

P1/HC-Pro
aus dem Weizenstrichelmosaikvirus
als Suppressoren des RNA *silencing*
in Weizen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
an der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Dipl. Biol. Ulrich Sentner

Januar 2008

Diese Arbeit wurde in der Zeit von April 2003 bis Januar 2008 am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Dr. h.c. em. Erwin Beck an der Universität Bayreuth angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Tag der Zulassung zur Promotion: 30.04.2008

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. em. Erwin Beck

Zweitgutachter: Prof. Dr. Stephan Clemens

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2008

Vorträge und Poster, in denen Bestandteile dieser Arbeit vorgestellt wurden:

- 2004 Herbsttagung der Gesellschaft für Molekularbiologie und Biochemie, Münster:
Vortrag und Posterpräsentation
- 2004 Deutsche Botanikertagung (Deutsche Botanische Gesellschaft), Braunschweig:
Posterpräsentation
- 2006 Plant Genetics Conference (Gesellschaft für Genetik, Gesellschaft für
Pflanzenzüchtung), Kiel: Posterpräsentation

Assoziierte Diplomarbeiten:

- 2003 Ulrich Sentner (konstitutive Expression von *p1/hc-pro* in Weizenembryonen)
- 2005 Ralf Anders (subzelluläre Lokalisierung von P1 und HC-Pro)
- 2005 Susanne Salomon (konstitutive Expression von mutiertem *p1* bzw. *p1/hc-pro*
sowie von *p1* allein und *hc-pro* allein in Weizenembryonen)

Abkürzungen

AGO	<i>Argonaute</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
casiRNA	<i>cis-acting siRNA</i>
CI	<i>Cylindrical inclusion protein</i>
CIMMYT	<i>Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo/ International Maize and Wheat Improvement Center</i>
cRDRP	<i>cellular RNA-dependent RNA polymerase</i>
CP	<i>Coat protein</i>
DCL	<i>Dicer like</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome chromosomal region 8</i>
dsRNA	<i>double stranded RNA/ doppelsträngige RNA</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations/ Welternährungsorganisation</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GUS	<i>Glucuronidase</i>
H ₂ O _{bidest}	<i>bidestilliertes Wasser</i>
HC-Pro	<i>Helper-component proteinase</i>
IR	<i>inverted repeat</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
MP	<i>Movement protein</i>
nat-siRNA	<i>natural antisense transcript siRNA</i>
NI	<i>Nuclear inclusion proteinase</i>
P1	<i>Protein1</i>
P3	<i>Protein3</i>
PAZ	<i>piwi-argonaute-zwille</i>
PPT	<i>Phosphinotricin</i>
PTGS	<i>post-transcriptional gene silencing/ post-transkriptionales gene silencing</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
RDR, RDRP	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
rgs-CaM	<i>regulator of gene silencing Calmodulin-like protein</i>

Abkürzungen

RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi	<i>RNA interference/ RNA-Interferenz</i>
RT	Raumtemperatur
SC	<i>single copy</i>
SEL	<i>size exclusion limit</i>
SGS	<i>suppressor of gene silencing</i>
s-PTGS	<i>sense PTGS</i>
sRNA	<i>short RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
tasiRNA	<i>transacting siRNA</i>
TE	<i>transposable element</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TGS	<i>transcriptional gene silencing/ transkriptionales gene silencing</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
VIGS	<i>virus induced gene silencing/ virus-induziertes gene silencing</i>
VPg	<i>Virus protein, genome linked</i>
vRDRP	<i>viral RNA-dependent RNA polymerase</i>
WSMV	<i>Wheat streak mosaic virus/ Weizenstrichelmosaikvirus</i>
XVE	chimärer Transkriptionsfaktor (X: DNA-Bindungsdomäne des bakteriellen Repressors LexA, V: Transkriptionsaktivierungsdomäne VP16, E: regulatorische Region des menschlichen Östrogenrezeptors)

1	Einleitung	6
1.1	Weizen – Bedeutung und Züchtung	6
1.2	Weizen – Züchterische Verbesserung mittels <i>genetic engineering</i>	7
1.3	Geringe Expression von Transgenen in Weizen.....	9
1.4	<i>Gene silencing</i>	11
1.5	RNA <i>silencing</i> (Posttranskriptionales <i>gene silencing</i>)	11
1.6	Modell des RNA <i>silencing</i>	12
1.6.1	microRNAs	13
1.6.2	<i>transacting</i> siRNA	14
1.6.3	<i>natural antisense transcript</i> siRNA.....	14
1.6.4	<i>cis-acting</i> siRNA	14
1.6.5	dsRNA-produzierende Transgene und IR-PTGS	15
1.6.6	<i>sense</i> PTGS und transitives <i>silencing</i>	17
1.7	Interaktionen zwischen Viren und RNA <i>silencing</i>	18
1.8	Virale Suppressoren des RNA <i>silencing</i>	19
1.9	Der potyvirale Suppressor P1/HC-Pro	22
1.10	Problemstellung	23
2	Material und Methoden	29
2.1	Chemikalien & Molekularbiologische Reagenzien	29
2.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.1	Agarosegelelektrophorese	29
2.2.2	Konzentrationsmessung von Nukleinsäure-Lösungen	29
2.2.3	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	29
2.3	Konstruktion von Expressionsvektoren.....	30
2.3.1	<i>E. coli</i> -Stämme	30
2.3.2	Oligonukleotide	31
2.3.3	Plasmide	33
2.3.4	Antibiotika	37
2.3.5	LB-Medium	37
2.3.6	Herstellung kompetenter Zellen	38
2.3.7	Isolierung von Plasmid-DNA	38
2.3.8	Vektoren zur konstitutiven Expression.....	40
2.3.9	Vektoren zur Expression des mutierten <i>p1/hc-pro</i> bzw. <i>p1</i>	44
2.3.10	Vektoren zur subzellulären Lokalisierung.....	47
2.3.11	Vektoren zur induzierbaren Expression	49
2.3.12	Anlegen von Bakteriendauerkulturen.....	51
2.4	Biolistische Transformation von Weizen	51
2.4.1	Verwendete Kultivare.....	51
2.4.2	Anzucht des Pflanzenmaterials.....	51
2.4.3	Plasmide	51
2.4.4	Partikelbeschuss	53
2.4.5	Transiente Transformation	54
2.4.6	Stabile Transformation	56
2.5	Analyse der transgenen Weizen-Pflanzen	62
2.5.1	Aufzucht	62
2.5.2	Extraktion genomischer DNA	62
2.5.3	PCR.....	63
2.5.4	Nachweis der β -Glucuronidase Aktivität	64
2.5.5	Estradiol-Induktion.....	65

2.5.6	Phänotypische Untersuchungen.....	66
2.6	Bioinformatische Methoden	66
2.7	Statistische Auswertung	67
3	Ergebnisse.....	68
3.1	Konstitutive Expression viraler Suppressoren (transiente Transformation).....	68
3.1.1	Konstitutive Expression von <i>p1/hc-pro</i>	69
3.1.2	Konstitutive Expression von mutiertem <i>p1/hc-pro</i> bzw. <i>p1</i>	73
3.1.3	P1/HC-Pro bzw. P1 verstärken die Expression von <i>gfp</i>	75
3.2	Lokalisierungsstudien	75
3.2.1	Cytoplasmatische Lokalisierung eines P1:GFP-Fusionsproteins	75
3.2.2	Cytoplasmatische Lokalisierung eines HC-Pro:GFP-Fusionsproteins.....	78
3.3	Stabile Transformation	79
3.3.1	Konstitutive und induzierbare Expression viraler Suppressoren.....	79
3.3.2	Auswahl transgener Linien für weitere Untersuchungen	86
3.3.3	Induktion der Expression von <i>p1</i>	88
4	Diskussion	96
4.1	Konstitutive Expression von <i>p1</i> und <i>p1/hc-pro</i> (transiente Transformation).....	96
4.1.1	P1/HC-Pro und P1, nicht jedoch HC-Pro wirken als Suppressoren des..... RNA <i>silencing</i>	97
4.1.2	Mutiertes P1/HC-Pro und mutiertes P1 zeigen keine Suppressoraktivität	100
4.2	Cytoplasmatische Lokalisierung von Suppressor-GFP-Fusionsproteinen	102
4.3	Konstitutive und induzierbare Expression viraler Suppressoren	
	(stabile Transformation)	108
4.3.1	Einfluss der Suppressoren auf die Transformationseffizienz	109
4.3.2	Induzierbare Expression von <i>p1</i> in transgenem Weizen	111
4.3.3	P1 als Suppressor des RNA <i>silencing</i>	115
4.4	Ausblick.....	117
5	Zusammenfassung	120
6	Conclusion.....	123
7	Glossar.....	126
8	Anhang	128
9	Bibliographie	129

1 Einleitung

1.1 Weizen – Bedeutung und Züchtung

Weizen ist nach Mais und Reis die für die Ernährung der Menschheit weltweit wichtigste Kulturpflanze. Diese Bedeutung ergibt sich aus den Produktionszahlen, die für Weizen im Jahr 2003 bei 556.349.000 Tonnen lagen, verglichen mit 683.043.000 Tonnen für Mais und 589.126.000 Tonnen für Reis (Tabelle B.06, FAO Statistical Yearbook 2004). Weizen deckt neben Reis unter den zehn wichtigsten pflanzlichen Lebensmitteln den weitaus größten Anteil am täglichen Energiebedarf eines Menschen ab (Tab. D09, FAO Statistical Yearbook 2004).

Weizen blickt auf eine lange Geschichte der Kultivierung und Züchtung durch den Menschen zurück. Spätestens im 7. vorchristlichen Jahrtausend wurden in Vorderasien Einkorn-Weizen (*Triticum monococcum*) und Emmerweizen (*Triticum turgidum*) zusammen mit Gerste in Kultur genommen. Hexaploider Saatweizen (*Triticum aestivum* L.) mit der Genomformel AABBDD und einer Chromosomenzahl von $2n = 6x = 42$, der heute einen Anteil von etwa 95 % an der gesamten Weizenproduktion hat, entstand vor etwa 7000 Jahren am Kaspischen Meer durch Kreuzung von *Aegilops tauschii* und kultiviertem Emmer (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*), wobei ersterer zum einen das D-Genom beitrug und zum anderen die Backfähigkeit des Weizens ermöglichte. Der tetraploide Wildemmer (*T. turgidum* ssp. *dicoccoides*) mit der Genomformel AABB, aus dem sich durch Züchtung der kultivierte Emmer entwickelte, ging seinerseits lange zuvor aus der Kreuzung des diploiden *T. urartu* (AA) mit dem diploiden *Ae. speltoides* (BB) hervor (Zeller und Friebe, 1991; Gill und Friebe: Cytogenetics, phylogeny and evolution of cultivated wheats. in: Bread Wheat – Improvement and Production, Hrsg. B.C. Curtis, 2002; Bhalla, 2006).

Obwohl die Produktivität des Weizens während dieser langen Kultivierung durch den Menschen schon beträchtlich gesteigert wurde, stieg in der 2. Hälfte des 20. Jahrhunderts die Gesamtproduktion von Weizen nochmals um insgesamt 150 % mit einer durchschnittlichen jährlichen Steigerungsrate von etwa 1 % an. Dieser Zuwachs ist hauptsächlich auf einen erhöhten Ertrag pro Fläche von 1 Tonne pro Hektar im Jahr 1951 auf 2,5 Tonnen pro Hektar im Jahr 1995 zurückzuführen, da die bebaute Fläche insgesamt

nicht gesteigert werden konnte. Einen großen Anteil an der Ertragssteigerung hatten die Anwendung verbesserter Kultivierungsmethoden sowie die Entwicklung ertragreicherer Sorten durch Sir Norman Borlaug (International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Mexiko), der als Mitbegründer der „Grünen Revolution“ Anfang der 1960er Jahre insbesondere in Entwicklungsländern zu einem Produktivitätsschub beitrug – Eine Arbeit, für die ihm im Jahre 1970 der Friedensnobelpreis verliehen wurde. So stieg beispielsweise der Ertrag in Indien von 1,0 Tonnen/Hektar im Jahr 1961 auf 2,1 Tonnen/Hektar im Jahr 1996 (Curtis: Wheat in the world. in: Bread Wheat – Improvement and Production, Hrsg. B.C. Curtis, 2002).

