die ersten kleinen adventiven Sprosse gebildet. Zur weiteren Selektion wurden die Sprosse vom Kallus abgetrennt und auf MS-Medium ohne Wachstumsstoffe aber mit 50 mg/l PPT bzw. 100 mg/l Kanamycin kultiviert. Von den übertragenen Sprossen begannen die ersten

nach zwei Wochen in dem selektiven Medium Wurzeln zu entwickeln. Diese Pflanzen wurden vermehrt und nach weiteren vier Wochen ins Gewächshaus übertragen.

Von den mit pBar-RpRSV transformierten Pflanzen konnten insgesamt 15 Linien im Gewächshaus etabliert werden. Zwei dieser Linien waren steril. Sechs Linien der pGJ-RpRSV transformierten Pflanzen wurden im Gewächshaus etabliert, wobei eine Linie unfruchtbar war.

Die Samen der transgenen Linien wurden geerntet und für die spätere Testung mittels 'Challenge Inokulation' aufbewahrt.

3.7 Nachweis des RpRSV-Konstrukts mittels PCR

Zum Nachweis des RpRSV-Konstrukts mittels PCR wurden die Primer **ch-K-Pst1(f)** und **pCass EV** (5' AAA GCT AGT GGA TTG ATG TGA TAT C 3') erwendet.

Sollte das RpRSV-Konstrukt in der pflanzlichen DNA enthalten sein, so ist ein PCR Produkt mit einer Länge von etwa 500 bp zu erwarten

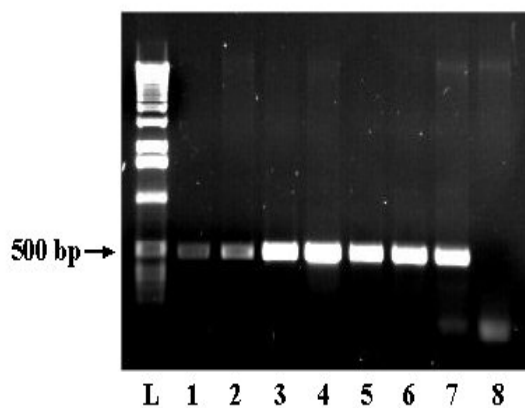


Abb. 21: Nachweis des RpRSV – Konstrukts in *N. benthamiana*. L = 1 kb Ladder; 1 = pBar-RpRSV Linie Nr. 1; 2 = pBar-RpRSV Linie Nr. 4; 3 = pBar-RpRSV Linie Nr. 10; 4 = pBar-RpRSV Linie Nr. 20; 5 = pGJ-RpRSV Linie Nr. 1; 6 = pGJ-RpRSV Linie Nr. 2; 7 = pGJ-RpRSV Linie Nr. 10; 8 = DNA Isolierung einer nicht transgenen Kontrollpflanze

Alle ins Gewächshaus überführt Linien wurden mit Hilfe der PCR als transgen positiv getestet. Die DNA Isolierung einer nicht transgenen Pflanze zeigte kein PCR-Produkt. Kontrollpflanzen zeigten mit den verwendeten Primern kein PCR-Produkt. PPT als auch Kanamycin erwiesen sich somit als sehr gute Selektionsreagenzien.

3.8 Testung der transgenen Pflanzen auf RpRSV-ch Resistenz

Zunächst wurden die Tabaksamen der transgenen Tabakpflanzen oberflächensterilisiert und auf Selektionsmedium plattiert. Etwa 75 % der Samen keimten völlig normal auf dem Selektionsmedium und wurden nach 10 bis 14 Tagen in Erde pikiert und ins Gewächshaus gestellt. Die Samen der pBar-RpRSV Linie Nr. 2 keimten nicht auf dem Selektionsmedium, obwohl die Elternpflanze dieser Samen das RpRSV-Konstrukt enthielten. Jedoch brachte diese Linie auch nur sehr wenige Samen hervor. Zur Kontrolle wurden auch Samen von nicht transgenen Tabakpflanzen auf Selektionsmedium ausgesät. Sämtliche Samen der nicht transgenen Tabakpflanzen keimten nicht auf den Selektionsmedien.

Die T1 Generation der transgenen Tabakpflanzen wurde mittels ‘Challenge Inokulation’ mit RpRSV-ch auf ihre Resistenz hin getestet. Als Infektionskontrolle dienten in jedem Inokulationsexperiment ca. 10 nicht transgene *N. benthamiana* Pflanzen. Sie zeigten in allen Experimenten und zu allen Analyse-Terminen (6 bzw. 13 Tagen nach Inokulation) zu 100 % eine starke Virus-positive Reaktion.

Die Reaktion der inokulierten transgenen Pflanzen konnte in drei Gruppen eingeteilt werden:

Anfälligkeit: Die Pflanzen zeigten bereits nach sechs Tagen die normalen Symptome einer RpRSV-ch Infektion und ergaben im ELISA – Test sowohl nach sechs als auch nach 13 Tagen den Kontrollen entsprechenden Werten

verzögerte Infektion: Die Pflanzen waren nach sechs Tagen nicht oder im Vergleich zu Kontrollpflanzen nur schwach infiziert, nach 13 Tagen jedoch genau so stark infiziert wie die nicht transgenen Kontrollpflanzen.

Immunität: Die Pflanzen waren nach sechs als auch nach 13 Tagen nicht infiziert (ELISA negativ).

Die Ergebnisse der ‘Challenge Inokulationen’ der pBar-RpRSV Pflanzen sind in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Reaktion der transgenen pBar-RpRSV Linien von *N. benthamiana* nach Challenge Inokulationen mit RpRSV-ch

Pflanzenlinie	Anzahl der getesteten Pflanzen	Anzahl der Pflanzen mit verzögerter Infektion	Anzahl der immunen Pflanzen
pBar-RpRSV1	25	14	3
pBar-RpRSV3	18	1	0
pBar-RpRSV4	8	0	0
pBar-RpRSV5	28	5	0
pBar-RpRSV8	20	1	0
pBar-RpRSV9	20	1	0
pBar-RpRVs10	18	1	0
pBar-RpRVs11	8	5	3
pBar-RpRVs12	18	0	0
pBar-RpRVs13	20	10	0
pBar-RpRVs16	18	1	0
pBar-RpRVs17	18	1	0
pBar-RpRVs20	18	1	0
Gesamt	237	41	6

Von 13 unabhängigen pBar-RpRSV Linien wurden 237 Einzelpflanzen inokuliert. Hiervon zeigten 41 Pflanzen eine verzögerte Infektion. Sechs Pflanzen waren immun gegenüber RpRSV-ch. Die einzelnen Linien reagierten zum Teil sehr unterschiedlich auf eine Infektion mit RpRSV-ch. So waren bei der Linie pBar-RpRSV1 14, bei pBar-RpRSV13 zehn und bei den Linien pBar-RpRSV-5 und 11 jeweils fünf Einzelpflanzen mit einer verzögerten Infektion zu beobachten. Bei Linie 1 und Linie 11 waren jeweils drei immune Pflanzen zu finden. Andere Linien hingegen zeigten einen Infektionsverlauf, der denen nicht transgener Pflanzen entsprach. So wurden von Linie 9 insgesamt 20 Einzelpflanzen inokuliert und nur eine Pflanze wies eine verzögerte Reaktion auf. Von Linie 12 wurden 18 Einzelpflanzen inokuliert und alle Pflanzen waren bereits nach 6 Tagen genau so stark infiziert wie die nicht transgenen Kontrollpflanzen.

Die Ergebnisse der ‘Challenge Inokulationen’ der pGJ-RpRSV Linien sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Reaktion der transgenen pGJ-RpRSV Linien von *N. benthamiana* nach Challenge Inokulationen' mit RpRSV-ch

Pflanzenlinie	Anzahl der getesteten Pflanzen	Anzahl der getesteten Pflanzen	Anzahl der immunen Pflanzen
pGJ-RpRSV1	12	11	1
pGJ-RpRSV3	9	6	0
pGJ-RpRSV5	9	4	0
pGJ-RpRSV6	12	0	0
pGJ-RpRSV7	12	5	0
Gesamt	54	27	1

Von den fünf pGJ-RpRSV Linien wurden insgesamt 54 Einzelpflanzen mit RpRSV-ch inokuliert. 27 wiesen eine verzögerte Infektion auf und eine Pflanze war immun gegenüber RpRSV-ch. Auch hier zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Linien. So waren auch hier Linien zu finden, bei denen mehrere Einzelpflanzen eine verzögerte Reaktion aufwiesen (Linie 1, 3, 5 und 7). Die deutlichsten Reaktionen gegenüber einer RpRSV-ch Infektion war bei Linie 1 zu beobachten. Sechs Tage nach der Inokulation waren bei dieser Linie alle getesteten Pflanzen nicht oder sehr schwach infiziert, eine Pflanze dieser Linie war 13 Tage nach der Inokulation nicht infiziert. Die Pflanzen von Linie 6 waren bereits nach sechs Tagen genau so stark infiziert wie die nicht transgenen Kontrollpflanzen.

Die Überprüfung der immunen Pflanzen sowie einiger infizierten Pflanzen nach 28 Tagen mittels ELISA bestätigte die zuvor erhaltenen Ergebnisse.

3.9 Northern Analyse

Von Pflanzen aus der 'Challenge Inokulation' erfolgten RNA Extraktionen unmittelbar vor, sechs und 13 Tage nach der Inokulation (Abb. 22).

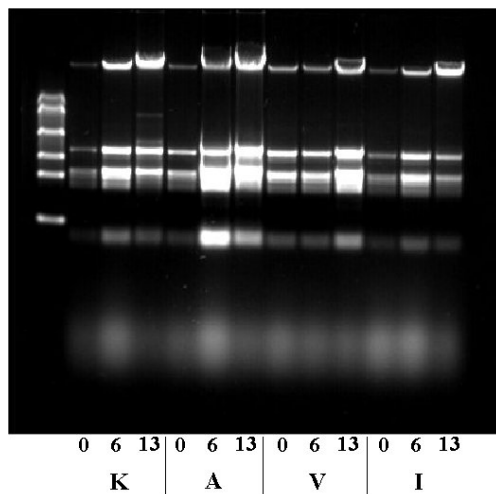


Abb. 22: Gelelektrophoretische Auftrennung (1 % TAE) von RNA Extrakten. K = nicht transgene Kontrollpflanze; A = Anfällige transgene Pflanze; V = transgene Pflanze mit verzögerter Infektion; I = Immune transgene Pflanze. 0, 6 und 13 sind die Zeitpunkte (Tage) der Probennahme nach der Inokulation

Auf der Darstellung des RNA-Gels sind die Banden der Pflanzen – RNA zu erkennen. Anhand der Intensität der Banden auf dem RNA Gel wurde die Konzentration der RNA geschätzt und damit die Menge der RNA für die Northern Hybridisierung festgelegt. Es wurden Northern Hybridisierungen mit Proben einer nicht transgenen Kontrollpflanze, einer anfälligen transgenen, einer transgenen Pflanzen mit verzögerter Infektion und einer immunen transgenen Pflanze durchgeführt. Als Sonde diente ein DIG markiertes PCR-Produkt. Das PCR – Produkt wurde mit den Primern **ch-K-Pst1(f)** und **ch-K-Bgl2(r)** aus dem Vektor pBar-RpRSV amplifiziert und hatte eine Größe von 355 bp (Abb. 23).

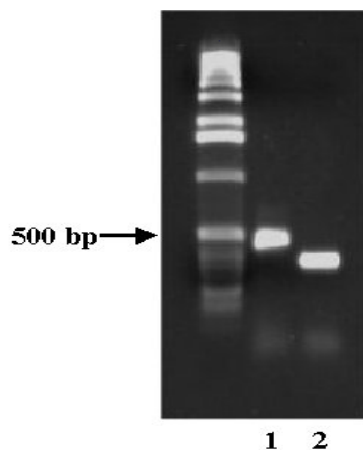


Abb. 23: Gelelektrophoretische Auftrennung (1 % TAE) der DIG-markierten Sonden (Nr. 1) und eines nicht DIG markierten Kontroll – PCR – Produkts (Nr. 2)

Die DIG markierte Sonde erscheint etwas größer als das Kontroll – PCR – Produkt. Dieser Unterschied ist durch die DIG Moleküle, die an der Sonde gebunden sind, zu erklären. Die Ergebnisse der Northern Hybridisierung sind in Abbildung 24 dargestellt.

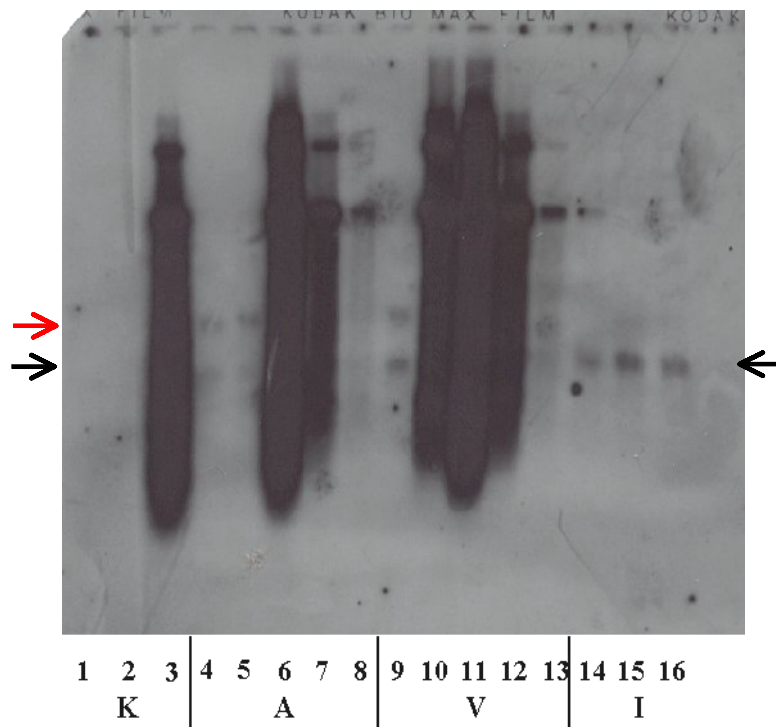


Abb. 24: Northern Hybridisierung mit der DIG markierten Sonden des RpRSV-Konstrukts. 1, 2, 3 = RNA von nicht transgener Kontrollpflanzen (K) 0, 6 und 13 Tage nach der Inokulation; 4, 5, 6, 7, 8 = RNA einer anfälligen transgenen Pflanze (A) 0, 6 und 13 (unverdünnt, 1:10 und 1:100 verdünnt) Tage nach der Inokulation; 9, 10, 11, 12, 13 = RNA einer transgenen Pflanze mit verzögerter Infektion (V) 0, 6 und 13 (unverdünnt, 1:10 und 1:100 verdünnt) Tage nach der Inokulation; 14, 15, 16 = RNA einer immunen transgenen Pflanze (I) 0, 6 und 13 Tage nach der Inokulation

In nicht transgenen Kontrollpflanzen und der anfälligen Pflanzen ist die Virus-RNA nach 13 Tagen deutlich sichtbar (Abb. 24). Dies zeigte sich auch bei anderen Northern Hybridisierungen. Das Auftreten des Virussignals der Pflanze mit verzögerter Infektion schon 6 Tage nach Inokulation wie in Abb. 24 dargestellt, konnte mit entsprechenden Proben nicht bestätigt werden. Tritt das Virussignal auf, werden alle anderen Signale überlagert. Auf der Höhe des schwarzen Pfeils liegt die mRNA des RpRSV-Konstrukts.

Die anfällige transgene Pflanze zeigte neben den sehr schwachen Banden des Konstrukts noch ein etwas größeres Fragment (Abb. 24, Spur A4, A5, roter Pfeil). Möglicherweise handelt es sich hier um nicht gesplittede RNA.

Pflanzen mit verzögerter Infektion (Abb.24; V) zeigten ebenfalls dieses etwas größere Fragment. Die mRNA des Konstrukts (schwarzer Pfeil) ist zum Zeitpunkt t0 (Abb.24; Spur 9V)

schwach, aber wesentlich stärker als bei der anfälligen Pflanze. Dies konnte in Northern Hybridisierungen entsprechender Proben bestätigt werden.

Bei der immunen Pflanze ist nur das Signal der mRNA des Konstrukts zu erkennen. Vor der Inokulation (t_0) ist ein schwaches Signal zu erkennen (Abb. 24; Spur 14I). Sechs Tage nach der Inokulation ist das Signal deutlich stärker (Abb. 24; Spur 15I) während es 13 Tage nach Inokulation wieder schwächer wird (Abb. 24; Spur 16I), jedoch immer noch stärker als zum Zeitpunkt t_0 ist. Dies konnte ebenfalls in Northern Hybridisierungen entsprechender Proben bestätigt werden.

3.10 Southern Hybridisierung

Zur molekularen Charakterisierung der transgenen Pflanzen wurde Gesamt-DNA aus Blattproben verschiedener Linien (Linien pBar-RpRSV Nr. 1, 5, 11 und 13 sowie pGJ-RpRSV Nr. 1, 5, 6 und 7) isoliert. Durch Verdau der genomischen DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen sollten Rückschlüsse auf Insertion und Kopienzahl des Transgens erfolgen.

Geeignete Restriktionsenzyme waren *Pst* I, *Sst* I, und *EcoR* V, da diese nur einmal im RpRSV-Konstrukt schneiden, wobei sich *Pst* I und *Sst* I als nicht geeignet für den Verdau genomischer Pflanzen-DNA erwiesen haben. Weiterhin wurde *EcoR* I verwendet, welches nicht im Konstrukt aber häufig im Genom der Pflanze schneidet (Abb. 25).

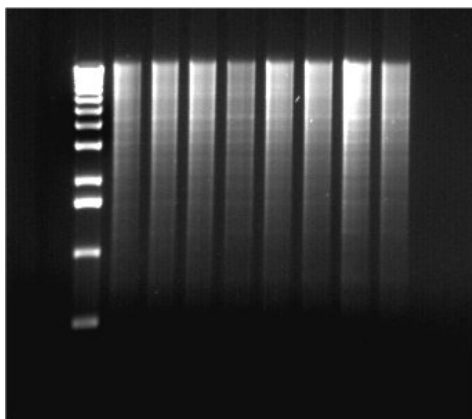


Abb. 25: Gelelektrophoretische Auftrennung (1 % TAE) der mit *EcoR* I verdauten genomischen DNA von ausgewählten transgenen Linien

Die Hybridisierung der *EcoR* I verdauten DNA ist in Abb. 26 dargestellt.

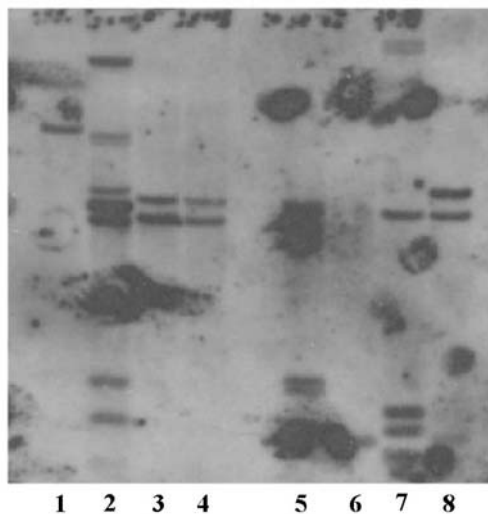


Abb. 26: Southern Hybridisierung von *EcoR* I verdauter genomischer Gesamt-DNA der transgenen Tabaklinien. Nr. 1 = pBar-RpRSV1; Nr. 2 = pBar-RpRSV5; Nr. 3 = pBar-RpRSV11; Nr. 4 = pBar-RpRSV13; Nr. 5 = pGJ-RpRSV1; Nr. 6 = pGJ-RpRSV5; Nr. 7 = pGJ-RpRSV6 und Nr. 8 = pGJ-RpRSV7. Hybridisiert wurde mit einer DIG markierten DNA-Sonde.

Aufgrund der erhaltenen Bandenmuster nach *EcoR* I Verdau und Hybridisierung mit der Virussequenz spezifischen Sonde lässt sich bei Linie pBar-RpRSV1 auf mindestens eine Kopie, bei Linie pBar-RpRSV5 auf sieben Kopien, bei pBar-RpRSV11 und pBar-RpRSV13 auf zwei Kopien des Transgens im pflanzlichen Genom schließen (Abb. 26). Die Linien pBar-RpRSV11 und 13 scheinen nach dieser Hybridisierung aus dem selben Transformationsereignis hervor gegangen zu sein. Für die Linie pGJ-RpRSV1 konnten zwei, für Linie pGJ-RpRSV5 eine, für Linie pGJ-RpRSV6 vier und für Linie pGJ-RpRSV7 zwei Hybridisierungsbanden detektiert werden. (Abb. 26). Nach entsprechender Hybridisierung von *EcoR* V verdauter genomischer DNA der transgenen Linien wurden diese Ergebnisse bestätigt.

3.11 Herstellung von „full length“ Klonen von RpRSV

Da die RNA Stränge von RpRSV zu lang sind, um sie mit einer RT-PCR und anschließenden Klonierung zu erhalten, wurden die „full length“ Klone in mehreren Schritten aufgebaut. Die Herstellung der RpRSV „full length“ Klone wird am Beispiel der RNA2 von RpRSV-g eingehend erläutert.

Die „full length“ RNA Sequenzen sollten in pCassII ligiert werden. Bei pCassII handelt es sich um einen pUC18 basierenden Vektor mit einem doppelten 35S Promotor und einem 35 S Terminator. Zwischen dem Promotor und dem Terminator befindet sich eine kurze *multiple cloning site* in die „full length“ Sequenzen der RNA1 und RNA2 kloniert wurden (Abb. 27).

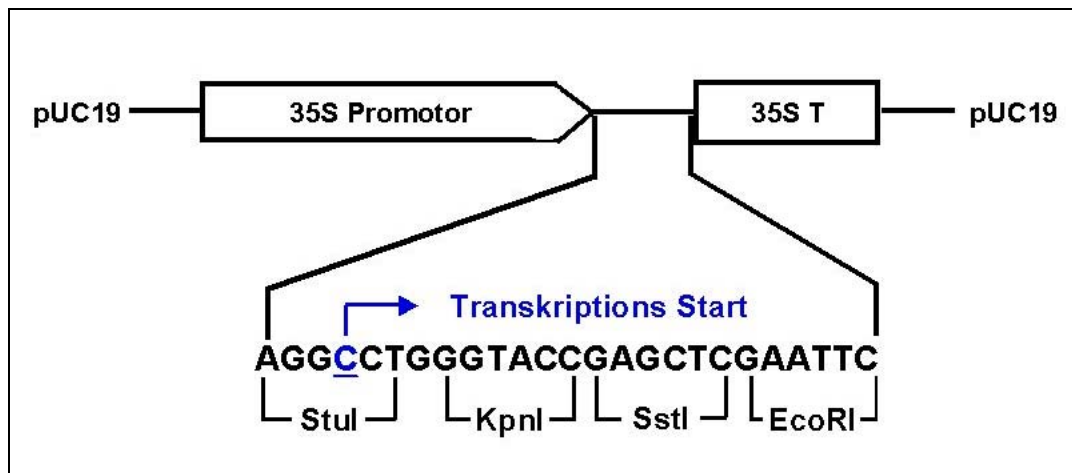


Abb. 27: Der doppelte 35S Promotor, die *multiple cloning site* sowie der 35S Terminator von pCass II

Bei der Klonierung der „full length“ Klone muss die erste Nukleinsäure des jeweiligen RNA-Stranges in die *Stu* I Schnittstelle des Vektors kloniert werden. Da in keiner der RNA Sequenzen eine *Sst* I Schnittstelle auftrat, wurde diese Schnittstelle für den weiteren Aufbau der „full length“ Klone verwendet. Die Suche (MapDraw, DNA-Star) nach einmaligen, nicht in pUC18 und pCassII vorhandenen Schnittstellen auf der RNA2 von RpRSV-g lieferte die in Abb. 28 dargestellten möglichen Restriktionsenzyme.