Züchtungsziele

In der Zukunft warten allerdings noch größere Herausforderungen: man erwartet, dass die Weltbevölkerung sich bis 2050 verdoppeln wird, was bedeutet, dass die Nahrungsmittelproduktion gleichermaßen auf derselben Fläche kultivierbaren Lands angehoben werden muss. Die hierzu erforderliche jährliche Steigerung der Weizenproduktion von 2,5 % kann nur durch eine Steigerung der Produktivität erreicht werden, da die Fläche kultivierbaren Lands insgesamt kaum erhöht werden kann. Im Fokus der Züchtung stehen die Erhöhung der Stresstoleranz (insbesondere Trockenheits- und Salztoleranz sowie Pilzresistenz), Herbizidresistenz und eine verbesserte Kornqualität, was jedoch durch konventionelle Züchtung alleine nicht in dem erforderlichen Umfang geleistet werden kann (Curtis: Wheat in the world. in: Bread Wheat – Improvement and Production, Hrsg. B.C. Curtis, 2002; Bhalla, 2006).

1.2 Weizen – Züchterische Verbesserung mittels *genetic engineering*

Biotechnologische Methoden können einerseits eingesetzt werden, um mittels molekularer Marker die konventionelle Züchtung zu beschleunigen, da die für Kreuzungen eingesetzten Linien im Voraus sehr genau auf gewünschte Merkmale selektiert werden können, wenn die Marker eng mit Merkmal verbunden sind; andererseits, um mittels *genetic engineering* neues genetisches Material in das Weizengenom einzuführen und damit stabil transformierte, transgene Weizenpflanzen zu erzielen. Insbesondere der Einsatz der letzteren Methode führte in der Vergangenheit zu kontroversen öffentlichen Debatten über den Nutzen und die Gefahren genveränderter Lebensmittel.

Züchterische Verbesserungen von Weizen durch molekulargenetische Methoden verzeichnen einen relativ langsamen Fortschritt verglichen mit anderen Feldfrüchten wie Mais, Reis oder Tomate. Die im Vergleich zu anderen Pflanzen geringere und instabilere Expression durch *genetic engineering* eingebrachter Gene in transgenen Weizenpflanzen wird auf das große, komplexe und hexaploide Genom und den sehr hohen Anteil repetitiver Sequenzen zurückgeführt. Die Entwicklung molekularer Marker wird zudem durch den geringen Grad an Polymorphismen behindert. (Hoisington *et al.*: The application of biotechnology to wheat improvement. in: Bread Wheat – Improvement and Production, Hrsg. B.C. Curtis, 2002).

Weizen war eine der letzten wichtigen Feldfrüchte, die erfolgreich stabil transformiert werden konnten (Vasil *et al.*, 1992). Die Durchführung und Etablierung der Transformationsmethode ist im Vergleich zu Mais und Reis noch immer sehr schwierig und weit von einer Routineanwendung entfernt. Die geringen Fortschritte in der Entwicklung eines effizienten und reproduzierbaren Transformationssystems in Weizen werden im wesentlichen auf 3 Gründe zurückgeführt: Die genotyp-abhängige Regeneration von Pflanzen in Gewebekultur, eine allgemein geringe Transformationseffizienz (d.h. geringe Anzahl erhaltener transgener Pflanzen pro verwendetem Explantat) und eine instabile Expression der Transgene, die oft teilweisem oder vollständigem *silencing* unterworfen sind (Iyer *et al.*, 2000; Ingram *et al.*, 2001; Sahrawat *et al.*, 2003; Shewry und Jones, 2005; Bhalla *et al.*, 2006; Bhalla, 2006).

In Transformationsversuchen werden daher oft Modell-Sommerweizen mit einer relativ höheren Transformationseffizienz verwendet, die jedoch landwirtschaftlich wenig genutzt werden. Während in „Laborweizen“ wie ‚Bobwhite‘ Transformationsraten von bis zu 70 % erzielt werden (Pellegrineschi *et al.*, 2002), liegen die entsprechenden Raten bei kommerziellen Kultivaren üblicherweise zwischen 0,1 % und 8 % (Sahrawat *et al.*, 2003; Bhalla *et al.*, 2006). Die Höhe der Expression der Transgene und das Auftreten von *gene silencing* in transgenem Weizen sind generell nicht vorhersagbar (Shewry und Jones, 2005).

Obwohl intensiv an der Behebung dieser Schwierigkeiten gearbeitet wurde, wurde ein Durchbruch in Hinsicht auf kommerzielle Anwendbarkeit bisher nicht erzielt. Während für transgenen Mais in den U.S.A. bereits 43, in der E.U. 12 und für Reis weltweit 6

Sortenzulassungen erteilt wurden und weitere Zulassungsanträge gestellt werden, wurde bisher nur eine transgene, herbizidresistente Weizenlinie in den U.S.A. zugelassen; weitere Zulassungsanträge wurden zurückgezogen (Stand Januar 2008, www.transgen.de). Eine zweite wichtige Verbesserung wurde vor kurzem von Dr. Alessandro Pellegrineschi (CIMMYT) erzielt, der die Trockenheitstoleranz von Weizen durch das Einbringen des Transkriptionsfaktors DREB1A erfolgreich erhöhen konnte (Pellegrineschi *et al.*, 2004; Bhalla *et al.*, 2006), allerdings ist noch nicht absehbar, ob eine kommerzielle Nutzung erfolgen wird.

Aufgrund der enormen wirtschaftlichen Bedeutung von Weizen wird trotz dieser Risiken und Hürden die züchterische Verbesserung durch Weizentransformation weltweit mit vorrangigem Interesse vorangetrieben. Neben großen Industrieunternehmen haben sich auch öffentliche Institutionen wie das International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Mexiko, oder Primary Industries Research Victoria (PIRVIC), Australien, als internationale Forschungszentren für die züchterische Verbesserung von Weizen mittels *genetic engineering* etabliert.

1.3 Geringe Expression von Transgenen in Weizen

Es gibt zwei mögliche Gründe für eine schwache Expression der Transgene: den sogenannten Positionseffekt und *gene silencing*.

Es ist allgemein bekannt, dass Pflanzen, die durch unterschiedliche Transformationsvorgänge erzeugt wurden, eine unterschiedliche Expression der Transgene zeigen. Diese wird auch durch den Integrationsort der eingebrachten Gensequenz in die genomische DNA bestimmt. Falls die Umgebung beispielsweise durch eine starke Methylierung von Cytosinresten oder eine dichte Packung der DNA durch das Chromatingerüst geprägt ist, ist eine niedrige Expression des Transgens zu erwarten, ein Phänomen, das als Positionseffekt bekannt ist (Nagy *et al.*, 1985; Yoder und Goldsbrough, 1994; Gelvin, 1998). Aufgrund des komplexen hexaploiden Genoms und des hohen Anteils von 70 % an transponierbaren Elementen in Weizen (Bhalla, 2006) ist es wahrscheinlich, dass Transgene vermehrt in Bereiche eingebaut werden, die ursprünglich ein geringes Transkriptionsniveau aufweisen. Dies könnte bewirken, dass relativ viele Transgene selbst unter Kontrolle eines starken Promoters in Weizen nur schwach exprimiert werden. Eine Tendenz des präferentiellen Einbaus der Transgene in schwach oder

stark transkribierte Bereiche des Genoms ist nicht bekannt. Da die Transformations-effizienz in Weizen allgemein niedrig ist, wäre es aus dieser Sicht nicht erstaunlich, dass Pflanzen mit einer hohen Expression des Transgens unter den wenigen produzierten Pflanzen selten sind.

Man vermutet, dass die geringe und instabile Expression von Transgenen in Weizen auch durch die Eigenschaft des Weizens hervorgerufen wird, die Expression fremder Genen unterdrücken zu können (*silencing* der eingebrachten Transgene).

Im Vergleich zu anderen Pflanzen könnte die Genexpression des hexaploiden Genoms einen effizienteren Steuerungsmechanismus erfordern, dem auch ein Transgen unterworfen werden könnte. Die beträchtliche Größe des Weizengenoms, das mit 16 Gb etwa 160-mal bzw. 40-mal und 8-mal größer ist als die diploiden Genome von *Arabidopsis thaliana* (100 Mb) bzw. Reis (450 Mb) und Mais (2,5 Gb) beruht auf einem sehr hohen Anteil an transponierbaren Elementen (70 % im Vergleich zu 22 % in Reis), deren Nichtverbreitung vermutlich eine starke Kontrolle mittels *gene silencing* erfordert.

Bei Einbau fremder DNA in das Weizengenom treten oft Rearrangements der eingebrachten DNA auf. Dadurch können deletierte Gene sowie *inverted repeats* entstehen. Bei Transkription dieser Bereiche produzierte aberrante mRNA oder doppelsträngige RNA (dsRNA) könnte mittelbar über eine zelluläre RNA-abhängige RNA-Polymerase (cRDRP) oder im Falle von dsRNA auch unmittelbar als Substrat für Dicer dienen, womit der Prozess des posttranskriptionalen *gene silencing* (RNA *silencing*) in Gang gesetzt werden könnte, der zum Abbau der gebildeten mRNA führt (siehe Abschnitte 1.5 und 1.6). Es wird allgemein vermutet, dass bei Transformation von Weizen durch Partikelbeschuss solche Rearrangements gehäuft auftreten (siehe Abschnitte 1.6.5 und 1.6.6).

Des Weiteren wird Weizen zwar von etwa 30 Viren befallen, von denen aber nur wenige einen starken wirtschaftlichen Schaden verursachen (Henry und Plumb: Barley yellow dwarf luteoviruses and other virus diseases, in: Bread Wheat – Improvement and Production, Hrsg. B.C. Curtis, 2002). Da RNA *silencing* auch als Verteidigungsmechanismus der Pflanzen gegen Viren verstanden wird, deutet die hohe Resistenz gegen Virenbefall auf ein effizientes RNA *silencing* des Weizens hin.

1.4 *Gene silencing*

Unter *gene silencing* versteht man allgemein eine verminderte Genexpression. Man unterscheidet grundsätzlich 2 Arten des *gene silencing*, die auf unterschiedlichen Ebenen der Genregulation wirken: transkriptionales *gene silencing* (TGS) bewirkt eine verringerte Genexpression durch verminderte Transkription mit reduzierten Mengen sowohl an ungespleißter Vorläufer-mRNA als auch damit einhergehend reifer mRNA; bei posttranskriptionalem *gene silencing* (PTGS) oder *RNA silencing* wird ein Gen zwar unvermindert transkribiert, die reife mRNA jedoch abgebaut oder die Translation inhibiert. Bei der Regulation der Genexpression (hier insbesondere mittels TGS und PTGS) spielt nicht-kodierende RNA eine wichtige Rolle, eine These, die bereits früh postuliert worden war (Jacob und Monod, 1961; Britten und Davidson, 1969), dann aber nach der Entdeckung der Genregulation mittels Proteinen in Vergessenheit geraten war.

1.5 *RNA silencing (Posttranskriptionales gene silencing)*

Im Jahr 1990 wurde der Effekt von posttranskriptionalem *gene silencing* zuerst in transgenen Petunien beobachtet, die Ursachen des Effekts allerdings noch nicht verstanden. Durch Überexpression von Chalconsynthase, einem Schlüsselenzym der Anthocyan-Biosynthese, sollten transgene Petunien mit stärker purpur gefärbten Blüten erzeugt werden. Überraschenderweise hatten die Pflanzen stattdessen weiße Blüten, ein Phänomen, das als „Cosuppression“ beschrieben wurde, d.h. sowohl die Expression des endogenen Gens als auch des Transgens war vermindert (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). Van Blokland konnte nachweisen, dass die geringe Expression der Chalconsynthase in transgenen Petunien durch einen Abbau von mRNA verursacht wurde (van Blokland *et al.*, 1994).

Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus wurde allerdings erst ab Mitte der 1990er Jahre durch Untersuchungen der RNA-Interferenz (RNAi) an *Caenorhabditis elegans* aufgedeckt. Guo und Kemphues (1995) fanden, dass nicht nur durch die Injektion von *antisense* mRNA, sondern überraschenderweise auch von *sense* mRNA oder einer Mischung aus *sense* und *antisense* mRNA die Expression eines endogenen Gens unterdrückt werden kann. 1998 veröffentlichten Andrew Fire und Craig Mello die Entdeckung, dass doppelsträngige RNA die Expression eines Gens sehr effizient vermindert, wofür ihnen 2006 der Medizin-Nobelpreis verliehen wurde (Fire *et al.*, 1998). Inzwischen wurde bestätigt, dass durch dsRNA vermittelte RNA-Interferenz nicht nur in

C. elegans hervorgerufen werden kann, sondern in nahezu allen eukaryotischen Organismen mit Ausnahme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. RNA *silencing* stellt einen konservierten Mechanismus der Genregulation in Eukaryoten dar, der der Verteidigung gegen Viren und zur Kontrolle von Transposons und Transgenen dient (Plasterk, 2002) und darüber hinaus eine Bedeutung in der Steuerung der Entwicklung eines Organismus durch sogenannte microRNAs hat (Chen und Meister, 2005); der Ausdruck RNA *silencing* wurde von Baulcombe eingeführt (Hamilton *et al.*, 2002), um die Phänomene posttranskriptionales *gene silencing* in Pflanzen, RNA-Interferenz in Tieren, *quelling* bei Pilzen (Cogoni *et al.*, 1996) und Algen (Wu-Scharf *et al.*, 2000) unter einem gemeinsamen Begriff zusammenzuführen.

1.6 Modell des RNA *silencing*

Einen Überblick über Gemeinsamkeiten und Unterschiede des Mechanismus des RNA *silencing* in den verschiedenen eukaryotischen Reichen geben Hammond (2005) und Susi *et al.* (2004).

Doppelsträngige RNA wird durch ein Enzym des RNaseIII-Typs mit der Bezeichnung Dicer in kleine RNA-Stücke von ca. 21 nt Länge gespalten, die sogenannten „kleinen interferierenden RNAs“ (*small interfering RNA*, siRNA) (Bernstein *et al.*, 2001). Dicer besitzt eine dsRNA-Bindedomäne, zwei RNaseIII-Domänen, eine RNA-Helikase-Domäne und eine PAZ(piwi/argonaute/zwillie)-Domäne, die am 2-nt-3'-Überhang der siRNA bindet. Die Existenz von siRNAs wurde zunächst in Pflanzen nachgewiesen (Hamilton und Baulcombe, 1999), dann auch in *Drosophila* (Hammond *et al.*, 2000). In *Drosophila*-Zellextrakten wurde zuerst die Aktivität einer RNase nachgewiesen und erkannt, dass siRNAs ein 5'-Phosphat- und ein 3'-Hydroxylende haben. Ein weiteres Kennzeichen von siRNAs ist der 2-Nukleotide-lange 3'-Überhang (Zamore *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001). Einer der siRNA-Stränge wird dann in einen RNA-induzierten-*silencing*-Komplex (*RNA induced silencing complex*, RISC) eingebaut, der komplementäre mRNA erkennt, bindet und spaltet (Hamilton und Baulcombe, 1999; Hammond *et al.*, 2000, Hannon, 2002, Zamore *et al.*, 2002). Ein wesentlicher Bestandteil eines RISC ist in jedem Fall ein Mitglied der Argonaute (Ago)-Proteinfamilie. Agos besitzen wie Dicer eine PAZ-Domäne, sowie zusätzlich eine PIWI-Domäne mit endonukleolytischer Aktivität („*Slicer*“). Falls der siRNA/mRNA-Duplex Basenfehlpaarungen an der Schnittstelle enthält, wird die mRNA

nicht gespalten. RNA *silencing* wird in diesem Fall durch Inhibierung der Translation der mRNA bewirkt.

Neben durch exogene Aktivität hervorgerufenen siRNAs, auf die später eingegangen werden soll, gibt es weitere Arten endogener, kleiner, nichtkodierender RNAs: microRNAs (miRNAs) in Pflanzen und Tieren, sowie transagierende siRNAs (*transacting* siRNAs, ta-siRNAs), natürliche *antisense*-Transkript-siRNAs (*natural antisense transcript* siRNAs, nat-siRNAs) und cis-agierende siRNAs (*cis-acting* siRNAs, casiRNAs) in Pflanzen. Trotz ihrer großen Bedeutung bei der posttranskriptionalen Regulierung der Genexpression eines Organismus sollen diese Mechanismen des endogenen RNA *silencing* hier nur gestreift werden, da die durch exogene Aktivität hervorgerufenen Mechanismen im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen. Dennoch ist es wichtig, diese durch endogene, nichtkodierende RNAs hervorgerufene Mechanismen hier zu erwähnen, da die Gesamtheit dieser verschiedenen Mechanismen teilweise auf dieselben Komponenten zurückgreifen, so dass eine Beeinflussung einer Komponente eines Systems Auswirkungen auf Reaktionen in verschiedenen Pfaden haben kann, wie man an dem Beispiel der Expression von Suppressoren des RNA *silencing* sehen kann.

1.6.1 microRNAs

MicroRNA- oder miRNA-Gene sind unabhängige Transkriptionseinheiten, die oft in einer gewebeabhängigen oder zelltypischen Weise exprimiert werden (Parizotti *et al.*, 2004; Wienholds *et al.*, 2005). Die durch RNA Polymerase II gebildete pri-miRNA wird in Säugetieren durch die RNaseIII Drosha (Lee *et al.*, 2004) und den Kofaktor DGCR8/Pasha geschnitten, diese pre-miRNA mittels Exportin-5 aus dem Zellkern exportiert und durch Dicer in reife miRNAs prozessiert (Kim, 2004; Filipowicz *et al.*, 2005). Entsprechend wird in *Arabidopsis* die pri-miRNA durch DCL1 (*dicer like 1*) prozessiert und vermutlich unter Beteiligung von HASTY aus dem Kern exportiert (Reinhart *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002; Kurihara und Watanabe, 2004). miRNA bildet einen Duplex aus reifer miRNA (miR) und einem komplementären Strang (miR*) (Dunoyer *et al.*, 2004), der abgebaut wird (Schwarz *et al.*, 2003). In Pflanzen wird miR in RISC eingebaut und vermittelt die Spaltung der entsprechenden mRNA durch AGO1 (Qi *et al.* 2005; Baumberger und Baulcombe, 2005). In Tieren inhibieren miRNAs im Allgemeinen vermutlich aufgrund eines geringeren Grades an Komplementarität die Translation reifer mRNAs. miRNAs haben eine große

Bedeutung in der Regulation von Entwicklungsvorgängen; so wurde die erste miRNA in *C. elegans* bereits im Jahre 1993 entdeckt, indem eine Mutation dieses Genorts die zeitliche Steuerung der Entwicklungsvorgänge störte (Lee *et al.*, 1993). In Pflanzen sind miRNAs an der Regulation von Blühverhalten sowie an der Entwicklung von Blüten und Blättern, an der Auxinantwort und der Meristementwicklung beteiligt (Bonnet *et al.*, 2006). Während in Tieren alle bekannten Beispiele des natürlichen RNA *silencing* nur miRNAs beinhalten, nutzen Pflanzen noch weitere Arten kleiner RNAs zur Regulation der Genexpression. Beispiele dafür sind tasiRNAs, nat-siRNAs und casiRNAs, deren Funktion im Folgenden kurz erläutert werden soll.

1.6.2 *transacting* siRNA

Transagierende siRNA (tasiRNA) wird aus tasiRNA-Vorläufern gebildet. Diese Vorläufer sind lange primäre RNAs, die durch Transkription von *TAS* Genen entstehen, welche offenbar keine Proteine kodieren. Die tasiRNA-Vorläufer werden durch spezifische miRNAs gespalten und eines der Spaltprodukte mittels einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RDR6) in Verbund mit SGS3 in dsRNA umgewandelt. Die doppelsträngige RNA wird dann durch DCL4 in 21-nt lange tasiRNA gespalten (Vazquez *et al.*, 2004; Peragine *et al.*, 2004). tasiRNAs regulieren, ähnlich wie miRNA, die Expression von mRNA durch Spaltung der mRNA (Peragine *et al.*, 2004; Gascioli *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2005).

1.6.3 *natural antisense transcript* siRNA

Vor kurzem wurde ein Genpaar auf entgegengesetzten DNA-Strängen entdeckt (*cis-antisense* Gene), aus deren überlappenden Transkripten eine siRNA gebildet wird, sobald die Expression des einen Gens durch Salz induziert wird. Diese *natural antisense transcript* siRNA (natürliche *antisense*-Transkript-siRNA, nat-siRNA) führt dann zu einer Spaltung des anderen Genprodukts (Borsani *et al.*, 2005).

1.6.4 *cis-acting* siRNA

siRNAs vieler Organismen sind assoziiert mit methylierten und damit dem transkriptionalem *gene silencing* unterworfenen Transposons (Mette *et al.*, 2002; Lippman und Martienssen, 2004; Lu *et al.*, 2005a). Man nimmt an, dass in Pflanzen ein niedriges

Transkriptionsniveau durch eine neuentdeckte RNA-Polymerase namens POL-IV gewährleistet wird. Das RNA-Transkript wird dann wohl unter Beteiligung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase RDR2 und DCL3 (*dicer like 3*) in siRNAs umgewandelt.

Man vermutet eine Rolle der gebildeten siRNAs bei der Methylierung des entsprechenden Genabschnitts (daher der Name *cis-acting* siRNA bzw. *casRNA*). Der genaue Mechanismus ist allerdings noch unklar (Herr *et al.*, 2005; Kanno *et al.*, 2005; Onodera *et al.*, 2005; Pontier *et al.*, 2005, Vaughn und Martienssen, 2005).

Unmittelbar wichtig bei der Expression von Transgenen in Pflanzen sind jedoch zwei weitere Mechanismen des RNA *silencing*: einerseits dsRNA-produzierende Transgene und IR-PTGS (RNA *silencing*, vermittelt durch invers repetitiv angeordnete Transgene), andererseits *sense*-PTGS und transitives *silencing*, die im Folgenden erläutert werden sollen. Die aktuelle Modellvorstellung beider Mechanismen wird in Abbildung 1 verdeutlicht.

1.6.5 dsRNA-produzierende Transgene und IR-PTGS

Ein Grund für die verminderte Expression der Chalconsynthase in den eingangs erwähnten transgenen Petunien (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990) ist die Produktion von dsRNA, die durch die unbeabsichtigte Nachbarschaft von *sense* und *antisense* Transgenen während einer unvollständigen Integration der transgenen DNA in die genomische DNA verursacht wird (Stam *et al.*, 1997; Metzloff *et al.*, 1997). Dieser beobachtete Effekt wurde nachfolgend gezielt eingesetzt, um in transgenen Pflanzen mittels der gleichzeitigen Transkription von *sense* und *antisense* Transgenen oder mittels des Mechanismus des IR-PTGS die Expression bestimmter Gene zu inhibieren (Waterhouse *et al.*, 1998; Chuang und Meyerowitz, 2000). Obwohl IR-PTGS zum Knockdown der Genexpression vielfach verwendet wird, ist der genaue Mechanismus auch im Vergleich zu anderen Mechanismen des RNA *silencing* weitgehend ungeklärt. Mutanten mit einem Defekt in diesem Mechanismus konnten bisher nicht gefunden werden, was daran liegen könnte, dass die hohen Mengen an erzeugter dsRNA als Produkt für unterschiedliche Dicer und RISC dienen, die sonst unterschiedlichen Mechanismen zugeordnet sind. Studien, die Kombinationen von Dicer-Knockout-Mutanten untersuchten, deuten in diese Richtung (Gascioli *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005).