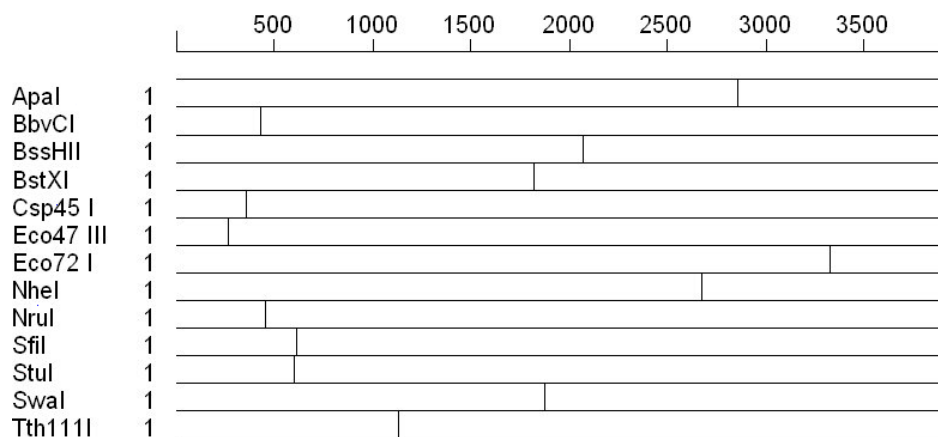


Abb. 28: Einmalige Schnittstellen auf der RNA2 von RpRSV-g die nicht in den Vektoren pCassII und pUC18vorkommen

Bedingung für die letztendliche Auswahl der Enzyme war, dass die erste Schnittstelle nicht mehr als 500 nt vom 5' Ende entfernt und die letzte Schnittstelle nicht mehr als 800 nt vom 3' Ende entfernt vorlag (Abb. 29).

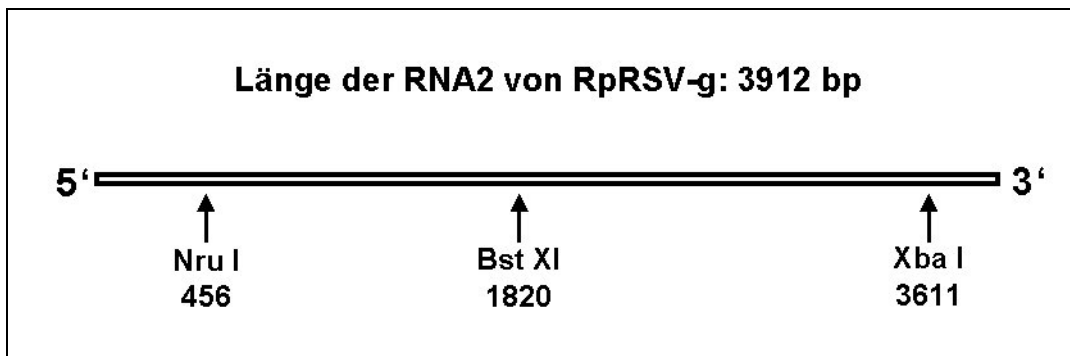


Abb. 29: Schnittstellen auf der RNA2 (der ds cDNA der RNA2) von RpRSV-g, welche für die Herstellung des „full length“ Klons verwendet wurden

Mittels RT-PCR wurden vier Fragmente amplifiziert (Abb. 30):

Fragment 1: von der ersten Base der RNA bis zur 500. Base der RNA

Fragment 2: von der 430. Base bis zur 1.850. Base der RNA2

Fragment 3: von der 1.800. Base bis zur 3.350. Base der RNA2

Fragment 4: von der 3.300. Base bis zum Poly(A) der RNA2

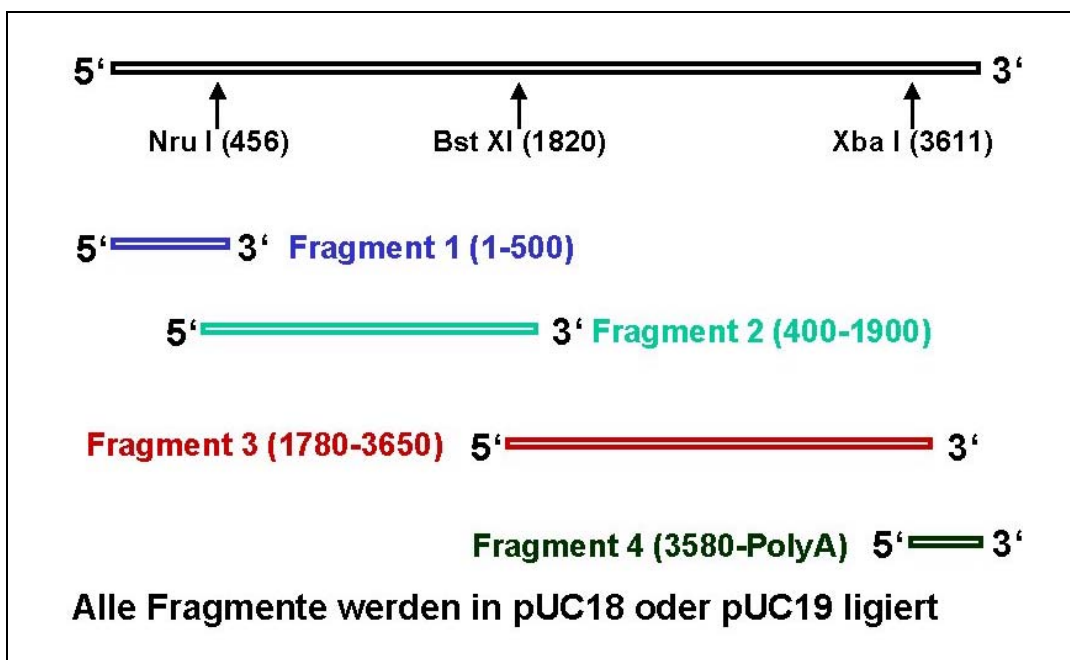


Abb. 30: Fragmente 1 bis 4 die zum Aufbau des „Full Length“ Klons der RNA2 von RpRSV-g verwendet wurden

Die erhaltenen Fragmente wurden in pUC18 ligiert. Bei der Klonierung war darauf zu achten, dass bei Fragment 1 die *Nru* I, bei Fragment 2 die *Bst* XI, bei Fragment 3 die *Eco*72 I Schnitt-

stelle und bei Fragment 4 das Poly(A) auf der selben Seite ligiert waren, wie die *Sst* I Schnittstelle der multiple cloning site von pUC18.

Im nächsten Schritt wurde eine PCR mit dem Plasmid pUC19/Fragment1 durchgeführt. Hierfür wurden Primer, die den Nukleinsäuren 1 bis 20 entsprechen, sowie komplementär zu dem Bereich hinter der multiple cloning site (in der sich auch *Sst* I befindet) von pUC18 sind verwendet. Als Polymerase wurde eine Proofreading – Polymerase (Pfx DNA Polymerase, Invitrogen) verwendet. Diese Polymerase macht im Gegensatz zur *Taq* Polymerase glatte Enden (Abb. 30).

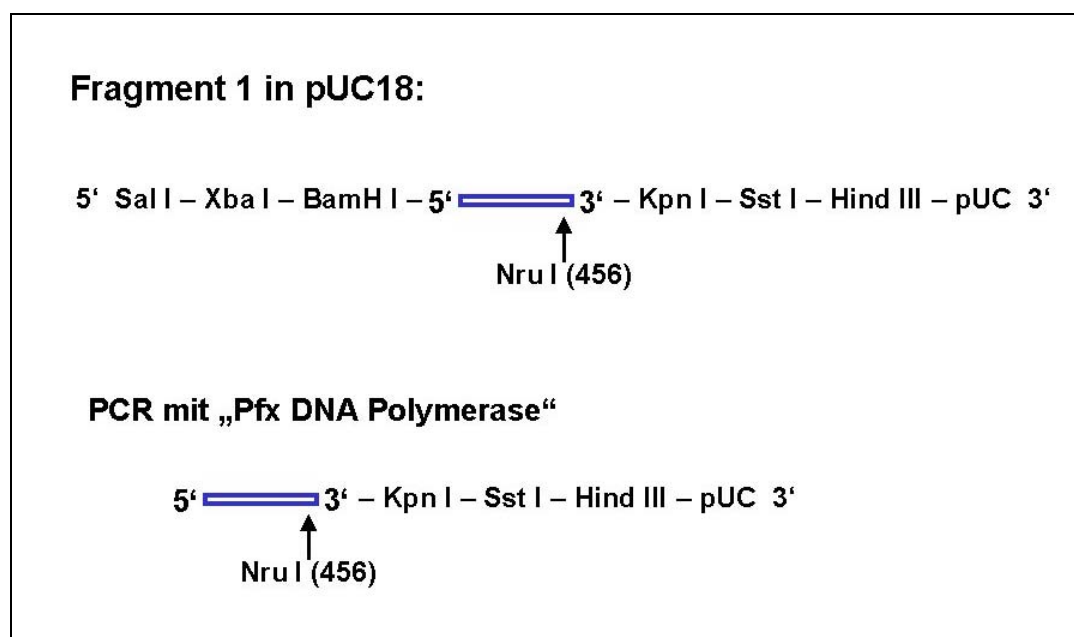


Abb. 30: Aufbau des RNA2 „full length“ Klons von RpRSV-g

Im Anschluss an die PCR wurde das PCR – Produkt mit *Sst* I verdaut. Parallel hierzu wurde der Vektor pCassII mit *Stu* I und *Sst* I linearisiert (Abb. 31).

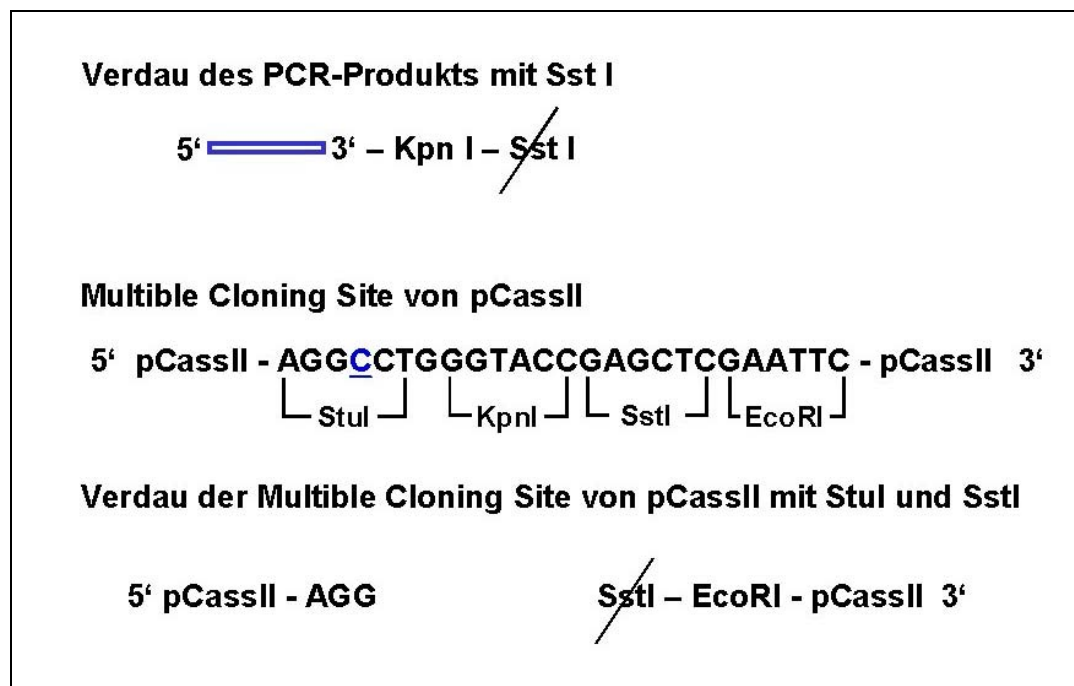


Abb. 31: Aufbau des RNA2 „full length“ Klons von RpRSV-g

Sst I generiert klebrige und *Stu* I glatte Enden. Das verdauete PCR – Produkt wurde in den linearisierten Vektor ligiert und darin kloniert. Man erhielt das Plasmid pCassII/F1. Da sich in der *Stu* I Schnittstelle von pCassII der Transkriptionsstart befindet, ist nun die erste Nukleinsäure der RNA2 von RpRSV-g der Transkriptionsstart. Bei dieser Ligation wurde die *Sst* I Schnittstelle wieder hergestellt (Abb. 32).

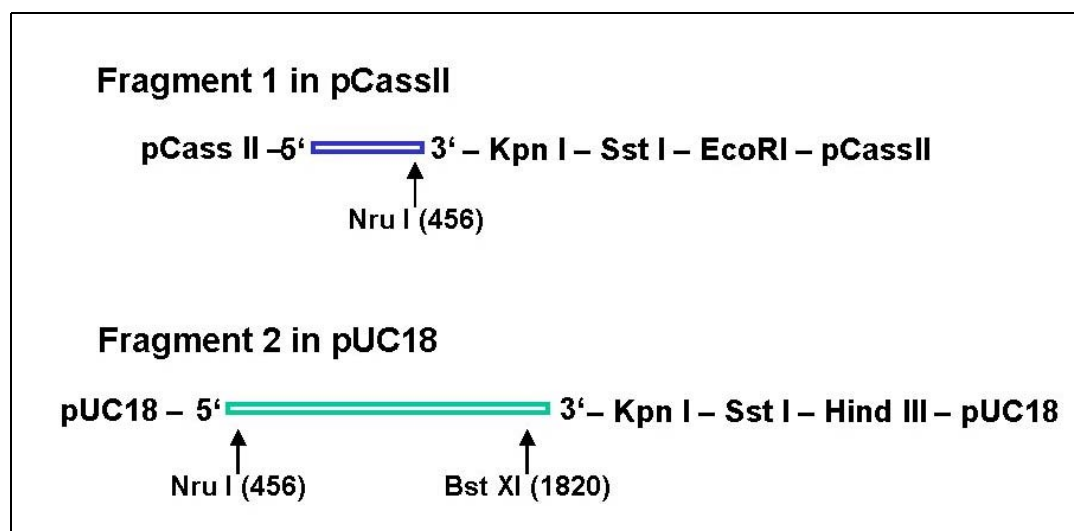


Abb. 32: Aufbau des RNA2 „full length“ Klons von RpRSV-g

Im nächsten Schritt wurde das Plasmid pCassII/F1 mit *Nru* I und *Sst* I linearisiert. Das Fragment 2 wurde mit *Nru* I und *Sst* I aus dem pUC18 Vektor herausgeschnitten (Abb. 33).

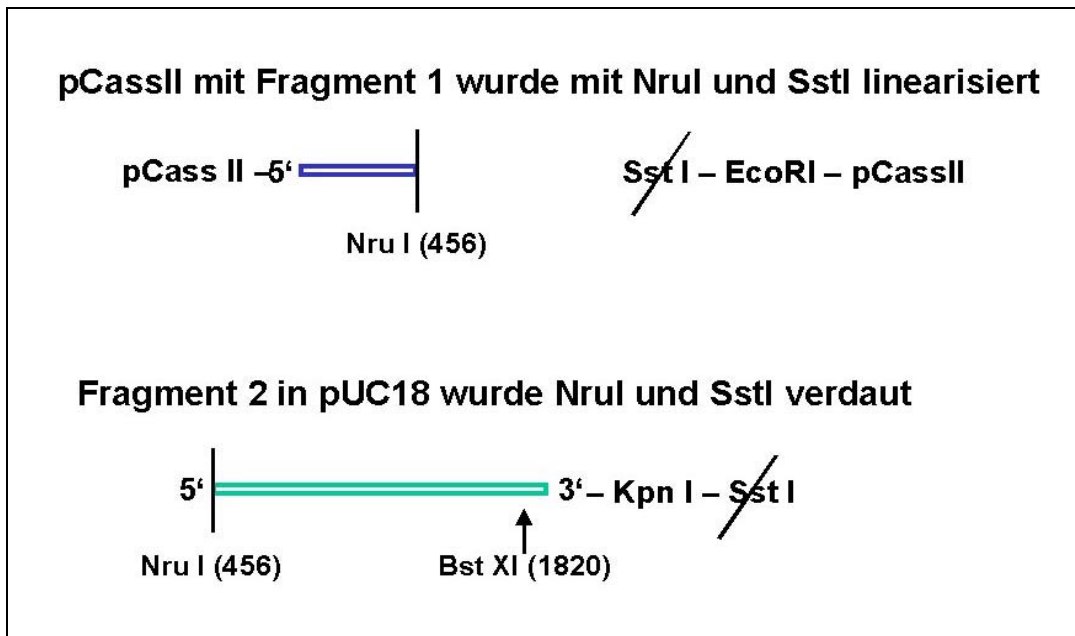


Abb. 33: Aufbau des RNA2 „full length“ Klons von RpRSV-g

Nru I generiert glatte Enden und *Sst* I klebrige Enden. Das linearisierte Plasmid und das ausgeschnittene Fragment 2 wurden nun ligiert und kloniert. Bei dieser Klonierung wurden die *Nru* I und die *Sst* I Schnittstelle wieder hergestellt (Abb. 34).

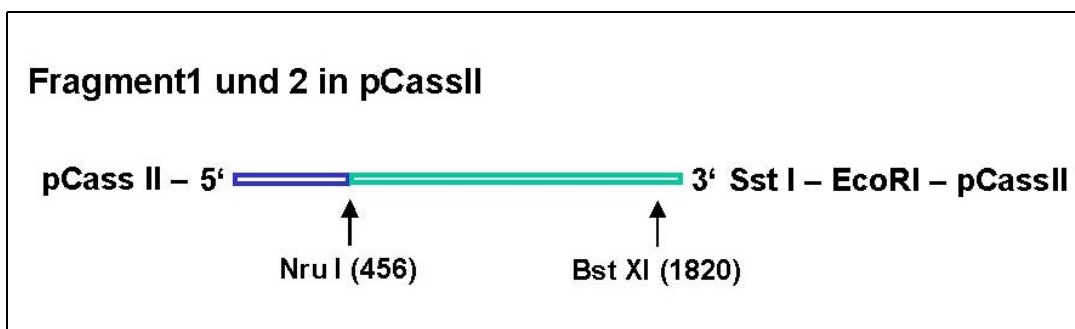


Abb. 34: Aufbau des RNA2 „full length“ Klons von RpRSV-g

Die Fragment 1 und 2 waren nun in pCassII (pCassII/F1/F2) kloniert. Die weiteren Fragmente wurden nun analog zu der beschriebene Methode in den Klon eingebaut. Man erhielt somit den „full length“ Klon der RNA2 von RpRSV-g.

Auf die selbe Art wurde auch der „full length“ Klon der RNA1 von RpRSV-g aufgebaut. Lediglich die Schnittstellen unterschieden sich. Die verwendeten Schnittstelle sind der Abb. 35 dargestellt.

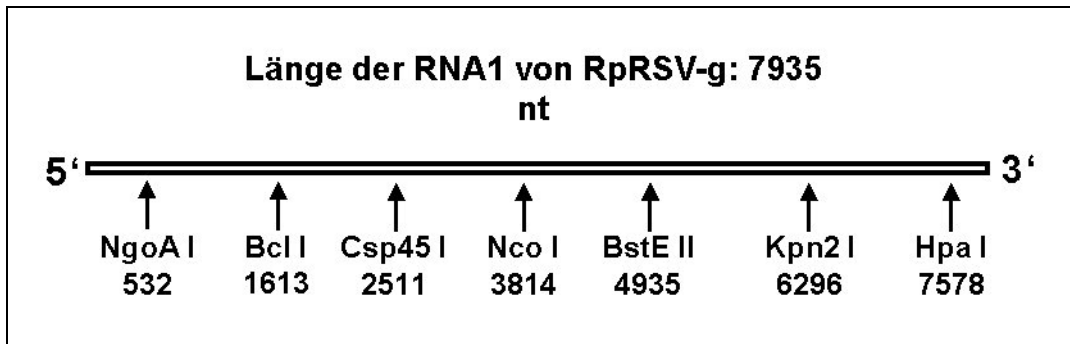


Abb. 35: Schnittstellen auf der ds cDNA der RNA1 von RpRSV-g, die zum Aufbau des „full length“ Klons verwendet wurden

Für die RNA1 von RpRSV-g wurden sieben Restriktionsschnittstellen verwendet. Dementsprechend mussten acht RT-PCR – Produkte amplifiziert, kloniert und schließlich zum „full length“ Klon zusammen gefügt werden.

Neben den „full length“ Klonen der RNA1 und RNA2 von RpRSV-g wurde auch noch eine „full length“ Klon der RNA2 von RpRSV-ch hergestellt. Die verwendeten Schnittstelle sind der Abb. 36 dargestellt.

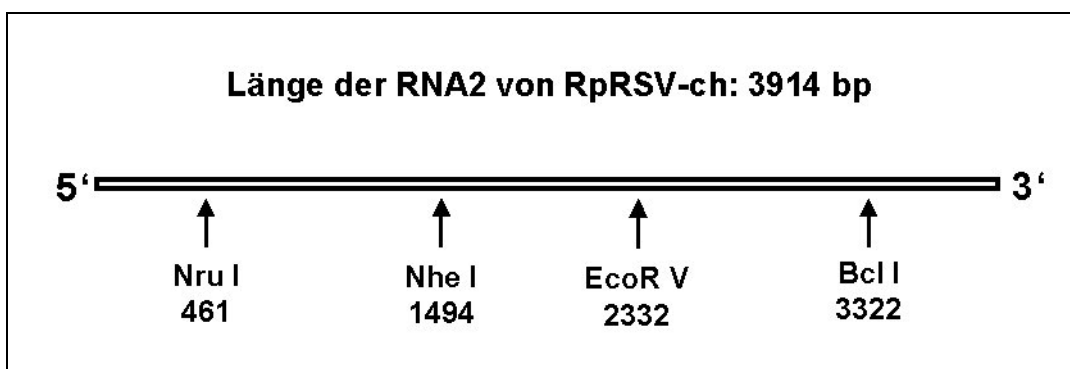


Abb. 36: Schnittstellen auf der ds cDNA der RNA2 von RpRSV-ch, die zum Aufbau des „full length“ Klons verwendet wurden

Überprüfung der Sequenz

Die „full length“ Klone wurden zur Überprüfung der korrekten Basenabfolge sequenziert. Festgestellte Deletionen und Insertionen wurden verbessert, um eine Verschiebung des Leserasters zu verhindern. Da durch die Punktmutationen kein Stopcodon eingefügt wurde, wurden die Klone mit diesen Punktmutationen für die Infektionsexperimente verwendet.