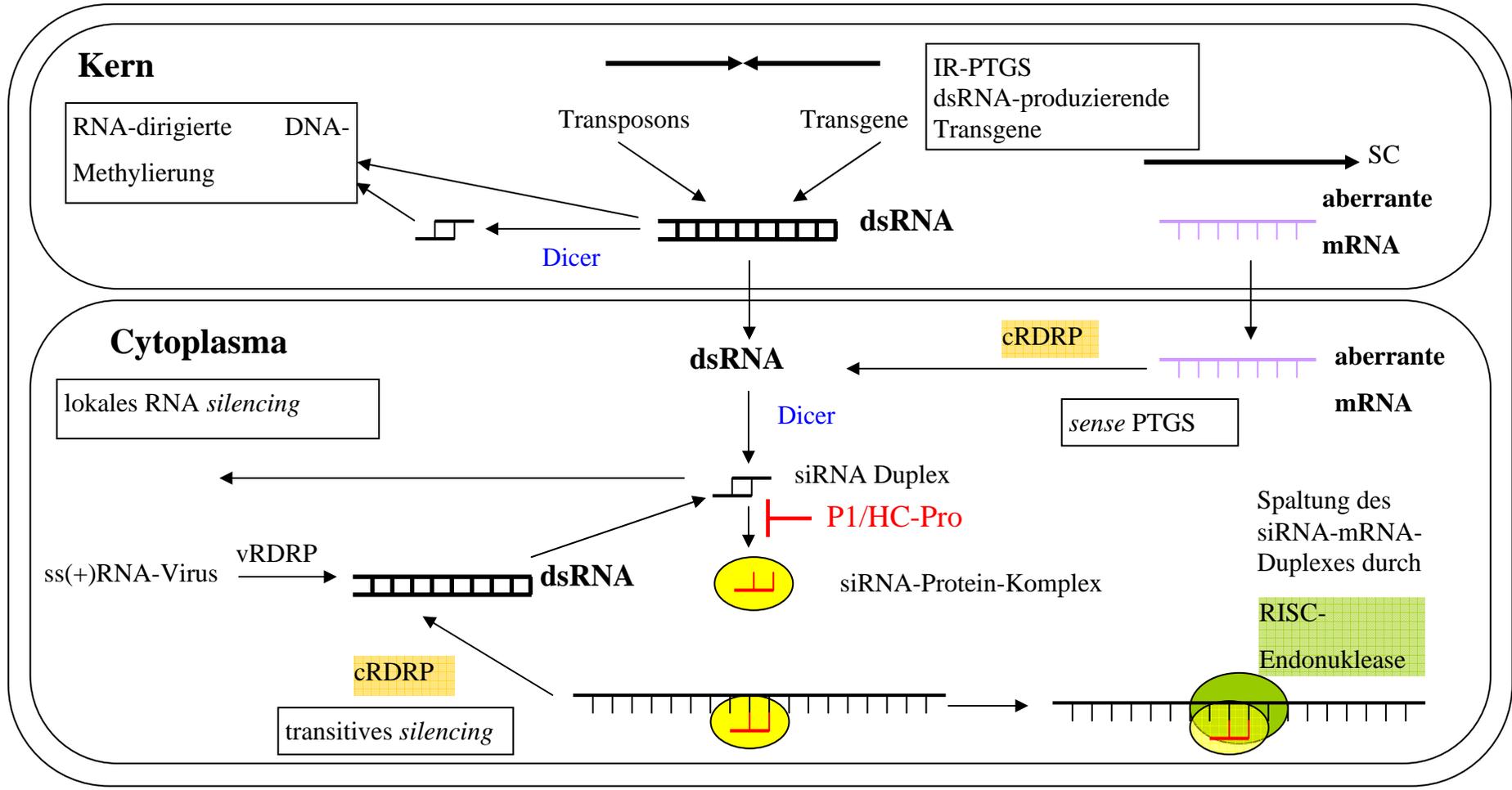


Abbildung 1: Vereinfachtes Modell des Mechanismus des RNA silencing (nach Plasterk, 2002; Zamore, 2002; Susi *et al.*, 2004; Hammond, 2005; verändert); dsRNA: doppelsträngige RNA; IR: *Inverted Repeat*; PTGS: Posttranskriptionales *gene silencing*; SC: *single copy*; vRDRP: *viral RNA dependent RNA polymerase*; cRDRP: *cellular RNA dependent RNA polymerase*; siRNA: *small interfering RNA*; P1/HC-Pro: *protein1/helper component proteinase*; RISC: *RNA induced silencing complex*.

1.6.6 *sense* PTGS und transitives *silencing*

Anfänglich hatte man angenommen, dass *silencing* eines Transgens hervorgerufen würde, sobald *sense* Transkripte einen bestimmten Schwellenwert überschritten. Dalmay *et al.* und Mourrain *et al.* identifizierten im Jahre 2000 die RNA-abhängige RNA-Polymerase RDR6. Man geht heute davon aus, dass aberrante Transkripte von Transgenen, die beispielsweise keine 5'-Kappe aufweisen, als Matrize für RDR6 dienen. In Mutanten von *Arabidopsis*, die einen Defekt in XRN4 aufwiesen, einer 5'-3'-Exonuklease, die mRNA ohne 5'-Kappe degradiert, wurde eine verstärkte Anhäufung von transgener mRNA ohne 5'-Kappe beobachtet. Durch die vermutete Polymerase-Aktivität von RDR6 wurde diese aberrante mRNA in doppelsträngige RNA umgewandelt, was über den *sense* PTGS-Mechanismus letztlich zu einer Degradation aller transgenen mRNAs führte (Gazzani *et al.* 2004). Während das in diesem Mechanismus beteiligte Dicer noch nicht gefunden wurde, sind andere Komponenten bereits identifiziert worden: das *coiled-coil*-Protein SGS3 (Mourrain *et al.*, 2000), die RNase D Exonuklease WEX (Glazov *et al.*, 2003), die sRNA-spezifische S-Adenosyl-Methionin (SAM)-bindende Methyl-Transferase HEN1 (Boutet *et al.*, 2003) und die vermutete RNA Helikase SDE3 (Dalmay *et al.*, 2001). SDE3 scheint nicht ein essentieller Bestandteil des s-PTGS-Mechanismus zu sein, könnte aber eine Bedeutung bei der Auflösung von Sekundärstrukturen von RNA-Molekülen haben, die als Matrize für RDR6 dienen (Dalmay *et al.*, 2001). Welche Rolle WEX spielt, ist derzeit unklar, obgleich bekannt ist, dass die verwandte Exonuklease-Domäne von *mut-7* für das *silencing* von Transposons und RNAi in *Caenorhabditis elegans* benötigt wird (Ketting *et al.*, 1999). HEN1 katalysiert die Methylierung freier Hydroxyl-Enden und schützt so kleine RNA in *Arabidopsis* vor Uridylierung, welche eine erhöhte Instabilität der sRNA bewirkt (Li *et al.*, 2005). AGO1 spielt auch in diesem Mechanismus eine bedeutende Rolle, da in Mutanten mit keiner oder geringer AGO1-Aktivität die Menge durch s-PTGS hervorgerufener siRNAs drastisch sank (Morel *et al.*, 2002). Man vermutet daher, dass AGO1 entweder eine Rolle bei der Produktion von siRNAs oder bei der Beladung von RISC mit siRNAs spielt. Eine Störung des letzteren Prozesses könnte ebenfalls zu einem schnelleren Abbau von siRNAs führen (Qi *et al.*, 2005; Baumberger und Baulcombe, 2005).

RDR6 spielt auch eine Rolle in dem sogenannten Mechanismus der Transitivität. Unter Transitivität versteht man den Übergang von primären siRNAs, die einer Teilsequenz der ursprünglich als Ziel des *silencing* anvisierten Sequenz entsprechen, zu sekundären

siRNAs, die außerhalb dieses Zielbereichs liegen. In Pflanzen kann dieser Übergang sowohl in 3'- als auch in 5'-Richtung erfolgen, ein Phänomen, dem vermutlich eine Primer-unabhängige und eine Primer-abhängige Aktivität von RDR6 zu Grunde liegt.

1.7 Interaktionen zwischen Viren und RNA *silencing*

Man geht im Allgemeinen davon aus, dass der Mechanismus des RNA *silencing* neben der Regulation der endogenen Genexpression und der Kontrolle von Transposons eine weitere Funktion bei der Verteidigung gegen Viren hat. Umgekehrt wird auch die Position vertreten, dass sich der Verteidigungsmechanismus zuerst entwickelt habe und er später zum Zwecke der Genregulation adaptiert wurde. In jedem Fall scheint es unstrittig, dass sich Pflanzen des Mechanismus des RNA *silencing* bedienen, um die Verbreitung eingedrungener Viren zu unterbinden. dsRNA stellt bei vielen Viren ein Intermediat im Vermehrungszyklus dar, von dem man annimmt, dass der Mechanismus des RNA *silencing* dieses wahrnimmt, den Abbau der viralen dsRNA einleitet und damit ein *silencing* der viralen Gene bewirkt (Hamilton und Baulcombe, 1999; Dunoyer und Voinnet, 2005). Dieser Vorgang wird als virus-induziertes *gene silencing* bezeichnet (VIGS). Neben der während des Vermehrungszyklus durch eine virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (vRDRP) gebildeten dsRNA könnten allerdings auch hochstrukturierte Regionen der genomischen viralen RNA ein Substrat für Dicer sein, die alternativ ähnlich zu miRNAs die Translation viraler RNA inhibieren könnten (Szittyta *et al.*, 2002; Molnar *et al.*, 2005). Des Weiteren könnte virale RNA auch durch eine RNA-abhängige RNA-Polymerase des Wirtes in dsRNA umgewandelt werden (Yu *et al.*, 2003).

Man könnte den Prozess des virus-induzierten *gene silencing* auch als ein Wettrennen zwischen dem Virus und der befallenen Pflanze betrachten: das Virus befällt über eine kleine Wunde zunächst eine Zelle, in der es sich repliziert und von der aus es in benachbarte Zellen gelangt. Dieser Prozess setzt sich fort, bis das Virus das vaskuläre System erreicht, wodurch es sich systemisch in entfernte Teile der Pflanze verbreiten kann. Im Gegenzug versucht die Pflanze einerseits, die Replikation des Virus in befallenen Zellen durch VIGS zu hemmen, andererseits wird ein virus-spezifisches mobiles Signal erzeugt, das ebenfalls von Zelle zu Zelle und systemisch in der Pflanze verbreitet wird. Falls das Virus sich schneller als das Signal bewegt, kann es entfernt liegende Zellen infizieren, falls das Signal vor ihm angelangt ist, wird es selbst zum Ziel des RNA

silencing.

Die Interaktionen zwischen Viren und Wirtspflanzen weisen weitere interessante Facetten auf: das bereits erwähnte transitive RNA *silencing* beispielsweise könnte die antivirale Wirkung verstärken, indem sekundäre siRNAs produziert werden unter Verwendung von viralen siRNAs als Primern oder unter Nutzung aberranter viraler RNA im S-PTGS-Mechanismus. Der Umstand, dass Pflanzen mit einer eingeschränkten RDR6-Aktivität hypersensitiv sind gegenüber Viren, weist in diese Richtung (Mourrain *et al.*, 2000; Muangsan *et al.*, 2004).

Auch weisen etliche miRNAs in *Arabidopsis* keine Ähnlichkeit zu proteinkodierenden Genen auf. Es ist durchaus denkbar, dass diese kleinen RNAs aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu viralen Genomen ein Reservoir an Verteidigungsmolekülen darstellen könnten (Llave *et al.*, 2002; Llave, 2004).

1.8 Virale Suppressoren des RNA *silencing*

Angesichts der antiviralen Natur des RNA *silencing* ist es nicht verwunderlich, dass Viren Mechanismen entwickelt haben, das virus-induzierte *gene silencing* zu umgehen oder zu behindern. Einige Viren versuchen, ihre dsRNA-Intermediate zu verbergen, indem sie sich in Spherulen im endoplasmatischen Retikulum replizieren (Schwartz *et al.*, 2002). Andere könnten versuchen, sich so schnell zu replizieren und zu verbreiten, dass sie das mobile *silencing* Signal überholen. Wiederum andere Viren verursachen eine verstärkte Infektion, wenn sie mit bestimmten anderen Viren koinfizieren, ein Phänomen, das als synergistische virale Erkrankung bekannt ist. Der Synergismus zwischen dem *Potyvirus Potato virus Y* (PVY) und dem *Potexvirus Potato virus X* (PVX) ist wohl der bekannteste (Vance, 1991). Es wurde zum ersten Mal gezeigt, dass ein bestimmtes potyviraies Protein, die Helfer-Komponenten-Proteinase (*helper component proteinase*, HC-Pro) den Synergismus verursacht (Vance *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1997) und dass eine Expression von *hc-pro* in transgenen Pflanzen verschiedenen heterologen Viren erlaubt, verstärkt zu akkumulieren (Pruss *et al.*, 1997). Darüber hinaus zeigten 3 Gruppen unabhängig, dass HC-Pro den Mechanismus des RNA *silencing* inhibiert (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau und Carrington, 1998), und identifizierten HC-Pro somit als ersten Suppressor des RNA *silencing*. In den folgenden Jahren wurden viele weitere

Suppressoren aus nicht verwandten Viren unterschiedlicher Gattungen, meist aus Pflanzenviren, entdeckt (Roth *et al.*, 2004; Voinnet, 2005). Die Suppressoren greifen an unterschiedlichen Punkten in den Mechanismus des RNA *silencing* ein und werden daher in 4 funktionelle Gruppen unterteilt (Susi *et al.*, 2004):

1. Suppressoren der Gruppe 1 behindern den Erhaltungsschritt des RNA *silencing*. Charakterisiert werden diese Suppressoren durch ihre Eigenschaft, *silencing* in Gewebe aufheben zu können, in dem zuvor die Expression des entsprechenden Gens unterdrückt wurde. Zu dieser Gruppe zählen das bereits erwähnte HC-Pro Protein von PVY und *Tobacco etch virus* (TEV), AC2 von *African cassava mosaic virus* (ACMV) (Voinnet *et al.*, 1999; van Wezel *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2003) und P1 von *Rice yellow mottle virus* (Voinnet *et al.*, 1999).
2. Suppressoren der Gruppe 2 verhindern die Weiterleitung des *silencing* Signals oder inhibieren dessen Wirkung. Nach der Etablierung des *silencing* können sie dieses nicht mehr aufheben. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das 2b Protein von *Cucumber mosaic virus* (CMV), das im Zellkern lokalisiert ist (Brigneti *et al.*, 1998; Lucy *et al.*, 2000; Guo und Ding, 2002). Des Weiteren zählt P19 aus *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) und *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) dazu (Qu und Morris, 2002; Takeda *et al.*, 2002; Voinnet *et al.*, 2003).
3. Gruppe 3 besteht bisher nur aus einem bekannten Vertreter, P25 aus *Potato virus X* (PVX). Dieses verhindert die Bildung des *silencing* Signals, kann aber wie die Suppressoren der Gruppe 2 das *silencing* nach dessen Etablierung nicht mehr revertieren (Voinnet *et al.*, 1999; Voinnet *et al.*, 2000; Hamilton *et al.*, 2002).
4. Das Hüllprotein (*coat protein*, CP) des *Turnip crinkle virus* (TCV) ist der bisher einzige Vertreter der in Gruppe 4 eingeordneten Suppressoren. Diese inhibieren die Initiation des RNA *silencing* (Qu *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2003).

Die Wirkungsweise der Suppressoren des RNA *silencing* ist nur in Ansätzen aufgeklärt. So beschrieb Anandalakshmi die Interaktion des potyviralen HC-Pro mit dem Calmodulin-verwandten Protein rgsCaM (*regulator of gene silencing Calmodulin-like protein*), welches auch selbst *silencing* unterdrücken kann (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Für P19 hingegen wurde zum ersten Mal gezeigt, dass ein Suppressor selbst siRNAs bindet, was die Vermutung nahe legt, dass P19 *silencing* unterdrückt, indem der Einbau der siRNAs in RISC verhindert wird (Silhavy *et al.*, 2002). Vor kurzem wurde in einer wegweisenden

Veröffentlichung gezeigt, dass sowohl p19 von Tombusviren als auch p21 von *Beet yellows virus* (BYV) und HC-Pro von Potyviren die Fähigkeit besitzen, *in vivo* an 21-nt siRNA und an miRNA Duplexe zu binden (Lakatos *et al.*, 2006). Während p19 anscheinend bevorzugt an 19-nt-siRNA bindet, wobei das Vorhandensein eines 3'-2nt Überhang dazu nicht notwendig ist, binden p21 und HC-Pro bevorzugt an 21-nt siRNA mit einem 3'-2nt Überhang. Gleichzeitig beeinflussten weder p19 noch p21 oder HC-Pro die Aktivität von RISC *in planta*. Ebenfalls wurde die Prozessierung von dsRNA in siRNA in transgenen Pflanzen nicht behindert. Die Bindung von miRNA-Duplexen könnte eine Störung der miRNA-vermittelten Degradation von mRNA hervorrufen. Dies könnte erklären, warum die Expression sowohl von *p15* als auch *p19* und *hc-pro* zu einem ähnlichen Phänotyp in transgenen *Arabidopsis* führt (Dunoyer *et al.*, 2004).

Man kann daher annehmen, dass die Suppressoren durch Bindung von siRNA den Erhaltungsschritt bzw. Vermehrungsschritt des RNA *silencing* hemmen, indem der darin involvierten RNA-abhängigen RNA-Polymerase die als Primer verwendeten primären siRNA entzogen werden. Dies würde zu einer verringerten Bildung von sekundären siRNA führen, einer Wirkung, die in verschiedenen Systemen dokumentiert wurde (Llave *et al.*, 2000; Mallory *et al.*, 2001; Dunoyer *et al.*, 2004) und die zu der Annahme verleitete, dass die Suppressoren die Aktivität von Dicer hemmen könnten. Die Vermutung, dass die Bindung doppelsträngiger RNA ein allgemeines Merkmal pflanzlicher viraler Suppressoren des RNA *silencing* sein könnte, wurde durch Merai *et al.* (2006) bestätigt, die neben weiteren siRNA-bindenden Suppressoren auch Suppressoren wie P14 von Aureusviren und das Hüllprotein CP von *Turnip crinkle virus* identifizierten, die dsRNA unabhängig von ihrer Größe binden, wie übrigens auch das B2 Protein des Tiere infizierenden *Flock house virus* (Lu *et al.*, 2005b). Suppressoren, die dsRNA unabhängig von deren Größe binden, könnten Dicer kompetitiv inhibieren und dadurch die Produktion von siRNA hemmen.

Die Bindung von doppelsträngiger RNA durch Suppressorproteine scheint ein weit verbreiteter Mechanismus zu sein, der sich mehrmals unabhängig in nicht verwandten Viren entwickelt hat. Daneben bleibt es aber weiterhin möglich, dass virale Proteine auch auf anderen Wegen in das RNA *silencing* eingreifen, beispielsweise über eine F-Box-ähnliche Aktivität, die zur Zerstörung von Komponenten des *silencing* führt (Pazhouhandeh *et al.*, 2006), durch direkte Hemmung von Dicer (Qu *et al.*, 2003) oder

mittels der Bindung von siRNA nach der Entwindung des Duplexes (Chellappan *et al.*, 2005). Interessanterweise scheinen virale Proteine durch die Bindung kleiner RNA den Mechanismus des RNA *silencing* zu inhibieren unabhängig davon, ob das Virus tatsächlich den Organismus befallen könnte. So wirkt B2 von *Flock house virus* als Suppressor in transgenem Tabak (Li *et al.*, 2002) während umgekehrt HC-Pro von *Tobacco etch virus* als Suppressor in *Drosophila*-Zellen wirkt (Reavy *et al.*, 2004).

1.9 Der potyvirale Suppressor P1/HC-Pro

Die Gattung *Potyvirus* (Familie *Potyviridae*) hat etwa 180 Mitglieder, was sie zur größten und wirtschaftlich bedeutendsten Gruppe pflanzlicher Viren macht, die Schäden in vielen wichtigen Feldfrüchten, z.B. Kartoffel, Mais, Zuckerrohr, Tomate und Papaya, verursachen. Potyvirale Virionen bilden durch die symmetrische Anordnung des Hüllproteins CP stabförmige, biegsame Partikel, die eine Länge von 680-900 nm haben und ein einzelsträngiges, *sense*-RNA Genom aus etwa 10 Kilobasen enthalten. Am 3'-Ende des Genoms befindet sich ein poly-(A)-Schwanz, während das 5'-Ende mit dem Protein VPg (*virus protein, genome linked*) verbunden ist. Die genomische RNA wird in ein großes Polyprotein von 346 kDa translatiert, das anschließend in 8 reife Proteine prozessiert wird (Agrios, G.N., in: Plant Pathology, 2001, S. 513-519). Die Spaltung des Polyproteins erfolgt *in trans* durch die Aktivität der NIa-Proteinase (*nuclear inclusion proteinase*), mit Ausnahme der Abtrennung von P1 bzw. HC-Pro. Sowohl P1 als auch HC-Pro spalten sich autokatalytisch an ihrem C-Terminus ab, wodurch das reife P1, HC-Pro und P3 entsteht (Carrington *et al.*, 1989a,b; Verchot *et al.*, 1991). Die proteolytische Aktivität von P1 und HC-Pro ist notwendig für das Überleben des Virus (Kasschau und Carrington, 1995; Verchot und Carrington, 1995b).

Von P1 ist neben der proteolytischen Aktivität wenig bekannt. Obwohl P1 nicht essentiell zu sein scheint, fördert es die Genomamplifikation (Verchot und Carrington, 1995a) und verstärkt möglicherweise die Aktivität von HC-Pro als Suppressor des RNA *silencing* (Pruss *et al.*, 1997; Anandalakshmi *et al.*, 1998; Valli *et al.*, 2006). HC-Pro besitzt neben der Suppressoraktivität, die die erwähnte Bindung kleiner RNA und die Interaktion mit rgs-CaM umfasst, und der Vermittlung des viralen Synergismus bei Koinfektionen weitere Funktionen, was nicht untypisch ist für virale Proteine. So ist HC-Pro an der Genomamplifikation und dem Langstreckentransport des Virus beteiligt (Klein *et al.*,

1994; Cronin *et al*, 1995; Kasschau *et al*, 1997) sowie der Übertragbarkeit durch Aphiden (Pirone und Blanc, 1996). Letztere Funktion hat HC-Pro auch die Bezeichnung „Helfer-Komponente“ (*helper component*) eingetragen.

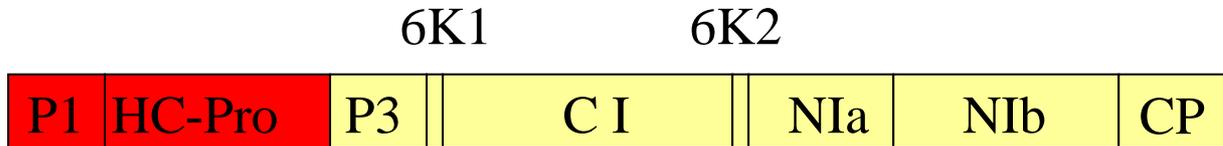


Abbildung 2: Genom des Potyvirus (*Potyviridae*). P1: Protein 1; HC-Pro: Helfer-Komponenten Proteinase (*helper component proteinase*); P3: Protein 3; CI: Zylindrisches Einschlussprotein (*cylindrical inclusion protein*); 6K1, 6K2: 6 kDa-Proteine; NIa: Kerneinschluss-Proteinase (*nuclear inclusion proteinase*); NIb: Kerneinschluss-Polymerase (*nuclear inclusion polymerase*); CP Hüllprotein (*coat protein*).

1.10 Problemstellung

Wie bereits erwähnt, wird der Fortschritt in der züchterischen Entwicklung von Weizen mittels *genetic engineering* durch die geringe Transformationseffizienz sowie die geringe Expression der Transgene stark gebremst. Demzufolge besteht ein großes Bedürfnis, Verfahren zu entwickeln, die den Hemmnissen in der Weizentransformation (genotypabhängige Regeneration, geringe Transformationseffizienz, geringe und instabile Expression der Transgene) entgegenwirken. Da die Regenerationsfähigkeit des Weizens auf komplexen, bisher nicht charakterisierten genetischen Eigenschaften beruht, wird es auf absehbare Zeit nicht möglich sein, Weizen auch auf seine Eignung in der Gewebekultur hin zu züchten. Einen wesentlichen Ansatz zur Verbesserung der Weizentransformation bietet daher insbesondere die Möglichkeit, die Expression der Transgene zu erhöhen, zumal eine erhöhte/ stabile Expression eines Resistenzgens gegen ein Selektionsagens das Überleben von mehr transgenen Pflanzen und damit eine erhöhte Effizienz bewirken könnte

Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, ein System zu entwickeln, das diese Einschränkungen beseitigen könnte. Zu diesem Zweck sollten virale Suppressoren des RNA *silencing* in Weizen stabil transformiert werden und es sollte untersucht werden, ob die Expression der Suppressoren die Transformationseffizienz oder die Expression eines Reportergens erhöhen kann.

Folgender Vergleich mag der Verdeutlichung der Herausforderung dienen, welche die Aufgabe der Verbesserung der Expression von Transgenen in Weizen darstellt: die Aktivität des Enzyms Glucuronidase ist in transgenem Tabak im Vergleich zu transgenem Weizen 20- bis 5000-mal stärker, wobei bei der stabilen Transformation jeweils der stärkste bekannte Promotor für die betreffende Pflanzenart verwendet wurde (Schaaf *et al.*, 1995; eigene Messungen). Die in der Fachwelt diskutierten Lösungen betreffen die Suche nach stärkeren Promotoren, wobei bisher kein stärkerer Promotor als der Ubiquitin-Promotor aus Mais gefunden wurde (Christensen und Quail, 1996), den Versuch über *Agrobacterium*-vermittelte Transformation die Integration von einzelnen Kopien der Transgene zu erzielen und damit *silencing* aufgrund von zufällig bei der Integration eingebrachten inverseren transgenen Sequenzen zu vermeiden und die Suche nach hoch transformierbaren Weizensorten.