Punktmutationen auf dem RNA1 „full length“ Klon von RpRSV-g:

- Position 93: Austausch von A durch G (keine Änderung am Polyprotein)
- Position 511: Austausch von G durch A (keine Änderung im Polyprotein)
- Position 1.560: Austausch von T durch C (Aminosäure V wird durch A ersetzt)
- Position 2.333: Austausch von G durch A (Aminosäure A wird durch T ersetzt)
- Position 4.624: Austausch von T durch C (keine Änderung im Polyprotein)
- Position 5.189: Austausch von C durch T (Aminosäure R wird durch C ersetzt)
- Position 7.494: Austausch von G durch A (keine Änderung im Polyprotein)

Punktmutationen auf dem RNA2 „full length“ Klon von RpRSV-g:

- Position 3.590: Austausch von T durch C (keine Änderung im Polyprotein)
- Position 3.886: Austausch von G durch A (keine Änderung im Polyprotein)

Der „full length“ Klon der RNA2 von RpRSV-ch wurde nicht sequenziert.

Funktionsanalyse

Um zu überprüfen, ob die RpRSV-g „full length“ Klone infektiös sind, wurden Infektionsexperimente durchgeführt. Zunächst wurden die Klone in *E. coli* JM101 transformiert, um mögliche Einflüsse von methylierter Plasmid-DNA auszuschließen. Pflanzen der Gattung *Chenopodium quinoa* wurden inokuliert. Zunächst wurden je Pflanze 10 µg RNA1 (pCassII + RNA1 full length) und 5 µg RNA2 (pCassII + RNA2 full length) abgerieben. Die Plasmide wurden im Verhältnis 1:3 in Inokulationspuffer aufgenommen. Insgesamt wurden 12 Pflanzen inokuliert. Weiterhin wurden 10 *C. quinoa* Pflanzen mit dem nativen Virus inokuliert. Nach 13 und nach 20 Tagen wurden lokale als auch systemische Blätter mittels ELISA auf eine mögliche RpRSV-g Infektion untersucht.

Alle mit dem nativen Virus inokulierten Pflanzen waren stark infiziert.

Keine der inokulierten Pflanzen zeigte Symptome von RpRSV-g. Nach 13 Tagen waren die inokulierten Blätter von 11 Pflanzen ELISA positiv. Nach 20 Tagen waren lediglich die ino-

kulierten Blätter von vier Pflanzen noch ELISA positiv. Sowohl nach 13 als auch nach 20 Tagen waren die systemischen Blätter ELISA negativ.

Der Versuch wurde unter den selben beschriebenen Bedingungen mit acht *C. quinoa* Pflanzen wiederholt. Auch hier zeigten die Pflanzen keine Symptome. Die inokulierten Blätter von sieben Pflanzen waren 13 Tagen nach der Inokulation ELISA positiv, nach 20 Tagen waren nur noch die inokulierten Blätter von fünf Pflanzen ELISA positiv. Die systemischen Blätter waren erneut zu beiden Zeitpunkten ELISA negativ. Die inokulierten Blätter der fünf ELISA positiven Pflanzen wurden geerntet und bei -20°C gelagert.

Rückinokulation

Mit den lokal infizierten Blättern von ELISA positiven Pflanzen wurden *C. quinoa* Pflanzen rückinokuliert. Hierzu wurden die Blätter in 4 ml Bentonit – Inokulationspuffer homogenisiert. Mit dem Homogenisat wurden insgesamt 15 Pflanzen inokuliert. Die Pflanzen wurden 13 und 20 Tagen nach der Inokulation mittels ELISA auf eine mögliche RpRSV-g – Infektion hin untersucht. Parallel hierzu wurden fünf *C. quinoa* Pflanzen mit den nativen RpRSV-g Virus inokuliert.

Nach 13 Tagen zeigten lokale und systemische Blätter aller rückinfizierten Pflanzen typische RpRSV-g Symptome. Die Symptomausprägung war jedoch etwas schwächer als bei den Pflanzen, die mit dem nativen RpRSV-g infiziert wurden. Die inokulierten als auch die systemischen Blätter der rückinfizierten Pflanzen waren ELISA positiv.

20 Tagen nach der Inokulation zeigten die Blätter der rückinfizierten Pflanzen keine Symptome mehr, waren jedoch immer noch ELISA positiv. Die rückinfizierten Pflanzen wurden 27 Tage nach der Inokulation nochmals mittels ELISA untersucht. Zu diesem Zeitpunkt waren alle inokulierten Blätter vollständig abgestorben. Für den ELISA wurden die jüngsten, voll entwickelten Blätter verwendet. Alle Pflanzen waren immer noch ELISA positiv.

Aus den systemischen Blättern von drei zufällig ausgewählten Pflanzen wurde die RNA extrahiert. Die RNA Proben wurden mittels RT-PCR auf das Vorhandensein von RNA1 untersucht. Hierzu wurden RNA1 spezifische Primer, die in der Region der Helikase binden, verwendet. Das zu erwartende RT-PCR – Produkt war 480 bp groß. Parallel wurde auch eine RNA – Extraktion einer nicht infizierten Kontrollpflanze untersucht (Abbildung 37).

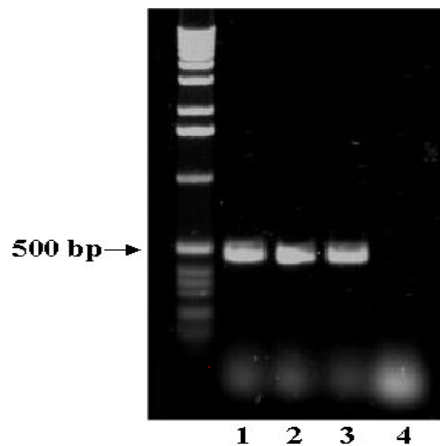


Abb. 37: Gelelektrophoretische Trennung (1 % TAE) eines RT-PCR – Produkts zur Amplifikation eines 480 bp großen Fragmentes der RNA1 von RpRSV-g. Als Template dienten gesamt – RNA von systemischen Blättern von drei rückinfizierten *C. quinoa* (1, 2, 3) und einer nicht infizierten *C. quinoa* Pflanze (4).

Die RT-PCR mit der RNA der systemischen Blättern der rückinfizierten Pflanzen war positiv. Es kann sich um kein unspezifisches PCR-Produkt handeln, da bei der RNA der nicht infizierten Kontrollpflanze kein RT-PCR Produkt auftritt. Hiermit ist auch molekularbiologisch gezeigt, dass der Klon infektiös ist und die RNA1 selbständig repliziert wird.

Konzentrationsabhängigkeit

Zur genaueren Bestimmung der Mindestmenge der RNA1 und RNA2 „full length“ Klone, wurden Inokulationen mit verschiedenen Mengen von RNA1 und RNA2 durchgeführt. Jeweils acht *C. quinoa* Pflanzen wurden mit folgenden Mengen an RNA1 und RNA2 infiziert:

1. 1 µg RNA1 und 1 µg RNA2 je Pflanze
2. 5 µg RNA1 und 5 µg RNA2 je Pflanze
3. 10 µg RNA1 und 10 µg RNA2 je Pflanze

Weiterhin wurden noch vier *C. quinoa* Pflanzen mit 10 µg RNA1 und 5 µg RNA2 je Pflanze und vier Pflanzen mit dem nativen RpRSV-g inokuliert. Inokuliert wurden drei voll ausgebildete Blätter je Pflanze. 13 Tage nach der Inokulation wurden Proben von lokalen und systemischen Blättern mittels ELISA auf eine RpRSV-g Infektion untersucht.

Anhand der OD-Werte des ELISA's wurden folgenden Begriffe für die Infektions-Grade definiert:

- nicht infiziert: die ELISA Werte der Pflanze waren genauso hoch wie die Werte der Negativkontrolle und des Puffers
- schwach infiziert: die ELISA Werte der Pflanzen waren mindestens doppelt und maximal dreimal so hoch wie die Werte der Negativkontrolle und des Puffers

- mittel infiziert: die ELISA Werte der Pflanze waren mindestens dreimal und maximal viermal so hoch wie die Werte der Negativkontrolle und des Puffers
- stark infiziert: die ELISA Werte der Pflanze waren mindestens viermal so hoch wie die Werte der Negativkontrolle und des Puffers

Alle mit dem nativen Virus inokulierten Pflanzen waren stark infiziert.

13 Tage nach der Inokulation waren einige lokale Blätter infiziert (siehe Tabelle 9). Die systemischen Blätter waren erneut nicht infiziert.

Tab. 9: Einfluss verschiedener Mengen an RNA des RpRSV-g full length Klons auf die Infektion von *C. quinoa*.

	Nicht infiziert	Schwach infiziert	Mittel infiziert	Stark infiziert
1 µg RNA1 / 1 µg RNA2	5	2	1	0
5 µg RNA1 / 5 µg RNA2	6	0	1	1
10 µg RNA1 / 10 µg RNA2	5	0	2	1
10 µg RNA1 / 5 µg RNA2	3	0	0	1

Bei jeder Variante treten infizierte Pflanzen auf, jedoch wesentlich weniger als bei den ersten Infektionsexperimenten. Allerdings waren die Bedingungen im Gewächshaus wesentlich schlechter. Ein Grossteil der inokulierten Blätter war zum Zeitpunkt der Probennahme bereits abgestorben, so dass hier der ELISA negativ war. Jedoch waren schon bei der geringsten Konzentration an Full length – Klonen einige Pflanzen leicht infiziert.

4. Diskussion

Im Verlauf der vorgestellten Experimente wurden beide in Deutschland vorkommende Stämme des Himbeerringflecken Nepovirus sequenziert. Basierend auf den Sequenzvergleichen wurde eine Sequenz von RpRSV-ch zum Aufbau eines „inverted Repeat“ Konstruktes ausgewählt. Dieses Konstrukt sollte ein „Gene silencing“ der viralen RNA und damit eine Resistenz gegenüber RpRSV induzieren. Tabakpflanzen der Gattung *Nicotiana benthamiana* wurden mit diesem Konstrukt transformiert. Die T1 Generation dieser transgenen Pflanzen wurde anschließend mittels „Challenge Inokulation“ mit RpRSV-ch auf ihre Resistenz gegenüber RpRSV-ch getestet. Es wurden Untersuchungen hinsichtlich molekularbiologischer Merkmale mit ausgewählten Pflanzen durchgeführt. In einem weiteren Projekt wurden zur genaueren molekularbiologischen Charakterisierung von RpRSV „full length“ Klone von RpRSV-g und RpRSV-ch hergestellt. Die Klone waren unter der Kontrolle eines 35 S Promotors. Mit diesen Klonen wurden erfolgreich Infektionsexperimente durchgeführt.

Bei der Isolierung der viralen RNA aus den infizierten *Chenopodium quinoa* Blättern waren lediglich die Banden der RNA1 und RNA2 sichtbar. Die beiden deutschen Stämme von RpRSV haben somit keinen Satelliten. Dies entspricht auch Beobachtungen von Blok *et al.* (1992), Mayo and Robertson (1996) und Scott *et al.* (2000). Auch sie konnten keine Satelliten bei englischen Stämmen von RpRSV finden. Satelliten kommen bei Nepoviren häufig vor. So sind bislang 24 Satelliten von Pflanzenviren bekannt, acht davon kommen bei Nepoviren vor (Mayo and Robertson, 1996). Eine mögliche Erklärung für das relativ häufige Auftreten von Satelliten bei Nepoviren ist, dass das Hüllprotein von Nepoviren auch leere Kapsidhüllen formt. In diese leere Hüllen kann dann eine Satelliten-RNA verpackt werden, ohne dass dies einen Einfluss auf die Kapsidierung der viralen RNA hat.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Herstellung von doppelsträngiger cDNA (Gubler and Hoffmann, 1983) erwies sich als sehr effektiv um ds cDNA aus der viralen RNA zu amplifizieren. Arbeitsgruppen, die Nepoviren sequenzierten, verwendeten dieselbe Methode (Brault *et al.*, 1989; le Gall *et al.*, 1989; Serghini *et al.*, 1990; Ritzenthaler *et al.*, 1991; Blok *et al.*, 1992), erhielten jedoch zum Teil größere cDNA Klone. Grund hierfür könnten die in diesen Arbeitsgruppen etwas modifizierte Methoden sein.

Beide Stämme von RpRSV wurden erfolgreich sequenziert. Die Längen der 5' NCR liegen bei 150 nt (bei RNA1) und etwa 200 nt (bei RNA2), die 3' NCR sind etwa 700 nt (bei RNA1) und 400 nt (bei RNA2) lang. Hierbei entsprechen die Längen der 3' NCR beider Stämme so-

wie der 5' NCR der RNA2 den bisher beschriebenen Längen der NCR bei Nepoviren. Die NCR der Nepoviren sind im Mittel 200 bis 700 nt lang (Überblick bei Mayo and Robertson, 1996). Lediglich die 5' NCR der RNA1 beider Stämme ist im Vergleich sehr kurz. Das erste Startcodon der RNA Stränge ist bei allen Strängen auch gleichzeitig das Startcodon des ORF. Bei einigen Nepoviren befindet sich vor dem Startcodon des ORF noch ein weiteres Startcodon. Dies ist unter anderem bei der RNA1 von GCMV (le Gall *et al.*, 1989), bei der RNA2 von GFLV (Serghini *et al.*, 1990) und der RNA1 und RNA2 des Tomato Ringspot Virus (TomRV) (Rott *et al.*, 1991 (b); Rott *et al.*, 1995) der Fall.

Die Sequenzvergleiche auf Nukleinsäureebene zeigten die höchsten Homologien in der 3' nicht kodierenden Region und zwar sowohl innerhalb als auch zwischen den zwei Stämmen von RpRSV. Diese hohe Homologie innerhalb eines Stammes wurde auch schon bei anderen Nepoviren gefunden. So sind die 3' NCR der RNA1 und RNA2 von GCMV (Brault *et al.*, 1989), ToRSV (Rott *et al.*, 1991 (a)), Tobacco Black Ringspot Virus (TBRV) (Greif *et al.*, 1988) und der Cherry leafroll Virus (CLRv) (Scott *et al.*, 1992) nahezu identisch. Die einzige Ausnahme stellt bislang GFLV dar. Hier hat die 3' NCR der RNA1 und RNA2 nur eine Übereinstimmung von 80 % (Ritzenthaler *et al.*, 1991). Auch die hohe Homologie in der 3' NCR zwischen den beiden Stämmen ist nicht weiter überraschend. So hat die 3' NCR der RNA2 von GFLV, TBRV und GCMV eine Identität von 60 % (Serghini *et al.*, 1990). Wenn drei unterschiedliche Nepoviren immer noch eine so verhältnismäßig hohe Homologie in einer Region haben, ist dies auch bei zwei Stämmen des selben Nepovirus zu erwarten.

In der Literatur sind auch Sequenzvergleiche der 5' NCR innerhalb eines Nepovirus beschrieben. Hierbei bewegen sich die Übereinstimmungen zwischen 68 % bei GCMV (Brault *et al.*, 1989) und nahezu 100 % bei TomRV (Rott *et al.*, 1991 (a)). Die Identität in diesem Bereich bei RpRSV-g beträgt 73,8 % und bei RpRSV-ch 62,7 %. Hiermit befindet sich RpRSV-g im beschriebenen Bereich, RpRSV-ch stellt jedoch mit 62,7 % einen neuen unteren Bereich an Identität dar.

Von den funktionellen Proteinen zeigt das Transportprotein die höchste Identität. Auch zwischen verschiedenen Nepoviren ist oft eine hohe Übereinstimmung im Transportprotein zu finden. So haben die Transportproteine von GFLV und TBRV (Devereux *et al.*, 1984) bzw. RpRSV-s und TomRV (Blok *et al.*, 1992) eine hohe Übereinstimmung. Auffällig ist hierbei, dass GFLV und TBRV von Nematoden der Gattung *Xiphinema* und RpRSV-s und TomRV von Nematoden der Gattung *Longidorus* übertragen werden. Es wird deshalb vermutet, dass das Transportprotein eine Rolle bei der Vektorspezifität spielt (Blok *et al.*, 1992; Mayo *et al.*, 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei einem Austausch des Transportproteins von GFLV durch das Transportprotein von ArMV immer noch ein Transport des Virus in der Pflanze stattfindet (Belin *et al.*, 1999). Dies scheint zu bestätigen, dass es sich bei dem Transportprotein um ein konserviertes Protein handelt.

Das Hüllprotein hat von allen funktionellen Proteinen die niedrigste Identität. Dies ist jedoch nicht weiter überraschend, da es sich um serologisch verschiedene Stämme handelt. Erstaunlich ist jedoch, dass die serologisch verwandten Viren GFLV und ArMV im Hüllprotein mit 69,7 % (Wetzel *et al.*, 2000) eine leicht höhere Homologie haben als die beiden RpRSV Stämme (68,7 %). Über das gesamte RNA2 Polyprotein kehrt sich die Homologie jedoch wieder um. Hier beträgt die Homologie zwischen GFLV und ArMV 72 % (Wetzel *et al.*, 2000) und zwischen RpRSV-g und RpRSV-ch 80,7 % (Daten nicht in den Ergebnissen dargestellt).

Die gesamte Homologie des Polyproteins der RNA1 von RpRSV-g und RpRSV-ch beträgt 91,6 %. Auch hier befinden sich viele konservierte Bereiche. Einzelne funktionelle Proteine der RNA1 wurden nicht verglichen, da noch keine Schnittstellen beschrieben sind. Aus diesem Grund wurde eine Schnittstellenanalyse durchgeführt. Bei dieser Analyse wurden potentielle Schnittstellen festgelegt. Alle in der Literatur beschriebenen Motifs sind auch auf den RNA1 Strängen von RpRSV-g und RpRSV-ch zu finden. Lediglich die beschriebenen konservierten Regionen weichen zum Teil erheblich ab. So zeigen die hypothetischen VPg's keine der bei Mayo and Robertson (1996) beschriebenen Übereinstimmungen. Dies wurde jedoch auch schon beim Peach Rosette Mosaic Nepovirus (PRMV) festgestellt (Lammers *et al.*, 1999). Ein weiteres Beispiel sind die konservierten Regionen des NTP. So ist zwar das DD Motif (L-Asp – L-Asp) zu finden, beim SGY (L-Ser – Gly – L-Tyr), welches etwa acht Aminosäuren vor dem DD liegen sollte, handelt es sich jedoch um eine SLY (L-Ser – L-Leu – L-Tyr). Das polare Glycin wurde also durch eine unpolare L-Leucin ausgetauscht. Um die konservierten Regionen zu ermitteln, verglichen Mayo and Robertson (1996) die RNA1 von vier Nepoviren miteinander. Bei einem umfangreicheren Vergleich würden sich möglicherweise einige der konservierten Regionen als nicht konserviert herausstellen.

Basierend auf den Daten der Sequenzvergleiche wurde ein „Inverted Repeat“ Konstrukt hergestellt. Das Konstrukt wurde mittels Agrobakterien vermittelter Transformation in Tabakpflanzen der Gattung *Nicotiana benthamiana* transformiert. Die regenerierten Tabakpflanzen wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des RpRSV-Konstruktes hin überprüft. Hierbei waren alle regenerierten Pflanzen PCR positiv. Die PPT- bzw. Kanamycinresistenz stellte somit einen guten Selektionsmarker dar. Die T1 Generation der transgenen Pflanzen wurde mittels Challenge Inokulation mit RpRSV-ch auf eine mögliche RpRSV-ch Resistenz hin getestet.

Einzelpflanzen von verschiedenen Linien zeigten eine verzögerte Infektion. Lediglich sieben Einzelpflanzen von drei verschiedenen Linien waren immun gegenüber RpRSV-ch. Alle infizierten Pflanzen, die sechs Wochen nach der Inokulation getestet wurden, waren weiterhin ELISA positiv. Die immunen Pflanzen waren zu diesem Zeitpunkt immer noch ELISA nega-

tiv. Die inokulierten nicht transgenen Tabakpflanzen waren bereits nach sechs Tagen alle ELISA positiv. Das Testsystem als solches ist somit sehr zuverlässig.

Bislang gibt es wenige Ansätze, bei denen versucht wurde, eine Resistenz gegenüber Nepoviren zu induzieren. Es gibt vier Ansätze einer Hüllprotein vermittelten Resistenz gegenüber Nepoviren. So wurden transgene Pflanzen hergestellt, die das Hüllprotein von ArMV (Bertioli *et al.*, 1992; Spielmann *et al.*, 2000), GCMV (Brault *et al.*, 1993) bzw. GFLV (Bardonnnet *et al.*, 1994) exprimierten. Weiterhin wurden auch Unterlagsreben der Sorte Richter 110 mit dem Hüllprotein des GCMV transformiert (Le Gall *et al.*, 1994). Ein Problem bei der Hüllprotein vermittelten Resistenz ist, dass der ELISA als Nachweis einer möglichen Virusinfektion nicht geeignet ist, da die Pflanzen kontinuierlich das Hüllprotein exprimieren und somit nicht zwischen transgenem und viralem Hüllprotein unterschieden werden kann. Die Resistenztestung der transgenen Pflanzen fiel zum Teil jedoch unterschiedlich aus. Die mit dem Hüllprotein von ArMV transformierten Pflanzen, zeigten entweder eine stark abgeschwächte (Bertioli *et al.*, 1992) oder eine verzögerte Infektion (Spielmann *et al.*, 2000). Bertioli *et al.* (1992) transformierten Tabakpflanzen der Gattung *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. Als Grad der Infektionsstärke wählten sie die Anzahl der Läsionen auf lokalen und systemischen Blättern. Sie konnten zeigen, dass die lokalen Blätter genauso viele, die systemischen Blätter jedoch nur $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{100}$ der Symptome im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zeigten. Spielmann *et al.* (2000) transformierten Tabakpflanzen der Gattung *N. benthamiana* mit dem Hüllproteingen von ArMV. Zur Testung einer möglichen ArMV Infektion wurden *C. quinoa* Pflanzen mit inokuliertem Blattmaterial rückinokuliert. Zwei Wochen nach der Inokulation waren fast alle transgenen Pflanzen nicht oder leicht infiziert. Im weiteren Verlauf der Infektion jedoch wurden alle Pflanzen nach und nach infiziert, bis nach sechs Wochen alle transgenen Pflanzen infiziert waren. Ursache für die unterschiedliche Effizienz in der Resistenz könnten die verschiedenen Tabakgattungen (*N. tabacum* und *N. benthamiana*) und die unterschiedlichen Nachweismethoden sein. Weiterhin haben Bertioli *et al.* (1992) bereits nach vier Wochen die Testung beendet, während bei Spielmann *et al.* (2000) die letzten Pflanzen erst nach sechs Wochen voll infiziert waren.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit dem GCMV (Brault *et al.*, 1993) sowie GFLV (Bardonnnet *et al.*, 1994) erzielt. Brault *et al.* (1993) transformierten *N. tabacum* mit dem Hüllproteingen des GCMV und Bardonnnet *et al.* (1994) transformierten *N. benthamiana* mit dem Hüllproteingen des GFLV. In beiden Fällen erfolgte der Infektionsnachweis über eine Northern Hybridisierung. Brault *et al.* (1993) erhielten nach der Testung einige nicht infizierte, sehr viele schwach infizierte und einige normal infizierte Pflanzen. Jedoch wurden die Pflanzen nur zwei Wochen nach der Inokulation getestet. Es kann somit keine Aussage gemacht werden, ob nach einer längeren Zeit mehrere Pflanzen infiziert gewesen wären. Bardonnnet *et al.* (1994) hingegen hatten nur Pflanzen, die eine verzögerte Reaktion zeigten. Kurz nach der Inokulation waren die Pflanzen nicht infiziert, je mehr Zeit jedoch zwischen der Ino-

kulation und der Testung verging, umso mehr Pflanzen waren auch infiziert, bis nach 60 Tagen alle getesteten transgenen Pflanzen infiziert waren.

Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit den eigenen Untersuchungen, scheint die verzögerte Infektion typisch für die Nepoviren zu sein. Jedoch zeigten bei den in der Literatur beschriebenen Versuchen deutlich mehr Pflanzen eine verzögerte Infektion als in den vorgestellten Ergebnissen. Ein Grund hierfür könnte die relativ hohe Viruskonzentration sein. Brault *et al.* (1993) konnten zeigen, dass bei niedrigeren Konzentration mehr Pflanzen Resistenz bzw. eine verzögerte Infektion zeigten als bei Verwendung höherer Konzentrationen. Auch Spielmann *et al.* (2000) bestimmten zunächst die optimale Viruskonzentration im Inokulum. In den eigenen Infektionsversuchen mit RpRSV-ch konnte gezeigt werden, dass auch bei Verdünnungen des Inokulums von 1:5 und 1:10 alle *N. benthamiana* Pflanzen infiziert waren (Ergebnisse nicht dargestellt). Es wäre somit sinnvoll, vor der Testung der transgenen Pflanzen mit dem RpRSV-Konstrukt die optimale Viruskonzentration zu bestimmen.

Über die Induktion des Gene silencing gegenüber Nepoviren wurden bislang noch keine Experimente durchgeführt. Ebenso gibt es noch keine Arbeiten, in denen versucht wurde, eine Nepovirusresistenz mit einem Inverted Repeat Konstrukt zu induzieren. Bei Pflanzenviren anderer Familien wurden Inverted Repeats jedoch schon erfolgreich eingesetzt (Waterhouse *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000; Tenllado and Díaz-Ruíz, 2001). Waterhouse *et al.* (1998) konnte durch die simultane Expression einer sense und antisense RNA des Potato Y Potyvirus (PVY) eine 5 – 10 fach höhere Resistenz als bei der Expression nur eines RNA Stranges erzielen. Etwa 25 % der getesteten Pflanzen waren immun gegenüber PVX, 15 % der getesteten Pflanzen zeigten eine verzögerte Infektion. Im Vergleich dazu zeigten in den vorgestellten Ergebnissen etwa 24 % der Pflanzen eine verzögerte Infektion jedoch nur 2,5 % der getesteten Pflanzen waren immun gegenüber RpRSV. Smith *et al.* (2000) testeten verschiedene Konstrukte, welche ebenfalls eine Resistenz gegenüber PVY induzieren sollten. Sie konnten zeigen, dass Intron gesplice Konstrukte bei nahezu 100 % aller getesteten Pflanzen eine Resistenz induzierten. Über eine auftretende verzögerte Infektion wurden keine Angaben gemacht. Tenllado and Díaz-Ruíz (2001) testeten schließlich *in vitro* ds RNA Transkripte auf ihre Fähigkeit, eine Resistenzinduktion gegenüber dem Pepper Mild Mosaic Virus (PMMoV), dem Tobacco Etch Virus (TEV) und dem Alfalfa Mosaic Virus (AMV) zu induzieren. Parallel hierzu überprüften sie auch *in vitro* Transkripte von sense und antisense RNA. Die *in vitro* Transkripte wurden zusammen mit dem jeweiligen Pflanzenvirus auf Blätter von Tabakpflanzen (*N. tabacum*) inokuliert. Auch hier erwies sich die ds RNA am effektivsten. So waren zunächst alle mit ds RNA inokulierten Pflanzen immun gegenüber PMMoV. Nach ein bis drei Wochen waren immer noch 82 % der Pflanzen nicht infiziert. 12 % der Pflanzen zeigten somit eine verzögerte Infektion.

In den vorliegenden Experimenten waren wenige Pflanzen immun gegenüber RpRSV. Ein Grund hierfür könnte die Länge der transgenen RpRSV – Sequenz sein. Tenllado and Díaz-Ruiz (2001) testeten in einer Versuchsreihe ds RNA Transkripte mit verschiedenen Längen (977 nt, 596 nt und 315 nt). Während alle Pflanzen, die mit den beiden langen Transkripten coinokuliert wurden, immun gegenüber PMMoV waren, zeigten alle Pflanzen, die mit dem 315 nt langen Transkript coinokuliert wurden, eine verzögerte Infektion. Die Länge der RpRSV – Sequenz beträgt 354 nt. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die geringe Zahl an immunen Pflanzen sein. Dem gegenüber stehen jedoch die Erkenntnisse von Thomas *et al.* (2001). Sie konnten zeigen, dass bereits eine Nukleotidsequenz mit einer Länge von 23 nt und einer 100 %igen Homologie zu dem korrespondierenden Gen ausreichend ist, ein Gene silencing zu induzieren. Thomas *et al.* (2001) silencten mittels eines viralen PVX Vektors, in dem die Sequenzen in den verschiedenen Längen eingebaut waren, das Green Fluoreszenz Protein (GFP) transgener Tabakpflanzen. Da es bislang noch keine Erkenntnisse über den Mechanismus des Gene silencing bei Nepoviren gibt, ist es möglich, dass die verzögerte Infektion typisch für die Interaktion von Nepoviren mit gesilenceten Pflanzen ist, zumal auch bei der CP – vermittelten Resistenz gegenüber Nepoviren verstärkt eine verzögerte Infektion auftrat (Bertioli *et al.*, 1992; Spielmann *et al.*, 2000).

Bei der Überprüfung der Kopienzahl des Transgens zeigte sich, dass die Linien, bei denen viele Pflanzen immun gegenüber RpRSV-ch waren oder eine verzögerte Infektion zeigten, eine niedrige Kopienzahl hatten (pBar-RpRSV1: mind. eine Kopie; pBar-RpRSV11: ca. zwei Kopien; pGJ-RpRSV1: ca. zwei Kopien). Die anderen Linien, bei denen weniger Pflanzen eine verzögerte Reaktion zeigten, hatten unterschiedliche Kopienzahlen, während die Linie, deren Einzelpflanzen alle normal anfällig waren, eine hohe Kopienanzahl (pGJ-RpRSV6: ca. 6 Kopien) hatten. Dies deutet darauf hin, dass eine niedrigere Kopienzahl bei Inverted Repeat Konstrukten für die Ausprägung von Virusresistenz wichtig ist. Dies stimmt auch mit den Erkenntnissen von Waterhouse *et al.* (1998) überein. Die meisten Pflanzen, die immun waren oder eine verzögerte Reaktion zeigten, hatten eine niedrigere Kopienzahl des Transgens. Die hier und bei Waterhouse *et al.* (1998) erworbenen Erkenntnisse hinsichtlich der Kopienzahl der Inverted Repeat Konstrukten in resistenten Pflanzen widersprechen den Ergebnissen, die Hobbs *et al.* (1993), Dehio *et al.* (1994), Ingelbrecht *et al.* (1994) und Stam *et al.* (1997) in ihren Versuchen erhielten. Sie stellten fest, dass bei Konstrukten, die eine einzelsträngige RNA transkribieren (entweder sense oder antisense), eine hohe Kopienzahl auch gleichzeitig eine hohe Resistenz mit sich brachten. Es scheint also, dass nur bei Konstrukten mit einzelsträngiger RNA eine hohe Kopienzahl für die Resistenz von Bedeutung ist, während dies bei Inverted Repeat Konstrukten nicht der Fall ist.

Die Interpretation der Northern Hybridisierungen ist schwierig, da ein schwaches Signal nicht gleich eine geringe Expression bedeuten muss, sondern auch ein Zeichen eines starken Gene silencing und somit einer starken Degradierung der transgenen RNA sein kann. Das Signal

des RpRSV – Transkripts der immunen Pflanzen ist kurz vor der Inokulation schwach, eine Woche nach der Transkription etwas stärker und zwei Wochen nach der Inokulation wieder schwächer. Zu Beginn liegen evtl. eine starke Transkription aber auch ein starkes Gene silencing vor. Nach der Inokulation tritt eine Art Konkurrenzsituation zwischen der genomischen und viralen RNA Sequenz ein, was zur Folge hat, dass zunächst etwas weniger genomische RpRSV – RNA abgebaut wird. Da jedoch eine starke Transkription vorliegt, ist ein stärkeres Signal zu erkennen. Nachdem die virale RNA komplett degradiert ist wird wieder verstärkt die genomische RpRSV – RNA abgebaut, wodurch auch das Northern-Signal wieder abnimmt. Bei der anfälligen Pflanze verhält es sich vermutlich etwas anders. Das schwache Signal vor der Inokulation deutet hier eher auf eine schwache Transkription des Transgens hin. Die Zunahme eine Woche nach der Inokulation ist nur gering im Vergleich zu der immunen Pflanze; dies könnte die schwache Transkription bestätigen. Das Signal des Transgens nach zwei Wochen lässt sich leider aufgrund des starken Signals des Virus nicht bestimmen. Aufgrund dieser Vermutungen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Stärke des Gene silencing mit der Expressionsstärke korreliert, d. h. eine starke Expression des Transgens bewirkt ein starkes Gene silencing, was wiederum eine hohe Resistenz gegenüber dem Virus bewirkt.

Eine indirekte Bestätigung dieser These ist bei Tenllado and Díaz-Ruíz (2001) zu finden. Neben den verschiedenen Längen der ds RNA – Transkripte testeten sie auch verschiedene Konzentrationen an ds RNA. Hierbei stellten sie fest, dass mit niedriger Konzentration an ds RNA die Anfälligkeit der getesteten Pflanzen zunahm. Unter der Voraussetzung, dass eine hohe Konzentration an ds RNA Transkripten einer starken Transkription der transgenen viralen mRNA entspricht, scheint diese Dosis / Wirkungsbeziehung den vermuteten Zusammenhang zwischen Transkriptionsstärke und Effizienz des Gene (RNA) silencing (und damit verbundener Virusresistenz) zu bestätigen.

In der dargestellten Arbeit wurde die T1 Generation der transgenen Pflanzen auf ihre Resistenz gegenüber RpRSV-ch getestet. Bardonnet *et al.* (1994) und Spielmann *et al.* (2000) verwendeten ebenfalls die T1 Generation zur Überprüfung der Resistenz gegenüber Nepoviren, während Bertioli *et al.*, 1992 und Brault *et al.*, 1993 die T0 Generation testeten. In allen Fällen traten bei der Testung ähnliche Reaktionen der Pflanzen gegenüber dem Virus auf. Vermutlich macht es somit keinen Unterschied, ob bei der Testung die transformierten Pflanzen oder die erste generative Generation der transgenen Pflanzen getestet wird.

Zu einer genaueren molekularbiologischen Erforschung von Nepoviren, insbesondere RpRSV, wurden infektiöse Klone von RpRSV-g hergestellt. Die Klone standen unter der Kontrolle eines doppelten 35 S Promotors. Die Infektionsexperimente verliefen erfolgreich, jedoch infizierte der Klon selbst nur die inokulierten Blätter von *C. quinoa*. Eine Rückinfektion mit infizierten Blättern ergab jedoch eine normale, wenn auch leicht abgeschwächte Infek-

tion mit RpRSV-g. Somit ist der RpRSV-g Klon weltweit der zweite infektiöse Klon eines Nepovirus und der erste unter der Kontrolle eines 35 S Promotors.

Beim ersten infektiösen Klon eines Nepovirus handelt es sich um einen Klon des GFLV (Viry *et al.*, 1993). Der GFLV Klon steht unter der Kontrolle eines T7 Promotors zur *in vitro* Transkription von RNA. Die RNA Transkripte infizierten Protoplasten von *C. quinoa* und auch komplette *C. quinoa* Pflanzen. Im Gegensatz zu den RpRSV-g Klonen verlief die Infektion mit den GFLV Transkripten systemisch, wenn auch stark abgeschwächt. Eine Rückinfektion verlief wie eine Infektion mit dem nativen Virus. Es scheint also, dass der T7 Promotor besser zur Herstellung von infektiösen Nepovirenklonen geeignet ist als der 35 S Promotor. Es müssen jedoch noch mehr und intensivere Experimente mit dem RpRSV-g Klon durchgeführt werden, um diese Aussage zu bestätigen.

Zunächst muss jedoch noch Arbeit in Infektionsversuche investiert werden. Eventuell ist die Infektion des Klons bei einer bestimmten RNA1 und RNA2 Konzentration systemisch. Außerdem müsste die Inokulationsmethode verbessert werden, da die inokulierten Blätter relativ schnell abgestorben sind und somit das infektiöse Blattmaterial für die Rückinokulation sehr schnell verloren ging. Eine Möglichkeit zur Steigerung der Infektiösität wäre der Partikelbeschuss von *C. quinoa* Blattscheiben mit den full length Klonen. So gelang es, mittels Partikelbeschuss die Infektiösität eines 35S – ds cDNA Klons des Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) von nur 19 % bei der mechanischen Inokulation auf 100 % zu erhöhen (Gal-On *et al.*, 1995). Ein 35S – ds cDNA Klon des Tabak Mosaik Virus (TMV) war erst nach einem Partikelbeschuss von Blattscheiben und einer anschließenden Rückinfektion des Saftes der infizierten Blattscheiben voll infektiös. Wurde der Klon direkt auf die Pflanzen inokuliert, war er nicht infektiös (Dagless *et al.*, 1997). Eventuell würde ein solcher Partikelbeschuss auch die Infektiösität des RpRSV Klons erhöhen. Weiterhin wäre der Beschuss für die Blattscheiben wesentlich schonender als das direkte Abreiben. Es würden weniger inokulierte Blätter absterben, was die Ausbeute an infiziertem Material für die Rückinokulation erheblich erhöhen würde.

Ein infektiöser Klon ist ein sehr gutes Werkzeug zur Erforschung des Virus. RpRSV-g und RpRSV-ch zeigen unterschiedliche Symptome und verschiedene Verläufe der Infektion. Mit einem infektiösen Klon ist es möglich, die Gründe für ein solch unterschiedliches Verhalten zu erforschen. Durch einen gezielten Austausch der funktionellen Proteine von dem einen Stamm durch das entsprechende Protein des anderen Stammes kann herausgefunden werden, welches Protein maßgeblich an der Infektiösität eines Virus beteiligt ist. Dass ein solcher Austausch möglich ist, zeigte ein Experiment, bei dem *C. quinoa* Pflanzen mit der RNA1 von RpRSV-g und der RNA2 von RpRSV-ch inokuliert wurden (nicht in den Ergebnissen dargestellt). Hierbei war das inokulierte Blatt einer Pflanze ELISA positiv.

Mit dem infektiösen Klon lassen sich die vermuteten Proteaseschnittstellen auf dem Polyprotein der RNA1 überprüfen. Hierbei gibt es zwei Möglichkeiten. Durch gezielte Mutationen der Nukleinsäuresequenz werden die vermuteten Schnittstellen geändert. Wird bei einer solchen Mutation eine Schnittstelle verändert, ist der Klon nicht mehr infektiös. Eine weitere Möglichkeit wäre eine *in vitro* Translation in einem zellfreien System, z. B. dem Weizenkeimling System nach Godefrey-Colburn *et al.* (1985). Bei der *in vitro* Translation werden RNA-Transkripte direkt in das Protein translatiert. Hierfür müssten allerdings die full length Klone zunächst hinter einen T7 Promotor zur *in vitro* Transkription umkloniert werden. Nach der *in vitro* Transkription der RNA1 ließe sich damit die *in vitro* Translation durchführen. Das Polyprotein der RNA1 würde durch die Protease in die funktionellen Proteine gespalten werden. Nach einer Isolierung und anschließenden Sequenzierung der funktionellen Proteine würden die C- und N-terminalen Aminosäuren die Schnittstellen ergeben.

Mit dem infektiösen GFLV Klon von Viry *et al.* (1993) konnte unter anderem die Funktion des 2A Proteins (Gaire *et al.*, 1999) sowie die Bedeutung bestimmter Regionen des Transport- und Hüllproteins für den Virustransport geklärt werden (Belin *et al.*, 1999). Gaire *et al.* (1999) koppelten das 2A Protein mit einem Green Fluoreszenz Protein (GFP) (Reichel *et al.*, 1996). Mit dem erhaltenen Fusionsprotein ließ sich nun die genaue Region, in der das 2A Protein aktiv ist, identifizieren. Hierbei konnten Rückschlüsse auf die genaue Funktion des 2A Proteins geschlossen werden. Belin *et al.* (1999) tauschten das Transport- und das Hüllprotein von GFLV mit den jeweiligen Proteinen von ArMV aus. Hierbei zeigte sich, dass prinzipiell ein Transport von GFLV mit den ArMV Transportproteinen möglich ist. Für einen systemischen Transport müssen jedoch die neun Aminosäuren am C-terminalen Ende des Transportproteins sowie das Hüllprotein vom GFLV vorhanden sein. Anderenfalls findet nur eine lokale Infektion statt.

Die Funktion des 1A Proteins (N-Terminales Protein der RNA1) ist noch nicht geklärt (Mayo and Robertson, 1996). Vermutlich ist es ein Protease Cofaktor (Vos *et al.*, 1988; Ritzenthaler *et al.*, 1991; Rott *et al.*, 1995), doch konnte diese Funktion noch nicht genau belegt werden. Mit dem infektiösen RpRSV Klon könnte die Funktion des 1A Proteins geklärt werden.

Manche Pflanzenviren verfügen über einen Reparaturmechanismus, der Änderungen oder Schäden im viralen Genom, insbesondere in der 3' NCR repariert (Nagy *et al.*, 1997). Ein solcher Mechanismus wurde bislang bei Tombusviren (Dalmay *et al.*, 1993) und Carmoviren (Nagy *et al.*, 1997) gefunden. Ob Nepoviren über einen solchen Mechanismus verfügen ist nicht bekannt. Mit dem infektiösen RpRSV Klon ließe sich ein solcher Mechanismus nachweisen. Die 3' NCR des Klons muss gezielt mutiert werden und mit dem veränderten Klon müssen Pflanzen infiziert werden. Von ELISA positiven Blättern müsste die RNA isoliert werden und mittels RT-PCR die 3' NCR amplifiziert und anschließend sequenziert werden.

Wäre die ursprüngliche Wildtyp Sequenz wieder hergestellt, würden auch Nepoviren über einen solchen Reparaturmechanismus verfügen.

Eine weitere interessante Nutzung des infektiösen RpRSV Klons ist die Anwendung des Klons als Proteinexpressionsvektor (Scholthof, 1999). Bislang wurden in verschiedenen Ansätzen nicht virale Proteine von infektiösen Klonen exprimiert (Donson *et al.*, 1991; Dolja *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1996; Casper and Holt, 1996; Verver *et al.*, 1998; Gaire *et al.*, 1999). In den meisten Fällen wurde mit dem eingesetzten Protein die genaue Funktion bzw. Wirkungsweise eines funktionellen Proteins identifiziert. Wirtschaftlich interessant wird die Möglichkeit der Proteinexpression, wenn damit ökonomisch bedeutende Proteine exprimiert werden (Fischer *et al.*, 2000; Fischer and Emans, 2000). Eine solche Nutzung eines infektiösen Klons wird als „Molecular Farming“ bezeichnet (Fischer *et al.*, 1999). Hierbei hat die Nutzung des Klons viele Vorteile gegenüber dem Herstellen transgener Pflanzen. Der Hauptvorteil ist vor allem die Zeitersparnis. Es müssen keine Pflanzen transformiert und regeneriert werden. Weiterhin sind keine Positionseffekte und somaklonale Variationen zu erwarten (Walden and Schell, 1990).

Der RpRSV Klon könnte auch für das Molecular Farming verwendet werden. Denkbar wäre das Schaffen eines künstlichen Satelliten (einer RNA3) als Proteinvektor. Gaire *et al.* 1999 stellen bei ihrer Erforschung des 2A Proteins einen Klon her, der die nicht kodierenden Regionen der RNA2, das 2A Protein sowie das GFP, enthielt. Von diesem Klon gab es zwei Variationen: 2A und GFP als Fusionsprotein sowie 2A und GFP mit erhaltener Schnittstelle. In beiden Fällen konnte die grüne Fluoreszenz des GFP nachgewiesen werden. Gaire *et al.* (1999) fanden heraus, dass das 2A Protein in die Replikation der RNA2 involviert ist. Hierbei müssen die nicht kodierenden Regionen, das 2A Protein und ein Protein nach dem 2A vorhanden sein. Wird dies ausgenutzt, sollte es möglich sein, einen künstlichen RpRSV-g Satelliten zur Expression von Proteinen zu schaffen (Abb. 37).

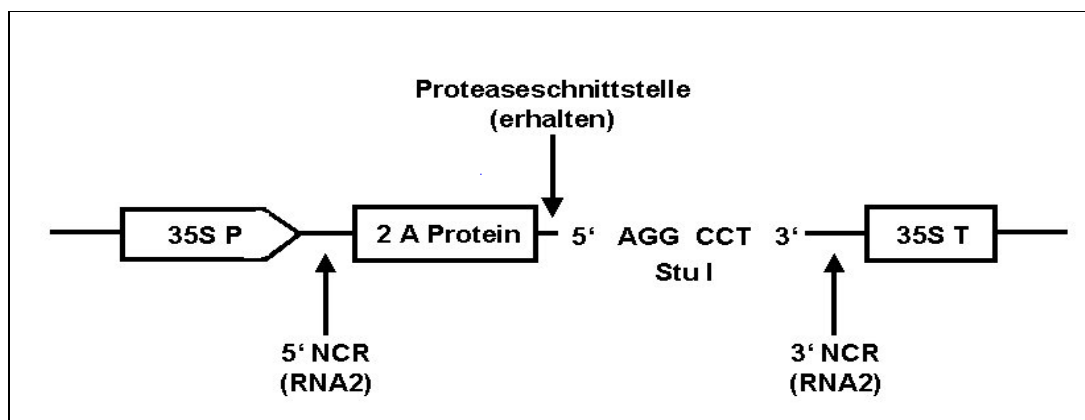


Abb. 37: Darstellung des möglichen künstlichen RpRSV-g Klons zur Expression von Proteinen

In die *Stu* I Schnittstelle kann die Nukleinsäuresequenz eines beliebigen Proteins kloniert werden. Am Ende der Sequenz muss ein Stopcodon sein. *C. quinoa* Blattscheiben werden mit dem RNA1 - und dem RNA2 – Klon sowie dem künstlichen Proteinexpressionsklon inokulieren. Der RNA Strang müsste nach Gaire et al. (1999) repliziert werden. Da Nepoviren immer auch sehr viele leere Kapsidhüllen produzieren (Mayo and Robertson, 1996), könnte der Strang der künstlichen RNA3 in eine solche Kapsidhülle verpackt werden. Sollte dies der Fall sein, wäre theoretisch eine unbegrenzte Anzahl an Rückinokulationen möglich. Theoretisch wäre auch eine Inokulation des Proteinexpressionsklons mit dem nativen RpRSV-g Virus möglich. Somit wäre ein künstlicher Satellit geschaffen, der sich sehr gut für eine Proteinexpression einsetzen ließe.

Bei den mit dem Klon als Expressionsvektor infizierten Pflanzen handelt es sich um gentechnisch veränderte Organismen (GVO), da der Klon gentechnisch verändert ist. Somit würden auch diese Pflanzen von der öffentlichen Diskussion über GMO erfasst werden. Die Pflanzen könnten jedoch als reine Expressionsorganismen genutzt werden, aus denen das Protein (z. B. ein Antikörper) extrahiert wird, welches dann für verschiedene Zwecke genutzt werden könnte. Solche gentechnisch erzeugten Proteine sind von der Gesellschaft bereits akzeptiert. Das von *E. coli* exprimierte Insulin ist hierfür das beste Beispiel.

Die Konstrukte zur Induktion einer RpRSV – Resistenz wurden zwischenzeitlich in Unterlagssorten transformiert und die ersten transgenen Reben werden regeneriert (nicht in Ergebnissen dargestellt). Da nur die Unterlagssorte transgen ist und nicht das Edelreis bleiben die Sorten und damit die sortentypischen Eigenschaften erhalten. Nicht zuletzt wird jedoch die Akzeptanz solcher Pflanzen durch die Winzerschaft und die Weinkonsumenten einen entscheidenden Einfluss darauf haben, ob das technisch Machbare auch züchterisch umgesetzt werden wird. Angesichts der immer noch ablehnenden Haltung vieler Weintrinker gegenüber der Gentechnik muss die Wissenschaft in Zukunft verstärkte Aufklärungsarbeit über die Chancen und Risiken gentechnischer Verfahren im Weinbau und in der Rebenzüchtung leisten, um zu einer objektiven Diskussion der Thematik in der Öffentlichkeit beizutragen.

5. Zusammenfassung

Das Himbeer Ringfleckenvirus (RpRSV) ist eines der Nepoviren, welches in den Komplex der Reisigkrankheit bei Reben involviert ist. Die anderen Nepoviren in diesem Krankheitskomplex sind das Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) und das Arabis Mosaic Virus (ArMV). Die Reisigkrankheit an Reben ist die bedeutendste virale Erkrankung an Weinreben in deutschen Weinanbaugebieten. In Deutschland gibt es zwei serologisch verschiedene Stämme von RpRSV: den „grapevine“ – Stamm (RpRSV-g) und den bedeutenderen „cherry“ – Stamm (RpRSV-ch).

Beide in Deutschland vorkommenden Stämme von RpRSV wurden sequenziert. Weiterhin wurden mögliche Proteaseschnittstellen auf den Polyproteinen der RNA1 festgelegt. Basierend auf Sequenzvergleichen wurde eine Sequenz der 3' NCR von RpRSV-ch für den Aufbau eines Inverted Repeat Konstruktes ausgewählt. Das Konstrukt sollte ein Gene Silencing der Virusgene induzieren. Mittels *Agrobakterien* vermittelter Transformation wurde es in Tabakpflanzen der Gattung *Nicotiana benthamiana* transformiert. Die T2 Generationen der regenerierten transgenen Tabaklinien wurden mittels „Challenge Inokulation“ mit RpRSV-ch auf ihre Resistenz gegenüber RpRSV-ch getestet. Hierbei zeigten Einzelpflanzen verschiedener Linien eine verzögerte Infektion. Nur drei Einzelpflanzen waren resistent gegenüber RpRSV-ch. Mit ausgewählten Einzelpflanzen (resistenten und solchen, die eine verzögerte Infektion zeigten) wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um den Mechanismus des Gene Silencing genauer zu erforschen.

Zur genaueren Erforschung von RpRSV wurden full length Klone der RNA1 und RNA2 von RpRSV-g hergestellt. Die full length Klone stehen unter der Kontrolle eines 35 S Promotors. Mit den full length Klonen wurden Pflanzen der Gattung *Chenopodium quinoa* inokuliert. Zwei Wochen nach der Inokulation waren keine RpRSV-g Symptome sichtbar. Die inokulierten Blätter einiger *C. quinoa* Pflanzen waren ELISA positiv. Sämtliche systemischen Blätter waren ELISA negativ. In einer weiteren Versuchsreihe wurden *C. quinoa* Pflanzen mit einem Homogenat aus den ELISA positiven Blättern rückinokuliert. Hierbei kam es zu einer systemischen, dem nativen Virus entsprechenden RpRSV-g Infektion. Hiermit handelt es sich um die zweiten infektiösen full length Klone eines Nepovirus und die ersten infektiösen Nepovirus Klone unter der Kontrolle eines 35 S Promotors.

6. Literatur

- Abel P. P., Nelson R. S., De B., Hofman N., Rogers S. G., Fraley R. T., Beachy R. N. (1986) ; Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene; *Science* 232: 738 – 743
- Anandalaskshimi R., Pruss G. J., Ge X., Marathe ., Mallory A. C., Smith T. H., Vance V. B. (1998); A viral suppressor of gene silencing in plants; *Proc Natl Acad Sci USA* 55: 13.079 – 13.084
- Anderson J. M., Palukaitis P., Zaitlin M. (1992); A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8.759 – 8.763
- Angenent G. C., van den Ouweland J. M. W., Bol J. F. (1990); Susceptibility to virus infection of transgenic tobacco plants expressing structural and nonstructural genes of tobacco rattle virus; *Virology* 175: 191 – 198
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struh, K. (1994); *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc., New York, USA.
- Bahramian M. B. and Zarbl H. (1999); Transcriptional and posttranscriptional silencing of rodent alpha 1(I) collagen by a homologous transcriptionally self-silenced transgene; *Mol. Cell Biol.* 19: 274 - 283
- Bardonnnet N., Hans F., Serghim M. A., Pinck L (1994); Protection against virus infection in tobacco plants expressing the coat protein of grapevine fanleaf nepovirus; *Plant Cell. Rep.* 13: 357 – 360
- Baulcombe D. (1996); Mechanisms of pathogen-derives resistance to viruse in transgenic plants; *Plant Cell* 8: 1.833 – 1.844
- Baulcombe D. (1996); RNA as a target and an inhibitor of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants; *Plant Mol. Biol.* 32: 79 – 8
- Baulcombe D. (1999); Viruses and gene silencing in plants; *Arch Virol* 15: 189 – 200
- Baulcombe D. (2002); RNA Silencing; *Curr. Biol.* 12 (3): 82 – 84
- Beck D. L., Van Dolleweerd C. J., Lough T. J., Balmori E., Voot D. M., Andersen M. T, O'Brien I. E. W., Forster R. L. S. (1994); Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10.310 – 10.314
- Belin C., Schmitt C., Gaire F., Walter B., Demangeat G., Pinck L. (1999); The nine C-terminal residues of the grapevine fanleaf nepovirus movement protein are critical for systemic virus spread; *J. Gen. Virol.* 80: 1.347 – 1.356

- Bercks R. (1968); Über den Nachweis des Himbeerringflecken Virus (raspberry ringspot virus) in Reben; *Phytopath. Z.* 65: 169 – 173
- Bertioli D. J., Cooper J. I., Edwards M. L., Hawes W. S. (1992); Arabis mosaic nepovirus coat protein in transgenic tobacco lessens disease severity and virus replication; *Ann. Appl. Biol.* 21: 47 – 54
- Blok V. C., Wardell J., Jolly C. A., Manoukian A., Robinson D. J., Edwards M. L., Mayo M. A. (1993); The nucleotide sequence of RNA-2 of raspberry ringspot nepovirus; *J. gen. Virol.* 73: 2.189 – 2.194
- Bouquet A. (1981); Resistance to the GFLV in Muscardine grapes by *Xiphinema index* in *Vitis rotundifolia*; *Plant Dis.* 65: 791 – 793
- Braun C. J., Hemenway C.L. (1992); Expression of Amino-Terminal Portions or Full-Length Viral Replicase Genes in Transgenic Plants Confers Resistance to Potato Virus X Infection; *Plant Cell* 4(6): 735 – 744
- Brault C., Hibrand L., Candresse T., Le Gall O., Dunez J. (1989); Nucleotide sequence and genetic organization of Hungarian grapevine chrome mosaic nepovirus RNA2; *Nucleic Acid Res.* 17: 7.809
- Brault C., Candresse T., Le Gall O., Delbos R. P., Lanneau M., Dunez J. (1993); Genetically engineered resistance against grapevine chrome mosaic virus; *Plant Mol. Biol.* 21: 89 – 97
- Brigneti G., Voinet O., Li W. X., Ji L. H., Ding S. W., Baulcombe D. C. (1998); Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*; *EMBO* 4: 6.739 – 6.746
- Brückbauer H. und Rüdell M. (1981); Untersuchung über das Himbeerringflecken Virus (RRV) in hiesigen Weinbergen; *Wein-Wiss* 36: 413 – 430
- Cadman C. H. (1960); Studies on the relationship between soil-borne viruses of the ringspot type occurring in Britain and Continental Europe; *Virology* 11: 653 – 664
- Carrier K., Hans F., Sanfacon H. (1999); Mutagenesis of amino acids at two tomato ringspot nepovirus cleavage sites: effect on proteolytic processing in cis and trans by the 3C-like-protease; *Virology* 258: 161 – 175
- Casper S. J., Holt C. A. (1996); Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from a tobacco mosaic virus-based vector; *Gene* 173: 69 – 73
- Cogoni C. and Macino G (1999); Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme; *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 657 – 662
- Covey S. N., Al-Kaff N. S., Langara A., Turner D. S. (1997); Plants combat infection by gene silencing; *Nature* 385: 781 – 782
- Cuozzo M., O'Connell K. M., Kaniewski W. K., Fang R-X., Chua N-H., Tumer N. E. (1998); Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA; *Bio/Technology* 6: 549 – 557

- Dagless E. M., Shintaku M. H., Nelson R. S., Foster G. D. (1997); A CaMV 35S driven cDNA clone of tobacco mosaic virus can infect host plant tissue despite being uninfectious when manually inoculated onto leaves; *Arch. Virol.* 142: 183 – 191
- Dalmay T., Russo M., Burgyán J. (1993); Repair *in Vivo* of altered 3' terminus of cymbidium rigspot tombosvirus RNA; *Virology* 192: 551 – 555
- Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Angell S., Baulcombe D. C. (2000); An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by transgene but not by a virus; *Cell* 101: 543 – 553
- Dehoy C., Schell J. (1994); Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10.502 – 10.506
- Devereux J., Haeberli P., Smithies O. (1984); A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX; *Nucleic Acid Res.* 12: 387
- Dolja V. V., McBride H. J., Carrington J. C. (1992); Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of beta-glucuronidase into the viral polyprotein; *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (21): 10.208 – 10.212
- Domier L. L., Franklin K. M., Hunt A. G., Rhoads R. E., Shaw J. G. (1989); Infectious *in vitro* transcripts from cloned cDNA of a potyvirus tobacco vein mottle virus; *Proc. Nat. Acc. Sci. USA* 86: 3.509 – 3.513
- Donson J., Kearney C. M., Hilf M. E., Dawson W. O. (1991); Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector; *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (16): 7.204 – 7.208
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991); A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis; *Nucleic Acid Res.* 19 (6): 1.349
- Elmayan T. and Vaucheret H. (1996); Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally; *Plant J.* 9: 787 – 797
- English J. J. and Baulcombe D. C. (1997); The influence of small changes in transgene transcription on homology-dependent virus resistance and gene silencing; *Plant J.* 12: 1.311 – 1.318
- Fischer R., Vaquero-Martin C., Sack M., Drossard J., Emans N., Commandeur U. (1999); Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants; *Biotechnol Appl Biochem* 30 (Pt 2): 113 – 116
- Fischer R., Emans N. (2000); Molecular farming of pharmaceutical proteins; *Transgenic Res* 9(4-5): 279 – 299
- Fischer R., Hoffmann K., Schillberg S., Emans N. (2000); Antibody production by molecular farming in plants; *J Biol Regul Homeost Agents* 14 (2):83 – 92
- Fire A. (1999); RNA-triggered gene silencing; *Trends Genet.* 15: 358 – 363
- Fitchen J. H. and Beachy R. N (1993); Genetically-engineered protection against viruses in transgenic plants; *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 739 – 763

- Gaire F., Schmitt C., Stussi-Garaud C., Pinck L., Ritzenthaler C. (1999); Protein 2A of Grapevine Fanleaf Nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site; *Virology* 264: 25 – 36
- Gal-On A., Meiri E., Huet H., Hua W. J., Raccach B., Gaba V. (1995); Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned DNA of zucchini yellow mosaic potyvirus; *J. Gen. Virol.* 76: 3.223 – 3.227
- Godefroy-Colburn T., Thivent C., Pinck L. (1985); Translational discrimination between the four RNAs of alfalfa mosaic virus; *Euro. J. Biochem.* 147: 541 – 548
- Goldbach R., Martelli G. P., Milne R. G. (1995); Family Comoviridae, in: *Virus Taxonomy – Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. artelli, M. A. Mayo and M. D. Summers, eds.), pp 341 – 347, Springer-Verlag, Vienn (also in *Arch. Virol. Suppl.* 10)
- Golemboski D. B., Lomonosoff G. P., Zaitlin N. (1990); Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistano to the virus; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6.311 – 6.315
- Greif C., Hemmer O., Fritsch C. (1988); Nucleotide sequence of tomato black ring virus RNA1; *J. Gen. Virol.* 69: 1.517
- Grierson D., Fry R. G., Hamilton A. J., Smith C. J. S., Watson C. F. (1991); Does co-suppression of sense genes in transgenic plant involve antisense RNA?; *Trends Biotechnol* 9: 122 – 123
- Gubler U., Hofmann B. J. (1983); A simple and very efficient method of generating cDNA libraries; *Gene* 25: 263 – 269
- Hamilton A. J., Baulcombe D. C. (1999); A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants; *Science* 286: 950 – 952
- Hobbs S. L. A., Warkentin T. D., DeLong C. M. O. (1993); Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression; *Plant Mol. Biol.* 15: 851 – 864
- Hood E. E., Helmer G. L., Frley R. T., Chilton R. D. (1986); The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of the T-DNA; *J. Bacteriol.* 168: 1.291 – 1.301
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985): A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231
- Heut H., Mahendra S, Wang J., Sivamani E., Ong C. A., Chen L., de Kchko A., Beachy R. N., Fauquet C. (1999); Near immunity to rice tungro spherical virus achieved in rice by a replicase mediated resistance strategy; *Phytopatology* 89: 1.022 – 1.027
- Hillebrand W. und Eichorn K. W. (1988); *Rebschutztaschenbuch*; 8. Auflage; Fachverlag Dr. Fraund GmbH, Wiesbaden

- Hobbs S. L. A., Kpodar P., DeLong C. M. O. (1990); The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants; *Plant Mol. Biol.* 15: 851 – 864
- Hobbs S. L. A., Warkentin T. D., DeLong C. M. O. (1993); Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression; *Plant Mol. Biol.* 21: 17 – 26
- Ingelbrecht, I., Van Houdt, H., Van Montagu, M. & Depicker, A. (1994); Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10.502–10.506
- Ingelbrecht I. L., Irvine J. E., Mirkov T. E. (1999); Posttranscriptional gen silencing in transgenic sugarcane: dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome; *Plant Physiol* 119: 1.187 – 1.188
- Jensen S., Gassama M. P., Heidmann T. (1999); Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing; *Nat. Genet.* 21: 209 – 212
- Johansen E. I. (1996); Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription in vivo; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12.400 – 12.405
- Jones A. L., Johansen I. E., Bean S. J., Bach I., Maule A. J. (1999); Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene; *J Gen Virol* 1998 79 (12): 3.129 – 3.137
- Jones A. T., Brown D. J. F., McGrath W J., Rüdel M., Altmayer B. (1994); Properties of an unusual isolate of raspberry ringspot virus from grapevine in Germany and evidence for its possible transmission by *Paralongidorus maximus*; *Ann. Appl. Biol.* 124: 283 – 300
- Kasschau K. D., Carrington J. C. (1998); A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing; *Cell* 95: 461 – 470
- Ketting R. F., Haverkamp T. H., van Luenen H. G., Plasterk R. H (1999); Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RnaseD; *Cell* 99: 133 – 141
- Kjemtrup S., Sampson K. S., Peele C. G., Nguyen L. V., Conkling M. A., Thompson W. F., Robertson D. (1998); Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus; *Plant J* 14: 91 – 100
- Kumagai M. H., Donson J., Della-Cioppa G., Harvey D., Hanley K., Grill L. K. (1995); Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA; *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1.679 – 1.683
- Lammers A. H., Allison R. F., Ramsdell D. C. (1999); Cloning and sequencing of peach rosette mosaic virus RNA1; *Virus Res.* 65: 57 – 73
- Le Gall O., Candresse T. Brault V., Dunez J. (1989); Nucleotide sequence of Hungarian grapevine chrome mosaic nepovirus RNA2; *Nucleic Acid Res.* 17: 7.809
- Le Gall O., Candresse T. Brault V., Dunez J. (1989); Nucleotide sequence of Hungarian grapevine chrome mosaic nepovirus RNA1; *Nucleic Acid Res.* 17: 7.795

- Le Gall O., Torregrosa L., Danglot Y., Candresse T., Bouquet A. (1994); *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV); *Plant Science* 102: 161 – 170
- Lin N. S., Lee Y. S., Lin B. Y., Lee C. W., Hsu Y. H. (1996); The open reading frame of bamboo mosaic potexvirus satellite RNA is not essential for its replication and can be replaced with a bacterial gene; *Proc Natl Acad Sci USA* 93(7): 3.138 – 3.142
- Lindho J. A., Silva-Rosales L., Proebsting W. M., Dougherty W. G. (1993); Induction of highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance; *Plant Cell* 5: 1.749 – 1.759
- Longstaff M., Brigneti G., Boccard F., Chapman N. S., Baulcomb D. C. (1993); Extreme resistance to potatoe virus X infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase; *EMBO J.* 12: 1.749 – 1.759
- Maiss E., Timpe U., Briske-Rode A., Lesemann D. E., Casper R. (1992); Infectious in vivo transcript of a plum pox potyvirus full-length cDNA clone containing the cauliflower mosaic virus 35S RNA promotor; *J. Gen. Virol.* 73: 709 – 713
- Martelli G. H. (1978); Nematode-borne viruses of grapevine, their epidemiology and control; *Nematologia Mediterranea* 6: 1 – 27
- Mayo M. A., Harrison B. D., Murant F. A., Barker H. (1973); Cross-linking of RNA induces by ultraviolet irradiation of particles of raspberry ringspot virus; *J. Gen. Virol.* 19: 155
- Mayo M. A. and Martelli G. P (1993); New families and genera of plant viruses; *Arch. Virol.* 133: 175
- Mayo M. A., Robertson W. M., Legorboru F. J., Brierly K. M. (1994); Molecular approaches to an understanding of the transmission of plant viruses by nematodes; in: *Advances in Molecular Nematology* (F. Lamberti, C. De Giorgi, D. McK. Bird, eds.) pp 277 – 293, Plenum Press, New York
- Mayo M. A. and Robertson D. J. (1996); Nepoviruses: Molecular Biology and Replication; *The Plant Viruses, Volume 5: Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genoms*, edited by B. D. Harrison and A. F. Murant. Plenum Press, New York, 1996
- Moreno M., Bernal JJ, Jimenez I, Rodriguez-Cerezo E. (1998); Resistance in plants transformed with the P1 or P3 gene of tobacco vein mottling potyvirus; *J Gen Virol* 79 (11): 2.819 – 2.827
- Mueller E., Gilbert J. E., Daveport G., Brigneti G., Baulcombe D. C. (1995); Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing; *Plant J* 7: 1.001 – 1.013
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962); A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures; *Physiologia Plantarum* 15: 473 – 497
- Nagy P. D., Carpenter C. D., Simon A. E. (1997); A novel 3'-end repair mechanism in an RNA virus; *Proc Natl Acad Sci USA* 94(4): 1.113 – 1.118

- Nellen W., Lichtenstein C. (1993); What makes an mRNA anti-sensitive; Trends Biochem Sci 18: 19 – 423
- Nishikura, K. (2001); A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst; Cell 107: 415–418
- Osbourn J. K., Watts J. W., Beachy R. N., Wilson T. M. A. (1989); Evidence that nucleocapside disassembly and a later step in virus replication are inhibited in transgenic tobacco protoplasts expressing TMV coat protein; Virology 172: 370 – 373
- Palmgren G., Mattson O., Okkels F. T. (1993); Treatment of Agrobacterium or leaf disks with 5-azacytidine increases transgene expression in tobacco; Plant Mol Biol : 429 – 435
- Pinto Y. M., Kok R. A., Baulcombe D. C. (1999); Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes; Nat Biotechnol 17: 702 – 707
- Pruss G., Ge X., Shi X. M., Carrington J. C., Bowman Vance V. (1997); Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses; Plant Cell 9: 859 – 868
- Ratcliff F., Harrison B. D., Baulcombe D. C. (1997); A similarity between viral defense and gene silencing in plants; Science 276: 1.558 – 1.560
- Reichel C., Mathur J., Eckes P., Langenkemper K., Koncz C., Schell J., Reiss B., Mass J. (1996); Enhanced green fluorescence by the expression of a *Aequorea victoria* green fluorescence protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5.888 – 5.893
- Riechmann J. L., Lain S., Garcia J. A. (1990); Infectious *in vitro* transcripts from a plum pox potyvirus cDNA clone; Virology 177: 710 – 716
- Ritzenthaler C., Viry M., Pinck M., Margis R., Fuchs M., Pinck L. (1991); Complete nucleotide sequence and genetic organisation of grapevine fanleaf nepovirus RNA1; J. Gen. Virol. 72: 2.357
- Rott M. E., Tremaine J. H., Rochon D. M. (1991); Nucleotide sequence of the tomato ringspot virus RNA2; J. Gen. Virol. 72: 1.505
- Rott M. E., Tremaine J. H., Rochon D. M. (1991); Comparison of the 5' and 3' termini of tomato ringspot virus RNA1 and RNA2: Evidence for RNA recombination; Virology 185: 1.505
- Rott M. E., Galchrist A., Lee L., Rochon D. M. (1995); Nucleotide sequence of the tomato ringspot virus RNA1; J. Gen. Virol. 76: 465
- Ruiz F., Vayassie L., Klotz C., Sperling L., Madeddu L. (1998); Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*; Mol. Biol. Cell 9: 931 – 943
- Ruiz F., Voinnet O., Baulcombe D. C. (1998); Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing; Plant Cell 10: 937 – 946
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989); Molecular cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press