Obwohl bedeutende Verbesserungen in der Weizentransformation mit Agrobakterien erzielt wurden, bleiben die Transformationseffizienzen hinter den durchschnittlich mittels Partikelbeschuss erzielten Ergebnissen zurück. Außerdem scheint auch in transgenem Weizen, der durch indirekte Transformation produziert wurde, das *silencing* der Transgene ein weiterhin ungelöstes Problem darzustellen (Bhalla 2006; Vasil 2007). Der Weg, hochtransformierbare Weizensorten zu finden, wurde von vielen Arbeitsgruppen beschritten, am erfolgreichsten wohl von Dr. Alessandro Pellegrineschi (Pellegrineschi *et al.*, 2002). Dennoch hat auch letzterer Ansatz den großen Nachteil, mit einer wirtschaftlich nicht bedeutenden Weizensorte zu arbeiten zu müssen. Für eine kommerzielle Anwendung, die langfristig angestrebt wird, müsste das eingebrachte Transgen über langwierige Kreuzungen in eine andere Weizensorte „überführt“ werden.

Ein erfolgversprechender Weg scheint daher der Einsatz viraler Suppressoren des RNA *silencing*: Durch konstitutive Expression der Suppressoren könnte zunächst die Expression eines Reportergens, das in praxisnäheren Anwendungen durch Nutzgene, z.B. für Trockenheitsresistenz, ersetzt werden könnte, gesteigert werden. Denkbar wäre auch, dass die Transformationseffizienz an sich gesteigert werden könnte, wenn die Expression eines Reportergens zur Selektion von transgenen Pflanzen, die beispielsweise resistent gegen das Herbizid Phosphinotricin wären, schon während der Gewebekultur gesteigert werden könnte und somit potentiell mehr transgene Pflanzen regeneriert werden könnten.

Die Wirkung der viralen Suppressoren auf Reportergene wie *gfp* und *gus* sollte zunächst im Rahmen dieser Arbeit in einem Modellsystem mittels eines etablierten Transformationssystems untersucht werden. Da die praktische Anwendung, beispielsweise die Wirkung der Suppressoren auf Trockenheitsresistenzgene oder Pilzresistenzgene, später in einem zweiten Schritt durchgeführt werden sollte, musste auf eine Reihe von Faktoren keine Rücksicht genommen werden. So konnten Weizensorten wie ‚Combi‘ oder ‚Bobwhite‘ ausgewählt werden, die als hoch transformierbar gelten, auch wenn sie nur eine eingeschränkte wirtschaftliche Bedeutung haben sollten. Auch konnte die Transformation durch Partikelbeschuss ausgewählt werden, die allgemein als am einfachsten zu etablieren gilt, trotz der oben genannten Nachteile.

Dass dieser Ansatz prinzipiell erfolgreich sein könnte, hatte Mallory in transgenem Tabak gezeigt, der bei Expression der Suppressoren *p1/hc-pro* aus TEV eine bis zu 40-fach stärkere Glucuronidase (GUS)-Aktivität gezeigt hatte, und dies obwohl *silencing* bzw. schwache Expression von Transgenen in Tabak und *Arabidopsis* kein großes Problem darstellen (Mallory *et al.*, 2001; Mallory *et al.* 2002; Lechtenberg *et al.*, 2003).

Der Verwendung von *p1/hc-pro* aus TEV in Weizen standen allerdings Bedenken entgegen: so ist nicht bekannt, dass TEV Weizen infizieren kann und auch eine Wirksamkeit von *p1/hc-pro* aus TEV in Pflanzen neben Tabak war nicht bekannt. Aufgrund dieser Bedenken wurde wohl auch bei der Herstellung *p1/hc-pro*-transgener *Arabidopsis*-Pflanzen die kodierende Sequenz aus dem entsprechenden Pathogen, dem *Turnip mosaic virus* (TuMV), eingebracht (Kasschau *et al.*, 2003). Eine Wirksamkeit von *p1/hc-pro* aus TEV in anderen Organismen wurde auch von Prof. David C. Baulcombe, John Innes Center, UK, angezweifelt (pers. Mitteilung). Auf besonderen Rat von Prof. Vicki B. Vance, University of South Carolina, USA, sollte ein Suppressor des entsprechenden Pathogens in Weizen verwendet werden. Innerhalb der Gattung *Potyvirus*, der TEV zugerechnet wird, findet sich allerdings kein Virus, der Weizen befällt. Allerdings sind in der verwandten Gattung *Tritimovirus*, die ebenso wie *Potyvirus* zu der Familie *Potyviridae* zählt, Weizenpathogene bekannt. Der bekannteste Vertreter der Tritimoviren ist das Weizenstrichelmosaikvirus (WSMV, 1937 von McKinney beschrieben), der für Ernteauffälle vor allem in den *Great Plains* in Nordamerika verantwortlich ist, aber auch in Mexiko, Ost- und Südosteuropa, Russland und dem Nahen Osten (Türkei, Jordanien) verbreitet ist (Slykhuis, 1967; Jezewska, 2000; Sanchez-Sanchez *et al.*, 2001; Rabenstein

et al., 2002). Im Gegensatz zu Potyviren werden Tritimoviren nicht durch Aphiden, sondern durch Milben übertragen. WSMV im Besonderen wird durch die Milbe *Eriophyes tosicHELLa* Keifer, auch unter dem früheren Namen *Aceria tulipae* Keifer bekannt, übertragen (French und Stenger, 2002).

Scheets hatte bereits 1998 nachgewiesen, dass WSMV bei Koinfektion mit einem anderen Virus eine synergistische Wirkung hat, d.h. die Schadsymptome sind stärker als bei Infektion nur eines Virus. Diese von Potyviren bekannte Eigenschaft (Pruss *et al.*, 1997) wurde in TEV und dem *cowpea aphid-borne mosaic potyvirus* (CABMV) auf die N-terminale Region des Polyproteins, insbesondere P1/HC-Pro bzw. HC-Pro alleine, eingegrenzt (Vance *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1997; Mlotshwa *et al.*, 2002a). Da zumindest P1/HC-Pro aus TEV ein bekannter Suppressor des RNA *silencing* ist (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti, *et al.*, 1998; Kasschau und Carrington, 1998), konnte dies ein Hinweis sein, dass auch WSMV einen solchen Suppressor enthält. Auch weisen Potyviren und Tritimoviren wie WSMV die gleiche Genomorganisation auf (Revers *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2000b; Stenger und French, 2004), so dass eine Rolle der homologen P1/HC-Pro aus WSMV als Suppressoren vermutet wurde. Allerdings sind die Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz von HC-Pro aus WSMV-Sidney81 (der Stamm, aus dessen Genom die in dieser Arbeit verwendete Sequenz von *p1/hc-pro* entnommen wurde) und HC-Pro aus TuMV bzw. TEV mit 16,4 % bzw. 16,6 % recht gering (Stenger und French, 2004).

Das Weizenstrichelmosaikvirus besitzt ebenso wie Potyviren ein Genom, das aus einem einzelsträngigen RNA-Molekül in *sense*-Orientierung besteht. Die Organisation des Genoms ist dem der Potyviren vergleichbar, ebenso wie seine Größe, die mit 9384 Kilobasen der des potyviralen Genoms entspricht (Abbildung 2). Auch hier wird ein Polyprotein translatiert, das in reife Proteine prozessiert wird, wobei auch hier wieder P1 die Verbindung zwischen P1 und HC-Pro spaltet, während HC-Pro sich selbst am C-Terminus von dem Polyprotein abtrennt (Choi *et al.*, 2000a; Choi *et al.*, 2000b; Choi *et al.*, 2002). Insgesamt ist die Gattung *Tritimovirus* im Vergleich zu Potyviren, insbesondere dem *Tobacco etch virus* schlecht untersucht, wobei allerdings aufgrund der Ähnlichkeit des Genomaufbaus und der Prozessierung des Polyproteins weitgehende Analogien vermutet werden.

Auch der Umstand, dass befallene Weizenpflanzen einen gestauchten Wuchs und ein

rosettenförmiges Erscheinungsbild zeigen (French und Stenger, 2002), analog zu Entwicklungsstörungen und Kümmerwuchs in TuMV-infizierten *Arabidopsis*- bzw. *p1/hc-pro*-transgenen *Arabidopsis*- und Tabakpflanzen (Mallory *et al.*, 2002; Kasschau *et al.*, 2003), ist ein weiterer Hinweis auf die Wirkung von P1/HC-Pro aus WSMV als Suppressor.

Ein weiteres Merkmal eines viralen Suppressors ist neben der Unterdrückung der Senkung der gebildeten siRNA-Menge die Erhöhung des entsprechenden mRNA-Transkripts und damit einhergehend zumindest im Falle der Reportergene *gfp* (*green fluorescent protein*) und *gus* eine höhere GFP- bzw. GUS-Aktivität (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau und Carrington, 1998; Mallory *et al.*, 2001; Mallory *et al.*, 2002).

Um zu bestätigen, dass P1/HC-Pro aus WSMV als Suppressoren des RNA *silencing* wirken, wurde daher ein transientes Expressionssystem in Weizen entwickelt, mit dem ein möglicher Effekt von P1/HC-Pro auf die Expression eines Reportergens nachgewiesen werden konnte.

Die getrennte Expression von *p1* und *hc-pro* sollte durchgeführt werden, um zu bestimmen, ob P1 oder HC-Pro alleine eine Suppressorfunktion hat und, falls dies der Fall wäre, ob P1 bzw. HC-Pro dann entsprechend die Wirkung des Suppressors verstärken könnte.

Es ist bekannt, dass HC-Pro von *Tobacco etch virus* alleine das RNA *silencing* unterdrückt (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998). Auch wirkt HC-Pro alleine als Suppressor in *Drosophila*-Zellen (Reavy *et al.*, 2004) und bindet siRNA (Lakatos *et al.*, 2006; Merai *et al.*, 2006). Dagegen scheint P1 alleine keine Suppressoraktivität zu haben (Brigneti *et al.*, 1998; Valli *et al.*, 2006) bzw. keine schädlichen Effekte in transgenen Pflanzen hervorzurufen (Mallory *et al.*, 2002), was ein Anzeichen dafür ist, dass P1 nicht in die Regulation kleiner RNA einzugreifen scheint. Dennoch wird oft die kodierende Sequenz von *p1/hc-pro* exprimiert, da P1 möglicherweise die Wirkung von HC-Pro als Suppressor verstärkt (Pruss *et al.*, 1997; Anandalakshmi *et al.*, 1998; Valli *et al.*, 2006).

Auch ist bekannt, dass die Expression von *p1/hc-pro* zusammen zu Entwicklungsstörungen und vermindertem Wachstum führen kann, wie für P1/HC-Pro des *Tobacco etch virus* in

Tabak und P1/HC-Pro des *Turnip mosaic virus* in *Arabidopsis* beschrieben (Mallory *et al.*, 2002; Kasschau *et al.*, 2003). Ausgehend von der Analogie zwischen TEV und WSMV kann man vermuten, dass P1 aus WSMV die Aktivität von HC-Pro verstärkt, so dass durch eine getrennte Expression in Weizen die Symptome zumindest abgemildert werden könnten. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob eine Mutation des in P1 konservierten FIVMG-Motivs analog zu dem von Mallory *et al.* (2002) beschriebenen Ansatz bei Expression von *p1/hc-pro* aus WSMV die Ausbildung eines schädlichen Phänotyps verhindern könnte ohne die Suppressoraktivität zu beeinträchtigen.

Danach sollte versucht werden, stabil transformierte Weizenpflanzen zu erhalten und zu untersuchen, welche Auswirkungen die Expression von *p1/hc-pro* auf die Transformationseffizienz, die Expression von Transgenen und das Wachstum der transgenen Pflanzen im Allgemeinen hat.

Falls die schädlichen Effekte doch so groß sein sollten, dass keine transgenen Weizenpflanzen erzielt werden könnten, sollte der Versuch unternommen werden, ein chemisch induzierbares System in Weizen zu etablieren und den Effekt der Suppressoren nach Induktion der Expression zu untersuchen.

Außerdem sollte die subzelluläre Lokalisation der Suppressoren bestimmt werden, da zumindest für HC-Pro des *Potyvirus BCMNV* (*Bean common mosaic virus*) eine Rolle als *Movement*-Protein wahrscheinlich ist (Rojas *et al.*, 1997) und daher eine Lokalisierung an Plasmodesmata angenommen werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien & Molekularbiologische Reagenzien

Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, Chemikalien der Reinheitsstufe p.A. der Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, Niederlande), Merck KGaA (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich Inc. (München) verwendet.

Alle molekularbiologischen Reagenzien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von Fermentas International GmbH (St. Leon-Rot) bezogen.