- Sanford J. C., Johnston S. A. (1985); The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome; J. Theo. Biol. 113: 395 – 405
- Scholthof H. B. (1999); Rapid delivery of foreign genes into plants by direct rub-inoculation with intact plasmid DNA of a tomato bushy stunt virus gene vector; J Virol 73(9): 7.823 – 7.829
- Scott N. W., Cooper J. I., Lui Y. Y., Hellen C. U. T. (1992); A 1,5 kb sequence homology in 3'-terminal regions of RNA1 and RNA2 of a birch isolate of cherry leafroll nepovirus is also present, in part, in a rhubarb isolate; J. Gen. Virol. 73: 481
- Scott S. W., Zimmerman M. T., Jones A. T., Le Gall O. (2000); Differences between the coat protein amino acid sequences of English and Scottish serotypes of Raspberry ringspot virus exposed on the surface of virus particles; Virus Res 68 (2): 119 – 126
- Serghini M. A., Fuchs M., Pinck M., Reinbolt J., Walter B., Pinck L. (1990); RNA2 of grapevine fanleaf virus: Sequence analysis and coat protein cistron location; J. Gen. Virol. 71: 433
- Shi B. J., Ding S. W., Symons R. H. (1997); Plasmid vector for cloning infectious cDNA from plant RNA viruses: high infectivity of cDNA clones of tomato aspermy cocumovirus; J. Gen. Virol. 78: 1.181 – 1.185
- Sijen T., Wellink J., Hiriart J. B., Van Kammen A. (1996); RNA-Mediated Virus Resistance: Role of Repeated Transgenes and Delineation of Targeted Regions; Plant Cell 8(12): 2.277 – 2.294
- Smith H. A., Powers H., Swaney S., Brown C., Dougherty W. G. (1995); Transgenic potatoe virus Y resistance resistance in potato: evidence for an RNA-mediated cellular response; Phytopathology 85: 846 – 870
- Song E. K., Koh H. K., Kim J. K., Lee S.Y. (1999); Genetically engineered transgenic plants with the domain 1 sequence of tobacco mosaic virus 126 kDa protein gene are completely resistant to viral infection; Mol Cells 9 (6): 569 – 575
- Smith N. A., Singh S. P., Wang M. B., Stoutjesdijk P. A., Green A. G., Waterhouse P. M. (2000); Total silencing by Intron-spliced hairpin RNAs; Nature 407: 319 – 320
- Spielmann A., Krastanova S., Douet-Orhant V, Gugerli P (2000); Analysis of transgenic grapevine (*Vitis rupestris*) and *Nicotiana benthamiana* plants expressing an Arabis mosaic virus coat protein gene; Plant Science 156: 235 – 244
- Stam M., Viterbo A., Mol J. N., Kooter J. M. (1998); Position-dependent methylation and transcriptional silencing of transgenes in inverted T-DNA repeats: implications for posttranscriptional silencing of homologous host genes in plants; Mol Cell Biol 18(11): 6.165 – 6.177
- Staudt G. and Weisch B. (1995); Resistance to transmission of the GFLV in *Xiphinema index*; Vitic. Enol. Sci. 47: 56 – 61
- Stellmach G und Querfurth G. (1978); Untersuchungen zur Serologie, Pathologie und Thermo Labilität mehrerer Rebenisolate des Himbeerringflecken Virus (raspberry ringspot virus); Weinberg und Keller 25: 128 – 136

- Stellmach G und Weischer B. (1970); Remarkable diseased grapes from which a sap transmissible virus was isolated; Vortrag auf der 4. Internationalen Konferenz über Rebvirose 16. – 20 Juni 1970 in Colmar
- Tenllado F., Díaz-Ruiz J. R. (2001); Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection; *J. Virol.* 75 (24): 12.288 – 12.297
- Thomas C. L., Jones L., Baulcombe D. C., Maule A. J. (2001); Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector; *Plant J* 25 (4): 417 – 425
- Töpfer R., Matzeit V., Gronenborn B, Schell J., Steinbiss H. H. (1987); A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusion; *Nucl. Acid Res.* 15: 5.890
- Vance V. B., Berger P. H., Carrington J. C., Hunt A. G., Shi X. M. (1995); 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco; *Virology* 206: 583 – 590
- Vaucheret H., Beclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J. B., Mourrain P., Palauqui J. C., Vernhettes S. (1998); Transgene-induces gene silencing in plants; *Plant J.* 16: 651 – 659
- Verver J., Wellink J., Van Lent J., Gopinath K., Van Kammen A. (1998); Studies on the movement of cowpea mosaic virus using the jellyfish green fluorescent protein; *Virology* 1;242(1):22 – 27
- Viry M., Serghini M. A., Hans F., Ritzenthaler C., Pinck M., Pinck L. (1993); Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine fanleaf nepovirus RNAs; *J. Gen. Virol.* 74: 169 – 174
- Voinnet O., Pinto Y. M., Baulcombe D. C. (1999); Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants; *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14.147 – 14.152
- Vos P., Verver J., Jaegle M., Wellink J., Van Kammen A., Goldbach R. (1988); Two viral proteins involved in the proteolytic processing of the cowpea mosaic virus polyproteins; *Nucleic Acid Res.* 16: 1.967 – 1.985
- Wagner E. G. H., Simons R. W. (1994); Antisense control in bacteria, phage and plasmids; *Annu Rev Microbiol*
- Walden R., Schell J. (1990); Techniques in plant molecular biology--progress and problems; *Eur J Biochem* 192 (3): 563 – 576
- Wassenegger M., Pélissier T. (1998); A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants; *Plant Mol Biol* 37: 349 – 362
- Waterhouse P. M., Graham M. W., Wang M. B. (1998); Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 13.959 – 13.964
- Waterhouse P. M., Smith N. A., Wang M. B. (1999); Virus resistance and gene silencing: killing the messenger; *Trends Plant Sci.* 4: 452 – 457

- Wetzel T., Meunier L., Jaeger U., Reustle G. M., Krczal G. (2001); Complete nucleotide sequences of the RNA2 of German Grapevine Fanleaf and Arabis Mosaic Nepovirus; *Virus Res.* 75: 139 – 145
- Wetzel T., Fuchs M., Bobko M., Krczal G. (2002); Size and sequence variability of the Arabis mosaic virus protein 2A; *Arch Virol* 147 (8): 1.643 – 1.653

7. Anhang

7.1 Sequenz der RNA1 von RpRSV-ch

```

1  UUUGUCUUUC  AUCUCAGUCU  CAUUGUUGAA  GCUCACAUAU  CUUUAUCUCU  UCUCGAUAUC
61  UCUUCUUCAA  UCUCUCUAUU  UGUCGUGACA  AAGCAAAGUU  UACAGUUUUC  UUAUAAUUGG
121  UUA AAAACUG  GUUACAAUGG  GGUGGACUUG  CCCUGUUCAG  GGGUGUAUGU  AUUCCCGCUC
181  CACUUGGAGC  AAUCGUGGCC  UCAAGGAGGA  UGGUCUAUCC  UCCACCAUGC  GUUGUCCUGG
241  UGCCAUGUGU  GGCGCCAUGC  UCGUCAGGUC  GGAGCCCGUU  CAAGCUCCAA  AGGCUACUGU
301  GGUGCCUCAA  ACCCCGGUUA  CUGCUGUCCG  CCCCAAGAGG  ACAGUGGUUA  GUGCGACACC
361  CCUGCGUAA  CAGGAUUGUG  UCGUAGUGGU  GGAGGUGGGG  UUCCCAGCCC  UACUCUCCCU
421  GGAUUAACCU  GCACUUGCAG  GAAGAGCUCG  CCACACUGGC  GAGUUUGACU  CCGCGCUGCU
481  CGCGCGAAAG  CCCUCCAAUG  GGGGCACUGC  UAGAGCACCU  ACCGGUUGGU  UUA AACCGAG
541  GGUUGUGCGC  ACACAACCUG  CCAAGAAGGC  ACUCCCUUCU  UGGGUUUCUG  AGGCCCGCCG
601  CCUAAUAAAG  GGGGCCUUGG  AGGGGUCAAA  UGCGUUUGGC  CCACGCUACU  GCCGGGAGAA
661  AUUCCCGAAG  GCCCGCCUUG  UGUGGGUACU  GGGUAUGCUC  UCAAAGAGCA  GCCCUCCUUC
721  AGUUGCCAUU  GGAAGGCAAC  UGAAGAAGAG  UUUCCUGGCA  CUACAAGCUA  GGAUUGCCAG
781  GGCACUGGCA  AAGAAACAAA  GUGCCCUGUC  UGCACGCAGG  CAAGAGGCCU  GCAGGAAGAU
841  CCGCCUUGCU  UUACAGCAGG  CGAGGGGUUA  UGCCGCCCUA  GAACGGCAAC  AGGCACGCCA
901  GCUCUCUGGA  GCUGGUCUGU  AUUCCGUGCG  UUUGUGCACG  AAGAGGGCUU  UAAGCCCUAU
961  UGUGGAAGUG  CCCAAGAGGC  ACAAGAAAAA  GGCAAUAUCU  UUGCCUUCUC  CUGUUUCUGU
1021  ACAGGAGUUU  CCUGAGGGCC  UUGUUGGUCC  UAAUUUUUGG  GAGACAUCUG  GUCUCCUAAA
1081  CUGCGUCGCG  UCCCCGAGC  GAAGGGAGGA  UUUGGUCUUU  CCCGUUUAUG  GGAUUGACAG
1141  CUGCCGGACA  GAUCCGGAAU  ACUUUGUGGU  CGGGCCUAAA  AGCCCUUCCA  AAAUCAUGGG
1201  GGACACUAAA  CCCC GCCUGC  CCAC AUGCCC  UGCAGAGGCA  UUGAAUUUAU  UGUGGGCUUC
1261  CAACCUUUUU  GAGGACUGGG  AGCUCGACAU  UAUCGGGCAG  AUGGUCUCGG  AUGGCUUGUU
1321  GACCUCACAA  GCCUUCUUG  AUGGCUGUAC  CCUGGUCUCA  UAUUACGGCC  AGGAACAGAU
1381  GGUGGACUCU  UUCCACUGUC  UUUUGCAGGA  UCCUGUUCU  GCUGAGGUUG  CUGAGGCGCU
1441  AGCUGUUGAU  GUGCAGGCGC  UGGAUUUUGA  UGCUGUCUUU  GGUUGUGGCA  UUUCAGAUUU
1501  CCUUCGGGGA  ACUCGUGAUG  CCAUGAAAGG  AUGGAUCAUG  GAUCCAGUUA  UUGCCAAGUC
1561  AACAACUUGG  UGUAACACCA  UCAUUGAUAA  GGUGCGUGCU  UUAUUUGAUC  AAUAUUUCGC
1621  ACCAUUUCAU  AAAAUCAUUG  AUGGU AUGUC  AUACGUAAAU  UCACUGUGGG  CAAA AUGUAA
1681  AGAGUGGGCC  CAGUCCGUGC  UGAAGAAUGG  UUCACAACUG  UUCUCUGUCA  UGUGGGAAAC
1741  ACAUUGCGUG  AGUUUUGUCA  UCAUCAUUA  UUGUGCGUGU  ACCCUGCUGG  UAGAAAAUGU
1801  GUUGAAGGAA  CUCCGUUGA  UAUCACGUGU  UGGUACCCUU  ACCAGCUGUG  UUAUAUCCGG
1861  UGCUCUUGGG  AUACUAGGCU  GCGGUUAUAU  CCUUGCUAAG  UGUGAGGAUC  UUGCUGUGGU
1921  AUCUGCUAGU  AUUCGAGCCU  UUCUCGGCGU  GUUGCUGUGU  CCUCCAACCA  UGGAGGCAGU
1981  GGAUCUGAAC  CAGUCCUUGA  UUCCUGAGGA  AAUCCAAGCU  ACGAGCUGGA  CUGGUGUCGA
2041  CAGAGUGCUG  GGGGCACUGA  AUGCCGUUGG  UUCCGGGUUG  ACAGGAUUCA  ACACGGAUAC
2101  CAUAAUAUAU  UGGGGCAGAU  UUGCCCAAUA  UUUUGACGGC  AUGAGACGGG  GGAAGGAUAC
2161  UGUGUGCGCU  CUCGCAGCAU  GUCUUUUUGA  AAAACUGGGC  ACGGUAUAUA  AUCGUGUAAC
2221  AGGUAAGGAA  GCAGCUUUUU  UCCAUGAGCU  CUCCUCGCUU  GUUUCCAUUG  AUGUCCAGGG
2281  AUGGUUGAAC  UCUUCACGCA  GAGUGAUGGC  AGAAUCUAUA  GCUUUUGCUA  AAUCUGACGC
2341  UGUCGCUUUU  GCCACUGUGG  AGAGACUGAU  AAUUGAUGGU  GAGACCAUCC  AAUUGACCGC
2401  UGCUUCUGCU  CCAAAGUCCC  ACUCUAUGCA  GUUUGGUCAG  AUACUUGCUG  AGCGCUUGAG
2461  GGAACUCCGU  ACUCUGCGGA  AUGAU AUGGC  GCAUGCUGGU  UCCUUUGAGG  GGCGUAGGUG
2521  UGUACCUUUC  UGGUUGUACA  UCUAUGGACC  UCCGGGGGUG  GGUAAAACCA  CUACCAUGCA
2581  UGAGUUUUCA  CAGGCUUUUG  UGACGGCCUU  CGAGUUUCCC  UCAGACUCCC  UAACAUCCAA
2641  AAGUGCCACU  GAUAAGUACU  GGUCACUCUA  UCGGCGCCAA  GCUUUGGUGC  AAAUAGAUGA
2701  CCUGGGUGCU  AUCUCUGAGA  GUGGU AUGGA  ACAGGAAAUG  AUGAAUAUCG  UUUCCUCCGC
2761  CACAUACAAU  CCUACCAUGG  CGGUUGCUAA  UGAAAAGACG  ACGCUUUUCG  AUAGCAAGUU
2821  CAUUGUCUCA  ACGUCGAACA  AUUACUCUGC  AGGCACUGAC  GCCAAGAUAC  ACGACCGGAA
2881  AGCUUUUAAC  CGCGCUGGCA  GAGUGGUUAU  CAAAACCCGU  GGAAGGCGG  GAGUGCCUUU
2941  CAAUCCCCAU  GAUAGCACUG  CAGCAGCGGA  GUUCUGUGUG  GUGGAGAGGG  AUGAUCGGGC

```

3001	AGAGACACCU	AUAUGGGUGC	AAAGUGGUGA	GGCCCCUGAU	GAUAAGGAAC	UAUAUUGGAU
3061	GGAUUUUCGC	ACAACUGUGG	CUUAUGUCAU	AGAGCAAGCU	AGAAUCCAUC	ACAAUGCAGA
3121	GGACAUUGAG	CAAGCCCAAU	AUUCAAUGAA	ACACAGCCGG	ACAAGACAAU	UGUACCAGGU
3181	GUGCGAGAAU	UACAUUGGGG	AAGUGAAAAU	GUCCGUGGCG	AAUUUUGUCC	CUGGGGAUUA
3241	GUUGGGAGCU	UGGAAUCUGG	AGCCCAAAGG	CAGGUUCUUU	UAUUCAUGUG	UUGAUGGUCG
3301	GGUUUAUUCU	UAUGAUCCCG	AGCAGAAAGC	CCAUGAUGAA	GGACCGGUUG	AUAAGGCUCU
3361	AGAUUUUGAG	CAGAUUUGUU	UGGAAAAGCU	CUCCUACACC	CUGCAGGCUG	AUAUUCAGGG
3421	UGGGCCAAAA	UCUGCGACUG	CUGGUUUUUU	UUUGCGGUCA	AUGGUUUCAG	GAGAGUGUGC
3481	UGUGGAAAGU	GUGGACAAGU	UAAAUAGGAG	UGCAUCUCGU	GAGCACCUGA	UUUUCUUUAA
3541	AAACUUGUCC	CUGGCUGAUA	GGGUGUAUCU	CCGCCUCGUA	CAAAAGCGCA	UUUUACAGCU
3601	UGCGAUGGUA	GGAGAUCCCC	UGGGAUUGAG	AAGUUACACA	GUAUUGAUGG	AGGGAUUCCA
3661	AAAAUUCUUA	AACUAUGUUA	AAGAGAAUGG	AGGGAGACUU	CUGUUGAUUA	UGUGUAGCUG
3721	CAUGCUGUUG	GGUAUUGCCU	GCUAUACUUU	UUUCAAUUGA	UUGGCAAUAC	UCAUUGGUGG
3781	GACUUCAGUG	GCUGCUGGCG	CAGCUGCUAU	GGUUGACAUU	GGAGCGUGUG	GUAGUACUUC
3841	UACCUAUGCA	UCGGAUACG	GCGCCAAGAU	GGGCCGUAGG	AAUUGGCCAC	AUCGUUCCAG
3901	GGAGAUUCCU	GCAGUCUGGU	CUGAAGAGAC	UGGACAUGAU	GAGAAAUGGC	AGCUGUGUGG
3961	UCUUCUGGAG	ACCUGCAGAA	GUGACAUGCC	CGCAGUACAU	GUGAAUCUUG	UACCGGGUAA
4021	UAAAUUUGCC	AUAACUAAAC	ACCAAGCCCA	AGCCAUCCCA	GAUGGUUCUU	CUGUGGGUCU
4081	GAGUGUGGCA	GGAAGGAGUU	UCAGGACGUU	CCAGUGGCGU	GPUUCUGCAC	UUACGGAGUA
4141	UGCUGAGAGC	GAGAUCUGUA	CGUACUUUGA	UAGCCGAAUU	CCCUCUUUGG	GAAGACAGGC
4201	CAUGAAAAUG	UACUCAGAUU	CCGAUCUUGA	UGCCUUAAAC	GUCAAGUACU	UUUCGACUCG
4261	UACACUGCAU	UUUAGGUUGG	UGGAUGAUCA	AGUCGAAAAG	CGCCACUGGG	ACGCGGAUGC
4321	GUGUGUUUAU	UCAACCCCAA	AAACCAUUGU	UUCUACUAUC	AAUGGGGUGA	UAUAUCGGCA
4381	AGAAAUACCC	ACAGCUAUCA	CGUAUAGACG	UGAGAGUGUG	AAACACGACU	GCGGCGCGCU
4441	CGUUUUUACG	GAAGUGCGUG	GCAAACCGAA	AGCUGUGGGU	AUGUUGGUUG	GAACUUUAGG
4501	GGGAACGACA	UAUGUGUGCA	AAUUUCCUCA	CAUUGAGGUU	GAUGCUUUUG	CAUGUGUUC
4561	CGACAUCCGA	GGAUUCAUUC	UUGAAGCAGG	AGUUUCUACU	CUUGGCUAUU	CUAAACUUGG
4621	GUGGUUGGAU	AGGCGGCAUC	AGCCGCAUAA	CAGUGAGAAG	ACUGAGUUCG	UGCCCAUACC
4681	GGGAAAAUUA	CACAUGGAUG	AUGUCCCAUG	UAAGAUACCG	GCAGUGCUCA	GUGCUAAAAG
4741	CCACCGGUUG	GCAGACAUAC	CCCAUUGAUU	GGGAUACGAU	CCCUACAAAC	AAGGUUAUGGA
4801	AAAGUUUGCU	CAUCCCAUGC	AAGAAAUGUA	UGAGCAACUC	CUUGCCACCG	UGUGUGAUGA
4861	AAUCGCCCAA	GAGUUUCAUG	AUGUGGGCGU	GCGAGGGAGG	AUGGUUCUCA	UGGAUGAGGC
4921	CAUCAACGGA	CAUCAUAAAU	AUGAGAUCCC	CUCGUUUUAU	GUUGAAGGUG	CCAGUACCAG
4981	AGAGCUCAAU	GAGUUGCGUA	CUUCUUGCUC	UGCUGAAGUC	UGGUGCUGUG	AUCCAGGGAG
5041	UGAUUAAGAA	UUUGAAUAUC	CUCGCAUCAU	CCCUGGUCCC	GUUGAAUCCA	AAUGGAAGUG
5101	UGAGAGUACA	UGUUGUGGUU	GUACUUUCAA	AAGUGGUGGU	ACUGAGGCCA	UCAUAAGUUU
5161	UGUCAAGGCG	CGAUCUCCAU	GCUGCGAAGA	AAUUUUUCUU	GACGGCCUUG	ACUUAACCAC
5221	UUCAGAGGGC	UACCCUCUUU	UCCUGGACCG	CCCAGCUGGG	GCAAAAGGAA	AGGAAAGAUU
5281	UUUUGAGGGU	AGUGAAAAUC	AAAAGUCCCU	CAUACCGGAU	UGUCCGCUUG	AUGUACAGUU
5341	GAAGAAAGGU	AUUGAGGAGA	CUCAUCUUGG	CACGCCACAG	CUCAUUAUUA	AAGAGAGUGC
5401	UAAGGAUGAG	UUACUGAAAAG	AAGGGAAGGU	UUUACCUUCC	GAGGGGAUGC	CGGGAACACG
5461	AUUGUUCUCC	AUUUGUCCUG	CAUGGUACAA	CAUCGUUGUG	CGCCAACACU	UUGUAUAUUA
5521	UGCUGAAAGU	GUGCGCAAAC	GAAGACGUAC	UUUGUCUAGU	CAGGUGGGAA	UUGUUGUGGG
5581	UUCUCGUGAG	UGGGAUGAUC	UUGCAGCUCG	ACUCAGGUCG	AAAAAAAUG	AUAAGAUGUA
5641	CUGCUGCGAU	UAUCCAAGU	UUGAUGGGCU	GAUGACUCCC	CAGAUUGUCC	AUGCUAUCAC
5701	AAACAUUUUA	GAGAGAAUGU	UUAGUGGUAA	UGACGGGAUG	AGUCAGUUCC	GGCAGAACCU
5761	GCUGAUGGGU	AUCUGUAAUC	GUACUCUUAU	CUGUGGAUCA	CAAGUUUAUA	GGGUUGAAGC
5821	UGGCAUGCCU	UCUGGGUUUG	CCUUGACUGU	UGACUUCAAC	UCUAUUUUUA	AUGAGAUACU
5881	GGUCAGGUGU	GCUUAUCGCU	CUCUUGUACC	UGAGAUUGAG	AGACCUUUUU	UUUCCAUAUA
5941	UGUGGUCCUG	AUUGUGUAUG	GCGAUGAUAA	UGUUUUGGGU	AUCCACCCAA	ACAUUGAGUC
6001	UGCCUUUAUU	GGCAUUGCAA	UUAAGGCCUA	CAUGAAGGAG	GAAUUGGGGA	UUAAAAUCAC
6061	UGAUGGUGCC	GAUAAGCUCA	GCCCCGUUAU	UUGUGCUCGU	CCUCUCGAGC	AGUGUGAGUU
6121	UUUGAAGCGU	ACCUGGAGGA	AAGACCGACA	GUAUGGACUA	UACCGGGCUC	CACUUGUGGA
6181	GACUAGUAUA	UACUCAUGCU	UACGUUACGU	ACGGCUUCAA	AACUAUGACU	GGCAAGCUCC
6241	CCUCUUGCAG	AAUGUACAGG	GGAGCCUUUA	UGAGGCUAGU	CUACAUGGUC	CAGAUUAUGCA
6301	UGCGCGUAUU	UAUAAACAUU	UUGCGACGCA	UUUCCCGAAG	UGGGUGGAAG	AGCAUGAAUU
6361	GUACACUUUA	GAACAGUGUC	GCACACGAUU	CAUUGCUGCU	AAGAAUGGAG	AUUUUAAUUU
6421	CCAUCCUGCU	UCGGCACAAA	UGGGCCAUGU	UUUCUCCCAA	CAGACUGAGA	UUCAGGAGUU
6481	GUCUCAGUCU	CAAAAUCCAA	AAAGAUGCUU	UCAACUCCAC	CCAAAAAUCC	ACAUCUGUGG
6541	UCCUGGACAU	AAUGAACAAAG	ACUGUUUUUA	UGUUGAUGUC	CGGGUGAAAG	GAAAGAUUAC
6601	CAAGGGUAAG	GGCUUCCAU	AUGCACCUUG	UUUUUCCGCA	GGUUCUGGCC	AACUUGGUAC
6661	UGUUAUUGG	GCAUCAUCGU	UCCGCUCAUC	AUCAGCGUGU	CCCAUGAGGG	AUUUAGCUGU
6721	CGAUGCUUUU	AAACGGGGCG	AAUGUGUUUA	CUUCAGAGAC	AAUGGUGAGU	UAAUCAUAGC

```

6781 UUGGUUAGCC GCUAUUAAU UUGGGAUGUC CAUUAUAGCC GAUGGGUUGG AUGGCCUUCU
6841 UCAGGUCUAU CGCAACCAGG GGCCAAACACA CCUCGAUGAU UUAAGUUUCU AUUUUGAAGG
6901 UGGUGUUGUU GGUGUUCAG CUCCUGCACA CUUGAUGGUU UAUGGGACUG ACACAUCAAU
6961 UCUCAAUCGC UUGUGUCCCA AAACUGUUUU AGAAAGUGCC CCUCCUCCAG GACGUUCAAG
7021 CAACGUGAGU GAGCGCAGCC AGGUGCAAAC AUUCUUGCAU AUGAGUCCAA AACCUUGUUU
7081 UAUAAACACUC AAGGGCUCAG GUAAGGUUUG CCACGGUCUG CGCUGCAAUA ACUCAUGUCG
7141 CGGCCACAUA UCUUGUACUG AUGUGGUUCG CAAUUCUGCA GCCAAUCAAC GAGCUGCAAU
7201 GCUGGAUGUU CUGAGGAGGG GGUGCUACAA UAUCCAGUAG GAGCUGGAUC UUUUCAGGCA
7261 AGCCGGCAGA CUUCGUGUGC UGCUACCACG GAAUUAACUG GUUUUAGCUG ACACCUUACU
7321 GUCGUUUUAU UAUUUUGUUU UAGAAUAAUA AUCGGCUAGU UUCGCCGAGA AGGAAACGUG
7381 CUGGAGCCAC ACCAAAAUUC UGAUACUAUA UGUUCCGUGA AAUCGGUAAU CAGAUAAAGU
7441 CCAAACUCUA CGACGCUUUG GGGGCGGAUG AAGUAGAUAC CCUAUUGAUA AGGGGUUCCG
7501 UGAAAUCCGU AUAUGGCAAC UCUCUGAAAC UCAGUUUCUA AGGUGUGGGA GCAACCCUGC
7561 GGCUCGCGGU UAAUUGAGCC AACUAAAGCU GUGCAUGUG AGUUUGUGUU UUACACAUGG
7621 CCCUGUGAG UCUUGACAAC UUGCAGGUUC AGCGGUACUG UUAUUGUCU UUCUUCUGGU
7681 GGUGACGUCC CAGAACAGUA UGACGAGUUU UCCAAUUUAU CAGUAAAUUG GAGCCGAUUG
7741 CAGAGUCGGU GGUGUAAAAG UGUGCUACGG CUUGUCCGU AGGCAUAAU AGCCAAGAUU
7801 AUCUGUUUAU AUGCUUUGAG UCAUAGUUAG UUUUCUUUCU GUUGCUCCU CUUUGAGGUU
7861 GUGCCUUUAG CAAGCACACA AAAUAUGCA UUUUAUUUUG UUCUUAAGCU UCCGUAGUGU
7921 CCGUUCUGUC CGAAC

```

Das AUG an der Position 137 – 139 ist das Startcodon des Polypeptids. Das UAG an Position 7.238 – 7.240 ist das Stopcodon.

7.2 Sequenz der RNA2 von RpRSV-ch

```

1 UUUGUCUCAA AUCUCAUUCU CAUUAUCGCA GCUCUCAUCU CUCUCUGAUU CUCAUUCUCU
61 GAUUCUCUCU UGUUGUGGUU UUCAUAUUCU CUUGUGGUUU GGUACAAAGU CAAGUUUUCC
121 GGAAGUUUCC UUUUAAUUGU UUAUAAACU UCCACUUUAU UUUUCCUCU UCUAUUCUG
181 UUACUGCGUU GUGCCUUGGC ACAUUGUCCC AGUUUUGGGG AGAAUUCCCC GAGGCUUUA
241 UUAACACCUU UCAGCGCCUU CAAAUAGCGC UGAUUGGUGA CAUAAAGAAA UGUCCCCUCU
301 CCUCCCCUCU CUUCCCCGAG CUUUCUAAGC UCGAUGCUGA CUCCCAGCAU CAUUUGCUGG
361 CCUCCUUCGA ACUCCCCAGG UUCGGAGGAG UUACUCCUGG UGUCAUGGAG CAACUCCAUG
421 AUGCGGAGUC UGAACUGGCU GAAGCCAGGG CUAGACUCCU UCGCGAACGG CUACACGCGG
481 UAGCCAAUAA GGAGAACAUU CCCUAUCUUG GGGAUUGUAU GUAUUAUGAU GCGCCUGGCA
541 UCAACCAAGA GGAGCUGCUU CAGGCAGCUU UUCUUGAGGC UCCACACCU GAGUGGGAGA
601 GUGGUCGUAA UAKGCCUCUC UGGCCUAAAG AUGAUUGGUU UAGGGACGCC AAGCAAGGCC
661 CCUACCCAGA GGAUUAUGGC GAUAUUCUUC UGGGUGAUUU CGAUAAUCUG UAUCGCGCGU
721 UCGAUGCUCU UGUGGAGGAG CAUUGGAUGU CUGUCUACUC CACCACACUC AAUCCUUUCG
781 CUCUACUCAG AUGUGGUAGU GAAUUUGUGG AGGAGUGCGU UGUUCUGCG GGUAGUCUGA
841 UUCCCGCUUG UAUGAUGACU GACCAUCACC UUCAGCCAAC GGGUGAUAGG CAAGCCGACA
901 AGGAAGAGCG GCAGGAUUAU GCGGACAGUC AAGACUCCAU UCAGAGUAUG GGUGAUUUUCU
961 GGAAAGAAUU CUAUUCGAAG GAUUCUGGAA AGAAAAUUC CGACUCUCAC AAGUCGAGAU
1021 UGGCCAAUGA UCCCAAUAAA GUUGGCUUCA CAAAGAGUGC GCUGUCCAU AAACAGCCCC
1081 UGGCGCAUUC ACUGGCCCAA ACGUGGGCAA AUUUUAGGGG CACACAAGAU AAGGCGGACU
1141 UGGUCAAGGU GACCAUGGAC AUGAAUAUUG AGAAUAUAC AGUCCGCCUU CCUGACGCAG
1201 UGCGUACGAC AGCGGGUCCG UUAUAUAUUG AAUGGAUCAA CUUACCACGC AUGUCCGAGA
1261 AUUCCGCACG UAAACUAGCU GAGGCUUGGU GGAUAAUUG GGAUUAUUGU GGCUGGGAUC
1321 UCGCUGUCA GUCACUAUA GCUGUUGGCA CACCAGUACG UGUUAUCAU UCUCUCGUAG
1381 AUGGUGCGUG UUCUGAUUAG CCCACGGCAA CUAUGUGUGC CUUUGAGGUG AAUUUGGCAG
1441 CACAGAACAA UCGAUCACUG AAUCUCCGC UGCUGAGUUU ACCUUUUUCG CGGCUGCUAG
1501 CUGACUUACA UGAUUUCCAA CAUCGUGUUA AGAUUGCUUG CCAGUUUCGG GACCCUGAGG
1561 GCUUUAACGU GGAACUCCU AUGUUGAGCU UUUUCUUCGU UGAUUUUUCU GAGCUGAAGC
1621 AGACCGCAUU UGAGCGGAAU UCUUUGCUA GGAUUCUUG GUCCGAAAU GAAAAGCGUG

```

```

1681 CUUGUCACGG UGGUGGCCGU UGUGUUGCGU CCCAGGGUUAU CGUGCAGACC UGGGAGAAGG
1741 AGGUUAAUCC UCCCUGAAA GAAUAUGCAC CCUUGGUCUU GCCUCCUGUU CCCAGCCCCA
1801 AAAGAAAUUU UAUCGAUCAG CAAUCUGGGG AGGUUGUGCG GCCAUUGAUU CAGAAGUCCC
1861 GCUCCAUGCG AUUUAAAUCG CCGUCUGAUU UAUGGAGUAG GCCCUCUGUG GAUGGGGGAU
1921 CAACAUUCAC ACUGUCGCCG UCAAGAGGCU CUUACGGUG CGAUAAUGUG CCUGGUUGUG
1981 CCUAUGAGGU AGAUCCAUG CACUUGUUGU AUUAUGAAU GGUCAAUGUA CCAAAAGACA
2041 CUCUUGGCCG CACUUGCUG ACUCGGAUAG AUGUCCGGGC UAAGGCUGCA ACCUUUGAUA
2101 GUGCUGUAUG GCGACAAUG GUGAGAGAUG GUUGUCUCAA ACCCAAAUCC AAAAUGCGCA
2161 UUACCGCAGC UACUUCGUGU UUCUCUGGUA UUGUGUAGG UGCUGUCUU GACGCAUAUC
2221 GGAGAAUUC UGCAACCACG AAGACUGAUU UCACUCGUC CCUUGUGACG GGCCUACCUA
2281 ACAUUGUGUG GCGGACACGC GAUACUUCAG AGAUAGAAUG GGAUAUCGAU CUUGCGGCAG
2341 UGUGCGGACA UACUUUUUUU GCACUGGAAG AUACCUUUGG GUAUAUGGAC UUUUAGUUU
2401 AUGUGCUCAG GGGUAAUGAG GUUACUGCCG UUGCUGAUUG GUCGAUAUAU GUUUCCUUC
2461 AUGUUGAUUG GACACAGGAA AGUAUGUCGG CCACACUUAU CCCAACCUUU GUAUGGCCCC
2521 CAGAACCAGC UGAUAUUUCU UAUUUCAAG AAGUAUGGGG GCCUUACCAU UUCACACUUG
2581 AUGGUACCGA GGCAAAAGAA AGCUUCAGUU UAAUGCCCGG UAUGGCCAUC CCCCGCGGUG
2641 CGCAAACUGU GCGUACCUUC CCCCUGUUU UAGCUGCACA UUUCCGAUCG UGGACUGGGA
2701 AAGUCAGGAU GUCUAUCCAG GAGGUUUCCU CCAUUUUCCU GACCGGAACA UACAUGGUUG
2761 GUGUGUCUUG GAACGCCACU GCUGAUCUCA CCGACAUUAC UACUCGGAUA CAUUGGAUUG
2821 UUAUAUCCGG UGAGGUUUUC GAGUUGGAUC UUUACUGUCC UUAUGGUGAG AAUCCAACUU
2881 UUACAGGCCU GGUUAAUGGA AUACCAUAUA UCAUUGUACA CAGGCUUGGA GGAAUCAUUG
2941 GUCCCAAGGA UUCUGUUGGA ACGUUUGGUU UUAUGAUACA CCUACAUGGU UUAACUGGUG
3001 UUAUAUAAAA UCCUACGUUG CACAGUGGAG ACCGUUCUGU GGGGAGUGCC UGGUUCGGUG
3061 UUACUAAUAU CCUUGAUGAU AACUUGGUGU UUAACAUAAC GGUAGAAUUA GAAGAUAUGG
3121 UUGCGGUUGC UGGGAAUAU GAAGUCACGA AUUAUGCUAA UCCUACAGU AUGCUCUUUU
3181 CCGUACUGG UUUGCAUGGU GGUUCAUAU GUCUUCUAUA AACAUUGGUG CCAAACACAA
3241 GUCUCGGUGA GUCAAAGGGU ACUCUCAAAU AUAUGCAAUA UUUGUACCAU ACGACCACUG
3301 AGAAUUUCUU UGGUGAUCAA GCAACCCGUG GCAUCAUUGA CCAAAUUGGU UUCACGGUUG
3361 ACCUUGCCUG UGGCGAUUUC UUUUGUGCCA CGAGAGUUGG UCUGAAAGGG GAAGUUGAGA
3421 GACUUGGCAU AUACAGUUA AAUGCCAAGU CUAUUGCUGA AAUUCGUGUU UCCUUUGAGA
3481 UACUGUCUAU GAAAUUUUAU GGCAGUACCA UCAGAGUGAA GUGAACUGGC ACAGCCCUGU
3541 GGCUCGCGGU UAAUUGAGCC AACUAAAGCU GUGCCAUGUG AGUUUGUGUU UUACACAUGG
3601 CCCCUGUGAG UCUUGACAAC UUGCAGGUUC AGCGGUACUG UUAAAUGUCU UUCUUCUGGU
3661 GGUGACGUCC CAGAACAGUA UGACGAGUUU UCCAAUUUAU CAGUAAAUUG GAGCCGAUUG
3721 CAGAGUCGGU GGUGUAAAAG UGUGCUACGG CUUGUCCGU AGGCAUAAUA AGCCAAGAUU
3781 AUCUGUUUUA AUGCUUUGAG UCGUAGUUAG UUUUCUUUCU GUUGCUCCCU CUUUGAGGUU
3841 GUGCCUUUAG CAAGCACACA AAAUAUGCA UUUUAUUUUG UUCUUAAGCU UCCGUAGUGU
3901 CGUUCUGUCC GAAC

```

Beim AUG an der Position 204 – 206 handelt es sich um das Startcodon des Polyproteins. Das UAG an Position 3.522 – 3.524 ist das Stopcodon. Die Sequenz, die für das Inverted Repeat Konstrukt ausgewählt wurde ist unterstrichen.

7.3 Sequenz der RNA1 von RpRSV-g

```

1 UUUGUCUUUA AUCUCAGUCU UAUAUUGUA GCUCUCCUAU CUCUACUUGA AUCUUACUCU
61 UUUGUGAUUA UUCUUCAAUC UUUUGUGAU UCACGACAAA GUAAAGUUUG UCAGUUUUUCU
121 UUUAAUUGUU CAAAACUGG UAACAAUGGG UUGGACCUGC CCCUCUGGGG CUUGUAUGUA
181 CUCCCGCUC ACUUGGAGCA AUCGGAGAU GAAGGAAGAU GGCCUGUCCU UCACUAAGCG
241 CUGUCCUGGU GCCAUGUGUG GUGCCUUAU UGUCAGGUGG GAACCCGUUC ACGUUCACAA
301 GGCUACUGUG GUGCCUCAA CCCACUUCU UACUGUCCAA CCCAAGAGGA CAGUGGUAGC
361 CUCGACACCC CUGCGAAAGC AGGAUUGUGU CGUUGUAGUA GAGGUAGGGU CCCAGCCCU
421 CCUCUCGCUC GAAUACCCUG CUCUUGCAGG AAGGGCUCGC UCUAGUGGCG AGUUUGAUUC

```

481	CGCGCUGCUC	GCGCGAAGGC	CCUCUAAACGG	GGGCGUUACU	AGAGCACCCG	CCGGCUGGUA
541	UAAGCCGAGG	GCUGUGCGCU	CACAGCCUAC	CAAGCGGGCA	GUUCCCGCUU	GGGUUUCUGA
601	GGCCCGCCAC	CUUCUUAAGG	GGGCCUUGAA	UGGAUCAAU	GCGUUUGGUC	CACGCUACUG
661	CCGGGAUAGA	UUCCCGAAGG	CCCGCCUUGU	GUGGGCACUU	GGCAUGCUGG	CUAAGCGUGC
721	CCCUCCUUA	AUUGCCAUUG	GAAGGCAAU	GAAGAAGAGU	UUCCUGGCAC	UAAAAGCCAG
781	GAUUGCCAGU	GCACUGGCAA	AGAAACAAAG	UGCACGUGCU	GCACGCAGGC	AAGAAGCCUG
841	CAGAAAAAUC	CGCCUAGCUU	UAUGGCAGGC	GAGGGGUGUU	GCUGCCCUUG	AACGGCAACA
901	AGCGCGCCAG	ACCUCUGGGG	CUGGUUUGUA	UUCCGUGCAC	UUGUGUACGA	AGAGGGCUUC
961	GAGCCCGUUU	GUGGAAGUGC	CCAAGAGGCA	CAAGAAAAAG	GUGGUUUCUU	CACCUUCUCC
1021	UGUAUUCGUA	CAGGAGUUUC	CUGAGGACCU	UGUUGGUCCU	GAUUUCUGGG	AGACAUCUGG
1081	UCUUCUAGAC	UGUGCUGCUC	CCCUACAGCG	AAGGGAGAUU	CCAAUUCCAA	AUUUUGGGAU
1141	UGAUGAAUGC	CAGGAGCAGC	CUGGUAGGUU	UGUCUUGGGA	CCCAAGAGUC	CCUCCGUGUC
1201	ACUUGGCGAC	AACAAGCCAA	GACUGCCCAC	AUGCCCUUG	GAGGCAGUGA	AUUUGCUUUG
1261	GGCUUCUAAU	CUUUUUGAGG	AUUGGGAACU	CGAUUUUAUU	GGGCAGAUUG	UAUCGGAUGG
1321	UUUGUUGACC	UCACAAGCCU	UCCUAGAUUG	UUGUACCCUG	GUCUCUUAUU	AUGGCCAGGA
1381	GCAGAUUGUG	GAUUCUUUUC	ACUGUCUUUU	GCAGGAUUCU	GUUCCUGUUG	AGGUUGCUGA
1441	GGCGCUGGUC	GUUGAUGUGC	AAGCGCUGGA	UUUUGACGCC	GUCUUCGGAU	GUGGUUUUUC
1501	AUCUGGCGCU	CGGGGAACAC	GCGAUGCUAU	AAAAGGGUGG	AUUUUGGAUC	CAGUUAUUGU
1561	CAAGUCGACA	ACUUGGUGUA	ACACCAUCAU	UGAUACGGUG	CGUGCUUUGU	UUGAUCAGUA
1621	UUUUGCACC	UUCACAAAA	UCAUUGAUGG	CAUGUCCUAU	GUUAAUUCAC	UGUGGGCCAA
1681	AUGUAAAGAG	UGGGCUCAAU	CAGUGCUAAA	GAAUGGUUCC	CAACUGUUCU	CUGUCAUGUG
1741	GGAAACGCAU	UGUGUGAGUU	UUGUUUAUUA	CAUUACUUGC	GCAUGCACCC	UGUUGGUAGA
1801	AAAUGUGUUG	AAGGAGUUGC	GACUGAUUAC	ACGCGUUGGU	ACUCUUACCG	GCUGUGUUGU
1861	AUCUGGCGCU	CUUGGGAUUA	UAGGUUGUGG	CAUGAUUCUC	ACUAAGUGUG	AGGACCUUGC
1921	UGUAGUGUCU	GCUAGUAUCC	GAGCCUUUCU	UGGUGUGCUG	UUAUGUCCUC	CAACUAUGGA
1981	GAAAGUGGAU	UUGAACCAGU	CCCUGAUCCC	UGAAGAUGUU	CAGGCCGUGA	GUUGGACUGG
2041	UGUUGAUAGG	GUGCUUGGAG	CACUAAAUGC	CGUUGGUUCA	GGGUUGACAG	GCUUCAACUC
2101	AGACACCAUA	AUAUAUUGGG	GUAGAUUUGC	CCAAUCUUUU	GACGGUAUGA	GACGAGGGAA
2161	GGAUUGCUGU	UGCGCUCUCG	CAGCAUAUUC	UUUUGAAAAG	CUGGGCACGG	UUUACAUAUC
2221	UGUGACAGGU	AAGGAGGCGG	CUUUUUUCCA	UGAGCUAUCC	UCACUUGUUU	CCAUGUAGUG
2281	CCAGGGAUGG	UUGAAUUCU	CACGUAGAGU	GAUGGCGGAG	UCUAUAGCUU	UUGCUAAGUC
2341	UGAUGCUGUU	GCUUUUGCCA	CUGUCGAGAG	GUUGAUAAAU	GAUGGUGAGA	CCAUUCAACU
2401	GACCGCUGCU	UCUGCUCCAA	AAUCUCACUC	UAUGCAGUUU	GGUCAGAUAC	UCGUGAGGCG
2461	CUUGAGGGAA	CUCCGUACUU	UGCGGAAUGA	UAUGGCUCAU	GCUGGUUCUU	UCGAAGGGCG
2521	UAGGUGUGUA	CCUUUUUGGU	UAUAUAUCUA	CGGACCUCCG	GGAGUGGGGA	AAACCACCAC
2581	UAUGCAUGAG	UUUUCACAGG	CUUUGCUGAC	AGCCUUUGAG	UUCCCUUCUG	AUUCUUUAAC
2641	AUCCAAAAGU	GCCACUGAUA	AAUACUGGUC	GCUCUAUCGA	CGCCAAGCCC	UGGUGCAAAU
2701	AGACGAUCUU	GGUGCUAUUU	CAGAAAGUGG	UAUGGAACAG	GAGAUGAUGA	AUAUCGUUUC
2761	CUCCGCUACA	UAUAUCCUA	CUAUGGCGGU	UGCUAUAGAG	AAGACGACGC	UUUUCGAUAG
2821	CAAGUUCAUU	GUUUCUACGU	CGAAUGGUUA	CUCUGCGGGC	ACUGAUGCUA	AAAUACAUGA
2881	UCGGAAGGCA	UUUAUUCGGC	GCCGCAGAGU	GGUUAUAAAA	ACCCGUGGAA	AGGCGGGAGU
2941	AGCCUUUAU	CCCCAUGAUA	GCACCGCAGC	UGCUGAGUUC	UGCGUGAUUG	AGAGGGAUGA
3001	UAGGACUGAG	ACACCCAUUU	GGGUGCAGAG	UGGUGAGGCC	CCGGAAGACA	AGGAGAUGUA
3061	UUGGAUGGAC	UUCGCGACAA	CAGUGGCCUA	UGUCAUAGAA	CAGGCGCGAA	UCCAUCACAA
3121	UGCUGAGGAC	AUUGAGCAAG	CCCAAUAUUC	GAUGAAACAC	AGUCGUACAA	GGCAAUUGUA
3181	CCAAGUGUGU	GAGAACUACA	UUGGGGAAGU	GAAGAUGUCU	GUUGCUAAUU	UUGUGCCUGG
3241	GGAUUUGUUG	GGAGCUUGGA	AUUUGGAAGC	UAAAGGCAGG	UUCUUGUAUU	CAUGUGUUGA
3301	UGGUCGGGUU	UAUUCUUAUG	AUUCGAGCA	GAAGGCUUUA	GAUGAGGGGC	CGGUCGAUAA
3361	AACUCUAGAU	UUUGAGCAGA	UUUGUUUGGA	GAAGCUCUCC	UACACCCUAC	AAGCUGAUUU
3421	CCAGGGUGGU	CCUAAGUCCG	CAACUGCUGG	UAUAUUCUGG	CGGUCAAUGG	UCUCGGGAGA
3481	GUGCGCUGUC	GAGGGAGUGG	AUAAGUUAAA	CAAGAGUGCU	UCUCGUGAGC	AUCUUGUUUU
3541	UUUUAAAAAC	UUGUCUCUGG	CUGAUAGAGU	GUUUCUCCGC	CUCGUGCAGA	AGCGAAUUUU
3601	GCAGCUUGCG	AUGGUUGGUG	AUCCUCUGGG	AGUGAGGAGU	UAUGCGGUAA	UGAUGGAAGG
3661	AUUCCAAAGU	UCUUAACAACU	AUGUUAAGGA	GAAUGGAGGG	AGACUUUUUA	UGAUUAUUGG
3721	UAGCUUGAUG	UUGUUGGGUG	UUGCCUUCUA	UGCUUUUUUC	AAUGCUUUAG	CAAUACUCAU
3781	CGGAGGGACU	UCAGUGGCUG	CUGGGGCAGC	UGCCAUGGUU	GAUAUUGGGG	CUUGCGGUAG
3841	UACUUCUACC	UAUGCAUCAG	AUUACGGCGC	CAAGAUGGGC	CGUAGGAACA	UGCCGCAUCG
3901	CUCCAGAGAG	AUUCUGCAG	UCUGGUCUGA	AGAGGCGGGA	UACGAUGAGA	AAUGGCAACU
3961	GUGCGGUCUU	CUGGAGACCA	GCAGAAGUGA	UAUGCCCUCC	GUACAUGUGA	AUCUUGUACC
4021	GGGUAAUAAA	AUUGCCAUAA	CUAAACAUA	GGCCCUUGCC	AUUCCAGAAG	GCUCUUCUGU
4081	GGGCUUGAGU	GUGGCAGGAA	GAGUUUUUAG	AACAUCUUA	UGGCGAGCUU	CUGCGAUAAAC
4141	GGAAUAUGCU	GAGAGUGAAA	UCUGUACCUA	CUUUGAUAGU	CGAAUCCCUU	CAUUGGGGAA
4201	ACAAGCUAUG	AAGAUGUAUU	CAGAUUCUGA	UCUUGAUGCG	UUGAACGUUA	AAUAUUUUGC