2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA entsprechend ihres Molekulargewichts wurde in 0,8 %-igen Agarosegelen (Agarose SP1, Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) nach Sambrook und Russell (*Molecular Cloning*, 2001) durchgeführt. Als Größenstandard diente eine GeneRuler-1 kb-Ladder (Fermentas International GmbH, St. Leon-Rot). Durch die Anwesenheit von Ethidiumbromid im Gel konnte die DNA nach erfolgter Elektrophorese durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht ($\lambda=306$ nm) sichtbar gemacht (Image Master[®] VDS, GE Healthcare, München) und mit einem Bilderfassungssystem (Liscap Capture Application, GE Healthcare, München; Thermal Imaging System FTI-500, Fujifilm, Düsseldorf) dokumentiert werden.

2.2.2 Konzentrationsmessung von Nukleinsäure-Lösungen

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit mit Hilfe der photometrischen Extinktionen bei 260 nm und 280 nm wurde nach Sambrook und Russell durchgeführt (Sambrook und Russell, in: *Molecular Cloning*, 2001, S. A8.19-A8.21)

2.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Isolierung bestimmter DNA-Fragmente wurden die entsprechenden Banden nach Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromid auf einem Leuchtschirm (Reprostar II, Camag, Muttenz, Schweiz) visualisiert, ausgeschnitten, in einem 1,5 ml-Eppendorf-

Reaktionsgefäß zerkleinert und mit gleichem Volumen Phenol überschichtet. Im Anschluss wurde das Gemisch in flüssigem Stickstoff kurz durchgefroren, um die Struktur des Agarosegels aufzubrechen. Es folgte nach gründlichem Mischen eine 15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und Raumtemperatur. Der Überstand wurde mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die Fällung der DNA erfolgte nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumen Ethanol bei -20°C für mindestens 20 Minuten. Die ausgefällte DNA wurde durch Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei 14000 rpm konzentriert. Nach dem Waschen des Niederschlags mit 70%-igem Ethanol [v/v] wurde der Niederschlag bei Raumtemperatur getrocknet und in 10-50 µl H₂O_{bidest} aufgenommen.

2.3 Konstruktion von Expressionsvektoren

Der Vektor zur konstitutiven Expression von *p1/hc-pro* in Weizen wurde durch Restriktion der entsprechenden Sequenzen und anschließender Insertion in einen pBluescript-Vektor hergestellt. Zur Expression des mutierten *p1/hc-pro* wurde in diesen hergestellten Vektor eine Insertionsmutation durch zielgerichtete Mutagenese eingefügt.

Die Konstrukte zur konstitutiven Expression von *p1* bzw. *hc-pro* wurden durch Rekombination mit dem Gateway®-System (Invitrogen, Karlsruhe) hergestellt, der im Falle des mutierten P1 eine Mutagenese-Reaktion des entsprechenden Entryvektors voranging.

Die Konstrukte zur Lokalisierung eines P1:GFP-Fusionsproteins bzw. eines HC-Pro:GFP-Fusionsproteins sowie zur induzierbaren Expression von *p1* und *glucuronidase* wurden ebenfalls durch Rekombination mithilfe des Gateway®-Systems (Invitrogen, Karlsruhe) hergestellt.

Die Sequenzen wurden nach Klonierung bzw. Mutagenese per Sequenzierung (MWG Biotech, Ebersberg) überprüft.

2.3.1 *E. coli*-Stämme

***E. coli* DH5- α** (Invitrogen, Karlsruhe): F ϕ 80 d *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44* λ ⁻ *thi-1 gyrA96 relA1*

Dieser rekombinationsdefiziente Stamm wurde üblicherweise für die Vermehrung von Plasmiden eingesetzt. Die ϕ 80 *lacZ* Δ M15-Mutation erlaubt α -Komplementierung mit dem

in pUC-Vektoren kodierten α - Donor-Fragment der β -Galactosidase. Ausbeute und Qualität der Plasmide werden durch die *endA1* Mutation erhöht, während die *recA1* Mutation die Stabilität des Inserts verstärkt.

E. coli DB3.1 (Invitrogen, Karlsruhe): F⁻ *gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20*(r_B⁻, m_B⁻) *supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(Sm^R) *xyl-5 λ- leu mtl1*

Dieser *E. coli* Stamm verfügt über eine Mutation im Gyrasegen (*gyrA462*), weshalb er gegenüber dem CCDB-Protein resistent ist. Dies ermöglicht es, in diesen Bakterien Gateway®-Donor- bzw. Gateway®-Destinationsvektoren zu vermehren.

E.coli XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 sup E44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qΔM15 Tn10* (Tet^r)]

Dieser Stamm wurde zur Durchführung von Transformationen im Rahmen der gerichteten Mutagenese und anschließender Vermehrung der Plasmide verwendet. Das F' Episom trägt eine Tetrazyklinresistenz.

2.3.2 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide als Primer für die Polymerase-Kettenreaktion wurden von der Firmen MWG-Biotech AG (Ebersberg), Microsynth AG (Balgach, Schweiz) oder Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Primer für Klonierung mittels Restriktion/Ligation

Konstitutive Expression

PCR-Produkt	Oligonukleotidsequenz	Produktlänge
P1/HC-Pro	5'-CCGGATCCA <u>ATGG</u> CAACAGCGAATTGT-3' 5'-CCGGATCCTC <u>AGCC</u> AATTTTGTAATCTTT-3'	2228 bp

Primer für die gerichtete Mutagenese von P1 bzw. P1/HC-Pro

Oligonukleotidsequenz

5'-GTTGACGGTCTATTT <u>ACCATGGCA</u> ATTGTCATGGGAAGATG-3'
5'-CATCTTCCCATGACAATT <u>TGCCATGGT</u> AATAGACCGTCAAC-3'

Die für die gerichtete Mutagenese verwendeten Primer beinhalten neben eines Teils der kodierenden Sequenz von p1 eine *in frame*-Insertion von neun Nukleotiden (unterstrichen), die zum einen ein Tripeptid kodieren, zum anderen eine neue Restriktionsstelle für *NcoI* darstellen. Damit kann die erfolgreiche Einführung der Insertion noch vor Sequenzierung durch Restriktion überprüft werden.

Primer für Klonierung mittels Gateway®-Rekombination

Konstitutive Expression

PCR-Produkt	Oligonukleotidsequenz	Produktlänge
P1	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT <u>ATGGCAACAGCGAATTGTTTGCTC</u> -3' 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT <u>TCAATACCATCTAAGTCCATGTG</u> -3'	1117 bp
HC-Pro	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT <u>ATGGGCGACCAAGCAGTGAACAAAG</u> -3' 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT <u>TCAGCCAATTTTGTAATCTTTCATTG</u> -3'	1213 bp

N-terminale Fusion an gfp

PCR-Produkt	Oligonukleotidsequenz	Produktlänge
P1	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT <u>TCATGGCAACAGCGAATTGTTTGCTC</u> -3' 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT <u>GATACCATCTAAGTCCATGTG</u> -3'	1120 bp
HC-Pro	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT <u>TCATGGGCGACCAAGCAGTGAACAAAG</u> -3' 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT <u>GGCCAATTTTGTAATCTTTCATTG</u> -3'	1216 bp

2.3.3 Plasmide

Für Klonierungen mittels Restriktion/Ligation verwendete Plasmide

pBluescript[®] SK (+)

Wegen der Möglichkeit der Blau-Weiss-Selektion sowie Selektion auf Ampicillinresistenz durch das Ampicillinresistenz-ORF (*bla*) wurde pBluescript[®] SK (+), ein pBluescript[®] II Phagemid (Stratagene, Amsterdam, Niederlande), für die Klonierung der kodierenden Sequenz von *p1/hc-pro* verwendet.

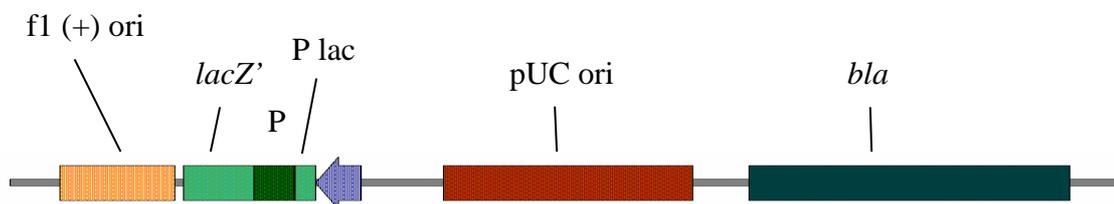


Abbildung 3: pBluescript SK (+). (f1 (+) ori: f1 (+) Replikationsursprung; *lacZ'*: α -Donor-Fragment der β -Galactosidase; P lac: lac Promotor; pUC ori: pUC Replikationsursprung; *bla*: Ampicillin-Resistenzgen; P: Polylinker)

pUBIGFP (Schaaf, 2001)

Das Plasmid pUBIGFP (6155 bp) trägt ein chimäres *S65Tgfp*-Gen (Pang *et al.*, 1996) unter der Kontrolle eines Ubiquitin-Promotors aus Mais (Christensen und Quail, 1996), sowie die Polyadenylierungssequenz des Nopalinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens* (Gan und Amasino, 1995).



Abbildung 4: pUBIGFP (Ubiquitin-Promotor: Ubiquitin-Promotor aus Mais; *S65Tgfp*: Gen für ein chimäres *gfp*; Nos-Terminator: Polyadenylierungssequenz des Nopalinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens*)

pSG516 (Gan und Amasino, 1995)

Das Plasmid pSG516 (5922 bp) enthält das Isopentenyltransferasegen aus *Agrobacterium tumefaciens* unter der Kontrolle des seneszenzspezifischen SAG12-Promotors aus *Arabidopsis thaliana* sowie die Polyadenylierungssequenz des Nopalinsynthasegens aus *A. tumefaciens*. Zur Konstruktion des Expressionsvektors für P1/HC-Pro wurde der Nos-Terminator von pSG516 verwendet.

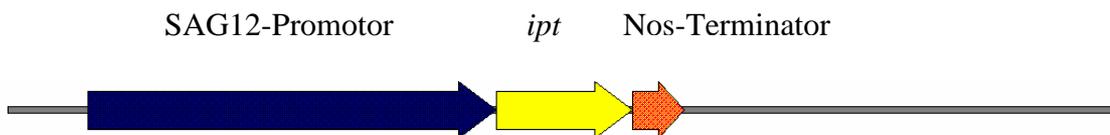


Abbildung 5: pSG516 (SAG12-Promotor: seneszenzspezifischer Promotor aus *Arabidopsis thaliana*; *ipt*: Isopentenyltransferase-Gen aus *Agrobacterium tumefaciens*; Nos-Terminator: Polyadenylierungssequenz des Nopalinsynthasegens aus *A. tumefaciens*).

Zur Konversion in einen Gateway®-Vektor verwendete Plasmide**pUBINOS (Huber, nicht publiziert)**

pUBINOS (5443 bp) ist ein abgeleitetes pBluescript-Phagemid, das den Ubiquitin-Promotor aus Mais (Christensen und Quail, 1996) enthält sowie die Polyadenylierungssequenz des Nopalinsynthasegens aus *A. tumefaciens* (Gan und Amasino, 1995). Der Vektor wurde von Dr. M. Huber, Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Universität Hohenheim, zur Verfügung gestellt.

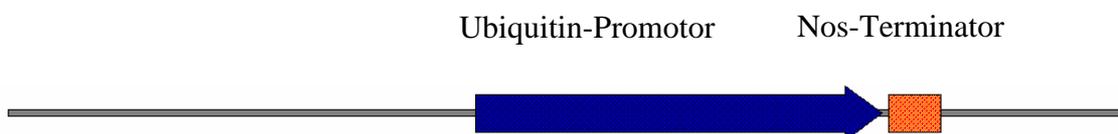


Abbildung 6: pUBINOS (Ubiquitin-Promotor: Ubiquitin-Promotor aus Mais; Nos-Terminator: Polyadenylierungssequenz des Nopalinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens*).

Für Gateway®-Rekombinationen verwendete Plasmide

Donor-Vektoren

pDONR221® (Invitrogen, Karlsruhe)

Der Vektor pDONR221® (4762 bp) wurde zur Klonierung amplifizierter DNA-Fragmente mittels Gateway®-Rekombination verwendet. Er trägt ein Kanamycin-Resistenzgen sowie innerhalb der von *attP*-Stellen flankierten Kasette ein *ccdB*-Gen und ein Chloramphenicol-Resistenzgen.