4261	GACCCGGACA	CUACAUUUUA	GACUGGUGGA	GGAUCGGGUC	GAAAAGCGCC	AUUGGGAUGC
4321	GGAUGCAUGC	GUUCUUUCAA	CCCCGAAGGG	CAUUGUUUCU	ACUGUUAACG	GGGUGAAGUA
4381	UCGGCAAGAG	AUACCCACAU	CUAUCACGUA	CAAGCGUGAG	AGUGUGAAGC	ACGACUGCGG
4441	UGCACUGGUU	UUUACAGAA	UGC CGGCAA	GCCAAAAGCU	GUGGGUAUGU	UGGUGGGCAC
4501	UCUAGGGGGA	AUAACAUAUG	UGUGUAAAUU	GCCUCCCAU	GAGGUUGAUG	CUUUUGCAUG
4561	UGUCCCCGAC	AUCCGAGGUU	UUAAUCUUGA	AGCGGGAGUU	UCGACUCUUG	GCUAUUCUAA
4621	ACUUGGGUGG	CUAGAUAGGC	GGCAUCAGCC	GCACAACAGC	GAGAGAACUG	AGUUUGUGCC
4681	CAUACCAGAA	AAAUACCACA	UGGACGAUGU	UCCAUGUAAA	AUACCGGCAG	UGCUCAGUUC
4741	UAAGGAUCCA	CGGUUGGCAG	ACGUACCGCA	UUGUGAGGGU	UACGAACCUU	ACAAACAGGG
4801	CAUGGAAAAG	UUCGCUCAUC	CUAUGCAAGA	GAUAGAUGAG	CAAUUGUUGG	CCACCGUUUG
4861	CGAUGAAAUC	GCCCAGGAAU	UCCAUGAGGU	GGGUGUACGA	GGGAGGAUGG	UCUCUAUGGA
4921	UGAGGCUAUC	AAUGGUCACC	GCAAGUAUGA	UAUCCCCUCG	UUUUACGUUG	AAGGAGCCAG
4981	UACCAGAGAA	CUUAAUGAGU	UGC CGGACCUC	UUGUGGUACU	GAAGUUUGGC	ACUGUGAUCC
5041	GGGGAGUGAC	AUCGAAUUUG	AAUAUCCGCG	CAUUGUCCCU	GGUCCCAAAG	AAUCCAAAUG
5101	GAAGUGUGAG	AGUACAUGCG	UUGGUUGUAC	UGUCAGAGGC	AGUGGUACUG	AGGCCAUUGC
5161	AAAUUUUUGUC	AAGACGCGUU	CUCCAUGUCG	UGAAGAGAAU	UUCUUUGAUG	GUCUUGAUUU
5221	AACCACUUC	GAGGGCUACC	CCCUUUUCUU	GGAUCGUCCG	GCAGGGGCGA	AAGGAAAAGA
5281	AAGGUUUUUC	GAGGGUAGCG	AAAAUCAAAA	GUUCCUCAUA	CCAGAGUGCC	CGCUUGAUGU
5341	GCAGCUGCGA	AAGGGUAUUG	AGGAGACUCA	UCUUGGCACA	CCACAGCUCU	UCGUCAAGGA
5401	GAGUGCCAAG	GAUGAGUUAC	UUAAGGAAGG	GAAGGUUCUA	CCUUCUGAGG	GGAUGCCGGG
5461	AACACGGUUG	UUCUCCAUUC	GUCCGCGCUG	GUUAUUAUUC	GUUGUGCGUC	AACACUUUGU
5521	AUAUGUUGCU	GAGAGUGUGC	GCAAACGAAG	ACGUACUUUG	UCUAGUCAGG	UGGGAAUCGU
5581	UGUUGGUUCU	CGAGAGUGGG	AUGAUCUUGC	AGCACGACUU	AGGUCCAAGA	AGAAUGAUAA
5641	GAUGUCUAGC	UGCGAUUAUU	CCAAGUUUGA	UGGGCUGAUG	ACUCCCCAGA	UUUUUCAUGC
5701	UAUCACUGGC	AUUUAUGAAA	GAAUGUUCAG	UGGUAAAGAU	GGGAUGAGUC	AAUUCCGGCA
5761	GAACCUAUUG	AUGGGUAUUU	GCAAUCGUAU	CUCCAUCUGU	GGUUCACAAG	UCUAUAGAGU
5821	UGAAGCUGGU	AUGCCCUCUG	GGUUUGCCUU	GACUGUUGAU	UUCAACUCUA	UCUUCAAUGA
5881	GAUAUUGGUU	AGGUGUGCUU	AUCGUUCCCU	UGUGCCUGAC	AUUGAAAGGC	CCUUCUUUUC
5941	CAACAAUGUG	GUCUUAUUUG	UGUAUGGCGA	UGAUAAUGUU	UUGGGUAUUC	ACCCAAACAU
6001	UGAGUUGGUU	UUUAAUGGCA	ACACAAUUA	GGCAUACAUG	AAGGAGGAGU	UGGGGAUUAA
6061	AAUUACUGAU	GGUGCCGAUA	AGCUCAGCCC	UGUGAUAGAU	GCUCGUCCCC	UCGAGCAAUG
6121	CGAAUUUCUG	AAGCGUACCU	GGAGGAAAGA	UCGACAGUAU	GGCUUAUAUC	GGGCUCCACU
6181	UGUGGAGACC	AGUAUAUUUU	CAUGC UUGCG	UUAUGUACGC	CUUCAAAAUU	AUGACUGGCA
6241	GGCUCUCUG	UUGCAGAAUG	UGCAGGGAAG	UCUUUAUGAG	GCCAGUUUAC	AUGGUCCGGA
6301	AAUGCACGAU	CGUAUUUACA	AACAUUUUGC	AAUGCAUUUC	CCAAAAUGGG	UGGAGGAGCA
6361	UGAAUUGUAC	ACUUAUGAAC	AGUGUCGCAC	ACGAUUCAUU	GCUGCUAAGA	AUGGAGAUUU
6421	CAAUUUCCAC	CCGGCCUCAG	CGCAGAUUGG	CCACGUCUUC	UCCCAGCAGA	CUGAGAUAUA
6481	GGAGUUGUCU	CAGCCUCAA	AUCCAAUGAG	GUGCUUUAAA	CUCCAUGAGA	AAAUCCACGU
6541	UUGUGGUCCC	GGGCACAAUG	AAUCAGAUUG	CUUUUAUGUC	GAUGUUCGGG	UAAAAGGGAA
6601	AAUUACCAAG	GGAAAGGGCU	UCCACUGUGA	ACCUGUGUAU	UCCGCAGGCU	CUGGCCAACU
6661	UGGUACUGUU	AAGUGGGCAU	CCUCUUUCCG	CUCCUCACUA	GCAUGUCCUU	UGAGGGACUC
6721	UGCUGUUGAG	GCCUUUAAGC	GGGGAGAGUG	UAUAUACUUC	AGAGACAAUG	GUGAGUUAAU
6781	CAAUGCUUGG	UUAGCCGCUA	UUAACUUUGG	UAUGUCCAUU	AAUGCAGAUG	GGUUGGAUGG
6841	CCUUCUCCAG	GUCUAUCGCA	ACCAAGGGCC	AACACAUCUU	GAUGAUUUGA	GUUUUUACUU
6901	UGAAGGUGGU	GUUGUUGGCG	UUC CAGUCC	UGCACAUCUA	AUGGUCUAUG	GCACCGAUAU
6961	CCCGAUGCUC	AAUCGUUUUG	GUCCCAAGAC	UAUUCUUGAG	AGUGCUCCCC	CUCCUGGACG
7021	UUCAGACAAC	GUGAGUGAAC	GUGGCCAAGU	CCAGACAUUC	UUGCACAUGA	GUCCAAAACC
7081	UUGUUUUUA	ACUAUCAAGG	GCUCGCGUAA	GGUGUGCUUU	GGUUUGCGUU	GCAAAGAAAC
7141	AUGUCGGGGU	CACAUUUCGU	GCAUUGAUGU	AGUGCGCAAU	UCUGUGACCA	ACCAUAAAGC
7201	GGCGAUGCUG	GACGUGCUGA	GGAAAGGCUG	UUUUAAUAUC	CAGUAGGGGC	UGGAUUAAC
7261	UAGGCAAGCC	GGCAGACUUC	GUGUGCUGCU	ACCACGGAAU	UACGUGGUUU	UAGCUGACAC
7321	CUUACUGUCG	UUUUUAUUUU	UUGUUUUAGA	AUAAUAAUCG	GCUAGUUUCG	CCGAGAAGGA
7381	AACGUGCUGG	AGCCACACCA	AAAUUCUGAU	ACUAUAUGUU	CCGUGAAAUC	GGUAAUCAGA
7441	UAAGUGCCAA	ACUCUACGAC	GCUUUGGGGG	CGUAUGAAGU	AGAUACCCUG	UUAGUAAGG
7501	GUUCCGUGAA	AUCGGUAUGU	GGCAACUCUC	UGAAACUCAG	UCUCUAAGGU	GUGGGAGCAA
7561	CCCCUCGGCU	CCGGGUUAAC	UGAGCCAACU	AAAGCUGUGC	CAUGUGAGUU	UGUGUUUUAC
7621	ACAUGGCCCC	UACAAGUCUA	GACAACUUGU	AGGUUCAGCG	GUACUGUUA	GUGUCUUUCU
7681	UCUGGUGGUG	ACGUUCCAGA	GCAGUAUGAC	GAGUUUCCA	AUUUAUCAGU	AAAUUGGAGC
7741	CGAUUGCAGA	GUCGGUGGUG	AAAGGUGUGC	UACGGCUAGU	UCCGUAGGCA	UAAUAAGCCA
7801	AACUAUCUGU	UUUAAUGCUU	CGAGUCAUAG	UUAGAUUUUC	UUCUGUAGCU	CCUCUUUGA
7861	GGUUGUGCCU	UUAGCAAGCA	CACAAAAUA	UGCAUUUGUU	UUUGUUCUUA	AACUUCUUA
7921	GUGUUGUUCU	GUCAG				

Das AUG an der Position 146 – 148 ist das Startcodon des Polyproteins. Das UAG an Position 7.244 – 7.246 ist das Stopcodon.

7.4 Sequenz der RNA2 von RpRSV-g

```

1  UUGUCUUUAA UCUCAGUCCC AUUAUUGUAG CUCUCUUUUC UCAAUCUCUG AACCCUCUCUC
61  UUAUUGUGAU AUCUCAGCAA CAUCCUGCA CUUUGUGACA ACGUAAAGUU UUCCGGAAGU
121  UUUCUUUUAA UCGUUCAAUA AAUUUCCAAU UUUCUAUUCU UCCCUAUUUC UCUIAUAGUU
181  GUGUAUUACU GGCACAAUGU CCCAGUUCUG GGGAGAAUUC CCCGAGGCUG UUAUUAAACAC
241  CUUUCAGCGC CUGCAAAUAG CGCUGAUUGG UGACAUUAAG AGAUGUCCCC UCUCUCCCC
301  CCUCUCCCC GAGCUUCCA AGCUCGAUGC CCACUCCCAG CAUCAUCUGC UGGCUUCCUU
361  CGAACUUCCA AAGUUCGGAG GAGUUACUCC UAGCGUCAUG GAACAGCUC AUGAUGC GGA
421  GUCCGAAUUG GCUGAGGCCA AGGCAAGACU CCUUCGCGAA CGGCUACACG CGGUAGCCAA
481  CAAAGAAAAC AUCCCCUUC UUGGGGAUUG UAUUUCUAU GAUGCACCUG GCAUCAGUCA
541  GGAGGAGCUG CUUCAGGCAG CUUUUCUUGA AGCUCCCACA CCUGAGUGGG AAAGUGAACG
601  AAUAGGCCU UUGUGGCCUA AGGACGAAUG GUUUAGGGAC GCCCAACAAG GUCCCUACCC
661  UGAGGAUUUA GGUAGUAUUC CCCUGGGUGA UAUAGACACA CUGUGUCUG CUUUUGAUGC
721  UCUUGUGGAG GAACAUUGGA UGCCUAUCUA CCUGAUGAUA UCCACGUUUG CCACGUUUA
781  GCAGUAUGGU ACUCACCCAC UAUUGCUGGA AUGUGUGCAA UCUGCAGGUA GUCUGAUUCC
841  UGCGUGCAUG AUGACUGACC AUCACCUACA ACCAACGGGU GAUAGGCAGG CCGACAAGGA
901  AGAGCGGCAG GAUUAUGCGG ACAGCCAGGA CUCUAUUCAG AGCAUGGGUG AUUUCUGGAA
961  GGAAUUCUAU UCAAAGGAU CUGGAAAGAA AAUCCUGAC UCCCAACAAG CAAGGCUGGC
1021  UAAUGAUCCC AACAAAGUUG GUUUUACGAA GAGUGCGCUU UCCAUAAAG AGCCCCUGGC
1081  GCAUUCUAUA GCUCAAACUU GGGCUAACUU UAGGGGUACC CAGGAUAAGG CGGACCUGGU
1141  CAAAGUGACC AUGGACAUGA AUUUGAGAA AUUAUCUGUC CGUCUCCCCG AUGCAGUUCG
1201  UACUACGGCA GGACCACUAU ACAUUGAGUG GAUUAUUCUG CCACGAAUGU CUGAAAAUUC
1261  UGCACGUAAA CUAGCAGAA GUGGGUGGAA CAAUGCAGAU AUUUGUGGGG UGGAUCUUGC
1321  CGUGAAGUCG CAUGUUGCAG UUGGCACGCC AGUCCGUGUU AUCAUCUCUU UGGUAGAUGG
1381  UGCAUGCUCU GAUAUGCCCA CGGCAACGAU GUGCGCUUUU GAGGUGAACU UGGCAACACA
1441  GAACAACCGG UCACUAAAU UCUCGUGCU UAGUUUACCC UUCUCACAAC UGCUCGCCGA
1501  UUUGCAUGAU UUCAACAUC GUGUCAAGAU CGCUUGCCAA UUUCGGGACC CGGAAGGAUU
1561  CAAUGUGGGU ACUCCAUGU UGAGUUUUUC CUCGCUCGAA UUUUCUGAGC UGAAGCAAAC
1621  CGCUUUCGAG CGGAAAUUU UACUCAGAGA UUCUGGUUCU GAAAUAGAAA AGCGUGCUUG
1681  CCAUGGUGGA GGACGUUGUA UCGCCUCCCA GGUUAUUGUG CAGACCUGGG AGAAGGAGAU
1741  UAAUCCUCCU UAAAAAGAA AUGCACCCUU GUUUUACCU CCCGUUCCCC AGCCCAGAAG
1801  GAACUUUAUU GGCCAACA AUUGGGAGGU UGUCAAACCA UGGCUUCCAA AGUCCCGCUC
1861  CAUGCGAUUU AAUUCGCCA CUGAUUUUUG GAGCAGGCC UCUGUAGAUG GGGGUUCAAC
1921  AUCUACCGUG GUUACAGGAA CUGAACAUU GCGUUGCGAU GAUGUACCAG GUUGUGCGUA
1981  UGAGGUCGAU CCUCUGCACC UCCUAUAUUA UGCAAGUGUU GACGUUCCUA AAGAUACUCU
2041  UGAAGGCACU AGGCUUGCGC GUUUUGAUUU GCGCGCAAAG GCUCAGGAAA UGGAUAGUGC
2101  CGUGUGGCGC CAGUGGGUUA AAGAAGGGUG UAUAGAGCCG CGCAUUAAGA UCCGUUAUUC
2161  AGCGGCUACC UCCGUUUUUU CUGGCGUAGU UCUAGGAAUG UGCCUGGAUG CUUAUCGCAG
2221  AAUCCCUAUC AUGCGUGAUA AAGGAUUUAG CGCCAUCUUU GUCACAGGUC UUCUAAUAC
2281  UAUUGGGGCG ACCCGCACGC AGGCGGAACU UGAUUGGGAU CUUGACCUUU CACAGGAGUG
2341  UGGCAUAGC UUCUACGCC UAUCUGACAC CCUUGGGUAC AUGGAUUUUU UAAUCUACGU
2401  ACUCAGGGGU AAUGAAAUGA CGGCAGUAGC AGACUGGUCA UUUUAUGUGG CCUUCUAUGU
2461  GGACUGGUCC CAGGAGAGUU UUACUGCAAU GCUUGCUCCA ACAUUGAAGU GGCCUCCAC
2521  ACCGGGAUA AUAUCCAUU UUAAGGAAGU GCGAGGACCU UAUUCUUUA GUCUUGAUGG
2581  UACCAAAGCA CGCCUUGAUU UUGUUUUUUU ACCUGGUGU UCCCUUGUUG AAGGUAGUGA
2641  AACCGUGAGG ACCUGUCCUC GUGUUCUCGC UAGCUUUUAC CGUUAUGGA CUGGCAAAU
2701  GAGGAUUUCC AUAGAGGAAG UUUCUCUAU UUUCUCACC GGUUCAUAUA UGUUAGGGGU
2761  UGCAUGGAU GCUGGGGAUG AUCUUGGUGG AAUACCACC CGGAAACA AUUGAUGGUCAA
2821  AUCAGGGGAG AUCUUUGAUU UAGAUCUGUA UGGGCCCAU GGAGAAUAUC CCACCUUUGC

```

```
2881 AGGUAAAGCA AAUGGUACAC CAUAUAUCGU UGUGCAGAAG GUUGGGGGUA UCGUUGGUCC
2941 AAAGGAUUCU ACUGGAUCUU UUGGUUUUUU CCUGCAUAUC CAUGGCAUGA CAGGAAUUUA
3001 CAAGAAUCCC ACUCUUCACA GUCCGAGCG GGGUCAA AUG CAUGCAUGGU UUCGUAUGAA
3061 UAAUAUCCAG GUGGACAAUU UGUCCUUUAG CAUACCUUGU AGGAUUGAGG AUAUGAGUGC
3121 GCUGGCAGGG AGUUAUGACA UCACGAAUUA CGUAAACCCU GCCAGCCUUU UGUUUUCCGU
3181 CACUGGCCUA CAUGGUGGUA CUAUCAGGUU GCAUGUCACC UGGUGUCCCA AGACCAUUU
3241 GGGUGAAUCC AAAGGUACUC UUAAGUACAU GCAGUAUUUG UAUCACACGA AUACUGUUAG
3301 UUACUAUGGA GAUCAAGCCA CACGUGGACU CAUAGAUCU GAUGGAUUA AAUGUGAGUU
3361 ACGCUGUGGC GAUUUCUUUG GUGCAACCAA UAUAGCCAUG GUAGGUGAUG UUGAACGAUU
3421 GGCUAUCCAC UCCGCCAAUG CCACUUUUUAU UUCUGAAAUA CGUGUUUCCU UUGAAAUUCU
3481 UGAGAUGAGU UUCUAUGGGA AAACUAUUAA GGUCUCAUGA GGUGGUACUG AUUACCCUAU
3541 GGCUCCGGGU UAAUUGAGCC AACUAAAGCU GUGCCAUGUG AGUUUGUGUU UUACACAUGG
3601 CCCCACAAG UCUAGACAAC UUGUAGGUUC AGCGGUACUG UUAAGUGUCU UUCUUCUGGU
3661 GGUGACGUUC CAGAGCAGUA UGACGAGUUU UCCAAUUUAU CAGUAAAUUG GAGCCGAUUG
3721 CAGAGUCGGU GGUGAAAGGU GUGCUACGGC UAGUCCGUA GGCAUAAUAA GCCAAACUAU
3781 CUGUUUUAAU GCUUCGAGUC AUAGUUAGAU UUCUUUCUGU AGCUCCUCU UUGAGGUUGU
3841 GCCUUUAGCA AGCACACAAA AAUAUGCAUU UGUUUUUGUU CUUAAGCUUC CUUAGUGUUG
3901 UUCUGUCCGA AC
```

Beim AUG an der Position 197 – 199 handelt es sich um das Startcodon des Polyproteins.
Das UGA an Position 3.518 – 3.520 ist das Stopcodon.

Danksagung

Herrn Dr. Götz Reustle für die Überlassung des Themas, die Einführung in die Gewebekulturtechniken sowie den Anregungen und der freundlichen Unterstützung

Frau Dr. Gabi Krczal für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Centrum Grüne Gentechnik

Herrn Prof. Dr. Buchenauer für die Bereitschaft zur Übernahme der Zweitkorrektur

Herrn Prof. Dr. Blaich für seine Zusage als Prüfer der Arbeit mitzuwirken

Herrn Dr. Thierry Wetzel für die Betreuung des molekularbiologischen Teils der Arbeit

Den Mitarbeitern des Centrums Grüne Gentechnik für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre im Institut

Anke Schnabel für die Sequenzierungen im Rahmen ihrer Diplomarbeit

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Böhm für die Hilfeleistungen sowohl bei der Arbeit als auch beim Formatieren und Ausdrucken der Doktorarbeit

Die Arbeit wurde von der „Stiftung Innovation Rheinland-Pfalz“ sowie der „Wiederaufbaukasse rheinland-pfälzische Weinanbaugebiete“ finanziert

Lebenslauf

Persönliche Daten	geboren am 29. November 1972 in Neustadt an der Weinstraße, nicht verheiratet
Beruf	
Seit 15.08.02	„Technical Sales Representative“ bei Invitrogen
Promotion	
09/99 – 08/02	Promotion an der Staatlichen Lehr- und Forschungsanstalt Neustadt an der Weinstraße, Abteilung Centrum Grüne Gentechnik Thema: „Molekularbiologische Analyse des Himbeerringflecken Nepovirus (RpRSV) und Herstellung eines Konstrukts zur Induktion von RpRSV–Resistenz in Reben“
30.07.2003	Abschlussprüfung der Doktorarbeit; Bewertung: Magna cum laude
Studium	
10/93 - 08/99	Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim / Stuttgart
09.08.99	Abschluss: Diplom-Agrarbiologe
Praktika / Berufliche Tätigkeiten	
04/97 – 07/99	Mercedes-Benz Shops, Stuttgart; Kundenberatung und Verkauf, Vertretung der Geschäftsführung
07/96 – 10/96	Praktikum bei der BASF AG in Ludwigshafen, Unternehmensbereich Düngemittel
07/93 – 09/93	Praktikum an der Staatlichen Lehr- und Forschungsanstalt Neustadt an der Weinstraße, Abteilung Weinbau
Wehrdienst und Schule	
07/92 – 06/93	Wehrdienst
25.06.1992	Abitur am Kurfürst–Ruprecht–Gymnasium in Neustadt an der Weinstraße

Erklärung:

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Stuttgart, den 17. April 2003

(Rainer Ebel)