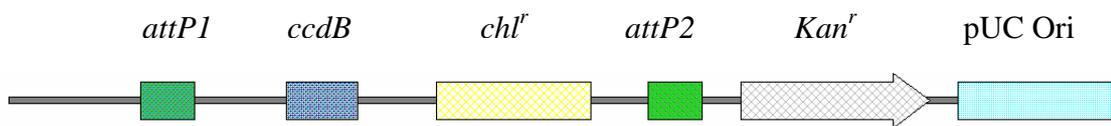


Abbildung 7: pDONR221® (*attP1*, *attP2*: attP-Rekombinationsstellen; *ccdB*: *ccdB*-Gen, Gyrasehemmer; *chl'*: Chloramphenicol-Resistenzgen; *Kan'*: Kanamycin-Resistenzgen; pUC ori: pUC Replikationsursprung)

Entry-Vektoren

pENTR-GUS® (Invitrogen, Karlsruhe)

pENTR-GUS® (3841 bp) ist ein Entry-Vektor, der flankiert von *attL*-Stellen das Gen für β -Glucuronidase (*gus*) aus *Arabidopsis thaliana* (Kertbundit *et al.*, 1991) enthält.

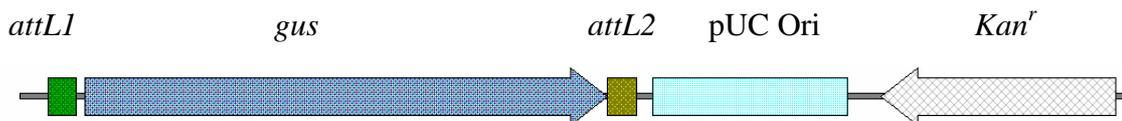


Abbildung 8: pENTR-GUS® (*attL1*, *attL2*: attL-Rekombinationsstellen; *gus*: β -Glucuronidase-Gen; pUC ori: pUC Replikationsursprung; *Kan'*: Kanamycin-Resistenzgen)

Destinationsvektoren

pMDC7 (Curtis und Grossniklaus, 2003)

pMDC7 (13228 bp) ist ein von pER8 (Zuo *et al.*, 2000) abgeleiteter Gateway®-Destinationsvektor zur Estradiol-induzierbaren Expression. Das Estradiol-induzierbare System (Zuo *et al.*, 2000) beruht auf zwei Komponenten: zum einen dem konstitutiv exprimierten, chimären Transkriptionsfaktor XVE, der aus der DNA-Bindungsdomäne des

bakteriellen Repressors LexA aus *E.coli* (X), der Transkriptionsaktivierungsdomäne VP16 (V; Dalrymple *et al.*, 1985) und der C-terminalen regulatorischen Region des menschlichen Östrogenrezeptors (E; Greene *et al.*, 1986) besteht. Der Transkriptionsfaktor XVE steht unter Kontrolle des konstitutiven Promotors G10-90 (Ishige *et al.*, 1999), der aus einem Tetramer der G-Box 10-Sequenz (GCCACGTGCC) fusioniert an einem minimalen -90 CaMV-35S-Promotor besteht.

Die zweite Komponente des Systems besteht aus einer Transkriptionseinheit aus acht Kopien der LexA Operatorsequenz, die an einen -46 CaMV-35S Minimal-Promotor fusioniert sind (Benfey *et al.*, 1990). Das System wird durch Zugabe von Estradiol aktiviert, welches an die regulatorische Region des Östrogenrezeptors bindet und diesen durch nachfolgende Bindung mehrerer zellulärer Proteine, einschließlich HSP90, aktiviert. Nach Bindung des aktivierten Transkriptionsfaktors XVE an die LexA Operatorsequenz startet die Transkription des Gens. Die induzierte Expression eines Gens wird demzufolge über zwei Parameter gesteuert: die Stärke der konstitutiven Expression von XVE sowie die Konzentration des Induktors im Zellkern. 17- β -Estradiol scheint im Vergleich zu 4-Hydroxyl-Tamoxifen, einem starken Induktor in tierischen Zellen, in Pflanzen eine stärkere Induktion zu bewirken (Zuo *et al.*, 2000).

Die von *attR*-Stellen flankierte Gateway®-Kassette aus *ccdB*-Gen und Chloramphenicol-Resistenzgen wird umrahmt von acht Kopien der LexA Operatorsequenz und einer poly-Adenylierungssequenz.

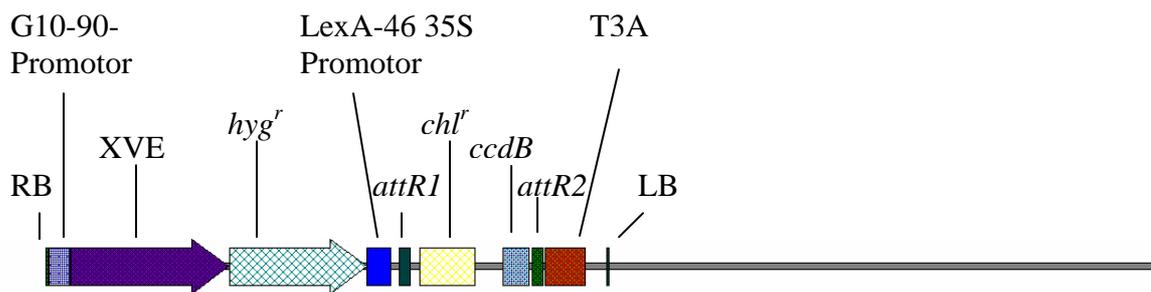


Abbildung 9: pMDC7 (RB: *right border*, LB: *left border*; G1090: konstitutiver Promotor aus G-Box 10 Sequenz und -90-CaMV-35S-Promotor; XVE: chimärer Transkriptionsfaktor XVE bestehend aus der DNA-Bindungsdomäne des bakteriellen Repressors LexA aus *E.coli* (X), der Transkriptionsaktivierungsdomäne VP16 (V) und der C-terminalen regulatorischen Region des menschlichen Östrogenrezeptors (E); *hyg^r*: Hygromycin-Resistenzgen; LexA-46 35S Promotor: LexA Operatorsequenz fusioniert an den minimalen -46-CaMV-35S-Promotor; *attR1*, *attR2*: attR-Rekombinationsstellen; *ccdB*: *ccdB*-Gen, Gyrasehemmer; *chl^r*: Chloramphenicol-Resistenzgen; T3A: Polyadenylierungssequenz)

pK7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002)

pK7FWG2 (11880 bp) dient der Expression eines GFP-Fusionsproteins, wobei das Zielgen an den N-Terminus von GFP fusioniert ist. Die von *attR*-Stellen flankierte Gateway®-Kassette besteht aus *ccdB*-Gen und Chloramphenicol-Resistenzgen.

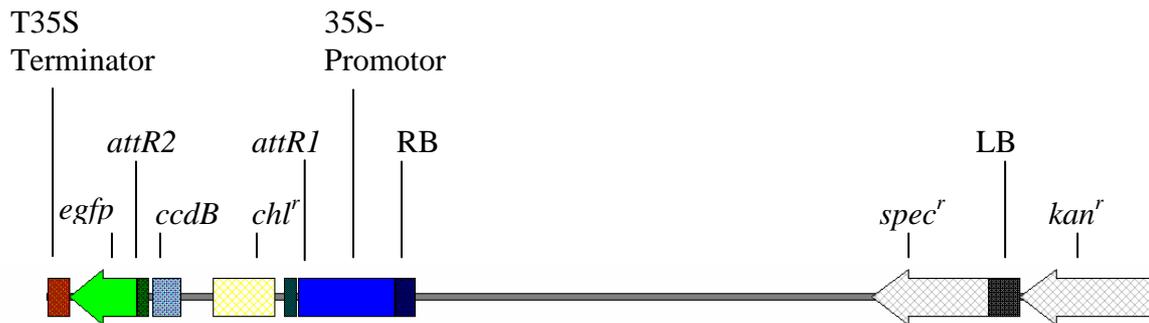


Abbildung 10: pK7FWG2 (T35S Terminator; *egfp*: enhanced green fluorescent protein; *attR2*, *attR1*: attR-Rekombinationsstellen; *ccdB*: *ccdB*-Gen, Gyrasehemmer; *chl^r*: Chloramphenicol-Resistenzgen; 35S-Promotor: CaMV-35S-Promotor; RB: right border; *spec^r*: Spectinomycin-Resistenzgen; LB: left border; *kan^r*: Kanamycin-Resistenzgen)

2.3.4 Antibiotika

Ampicillin, Carbenicillin, Kanamycin, Streptomycin und Spectinomycin wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und mit Filtropur S0.2 Filtern von Sarstedt AG & Co (Nürnbrecht) sterilfiltriert. Chloramphenicol wurde in Ethanol gelöst. Die Lösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt. Sofern nicht anders angegeben, betragen die Antibiotikakonzentrationen im Medium 50 µg/ml.

2.3.5 LB-Medium

LB-Medium (LB Broth low salt, Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) wurde zur Anzucht von *E. coli* verwendet. Zur Herstellung von LB-Flüssigmedium wurden 20 g LB Broth in 1 l H₂O_{bidest} gelöst und die Lösung 20 Minuten lang bei 121°C, 2 bar autoklaviert. Bei der Herstellung von Festmedium wurde vor dem Autoklavieren 15,0 g Plant Agar (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) zu der Lösung zugegeben.

2.3.6 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Zellen wurden nach dem Protokoll nach Hanahan hergestellt (Sambrook und Russell, in: *Molecular Cloning*, 2001, S. 1.105 – 1.111).

2.3.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Maxipräparation

Die Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch alkalische Lyse wurde nach Sambrook und Russell durchgeführt. (Sambrook und Russell, in: *Molecular Cloning*, 2001, S. 1.38 - 1.41, verändert).

Dazu wurden 40 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur abzentrifugiert (5000 rpm, 10 Minuten, 4°C) und der Niederschlag in 1 ml eiskalter Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 1,3 ml Lösung II erfolgte eine alkalische Lyse der Bakterien. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde die Mischung durch Zugabe von 1,15 ml eiskalter Lösung III neutralisiert und nach weiteren 10 Minuten Inkubation auf Eis durch Zugabe von 1,35 ml Lösung IV die Proteine ausgefällt. Durch eine weitere Zentrifugation (15000 rpm, 20 Minuten, 4°C) wurde die im Überstand gelöste Plasmid-DNA von den ausgefällten bzw. nicht gelösten Bestandteilen getrennt. Die Fällung der Plasmid-DNA aus dem Überstand erfolgte durch Zugabe von 5 ml H₂O_{bidest} und 20 ml eiskalten Ethanol (99 % [v/v]) und einer anschließenden Zentrifugation (10000 rpm, 30 Minuten, 4°C). Nach Verwerfen des Überstands wurde der Niederschlag getrocknet und in 600 µl Lösung V gelöst. Die wässrige DNA-Lösung wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Noch in der DNA-Aufarbeitung befindliche RNA wurde durch eine Behandlung (20 Minuten, 37°C) mit 12 µl pankreatischer RNase (2 mg ml⁻¹) abgebaut. Die Entfernung von Proteinresten wurde durch Ausschütteln gegen gleiche Volumina an Phenol, Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform erreicht. Die Oberphase wurde abgenommen und anschließend mit dem 2,5-fachen Volumen an eiskaltem Ethanol versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei -20°C wurde die Plasmid-DNA abzentrifugiert (10000 rpm, 15 Minuten, 4°C), dann getrocknet und in 200 µl Lösung V wieder gelöst. Die Plasmid-DNA wurde durch erneute Zugabe des 2,5-fachen Volumens an eiskaltem Ethanol gefällt, was durch die Zugabe von bis zu 200 µl Lösung VI und anschließende Anpassung der Ethanolmenge erleichtert werden konnte. Nach erneuter Inkubation und Zentrifugation (Parameter s.o.) wurde der Niederschlag noch mit Ethanol

(70 % [v/v]) gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 50 µl sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen.

- Lösung I: 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA
Lösung II: 0,2 M NaOH; 1 % [w/v] SDS, getrennt gelöst und aufbewahrt
Lösung III: 5 M Kaliumacetat
Lösung IV: 10 M Ammoniumacetat
Lösung V: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA
Lösung VI: 0,3 M Natriumacetat

Minipräparation

Die Minipräparation wurde nach Sambrook und Russell durchgeführt. (Sambrook und Russell, in: *Molecular Cloning*, 2001, S. 1.32 - 1.34, verändert).

Die Minipräparationsmethode zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde verwendet, wenn nur kleine DNA-Mengen -zum Beispiel für Kontrollrestriktionen- benötigt wurden.

Von einer über Nacht gewachsenen 3-ml-Kultur wurden 1,5 ml in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 2 Minuten zentrifugiert (10000 rpm, 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Niederschlag in 100 µl Aufschlußlösung resuspendiert und ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, um die Proteine der lysierten Bakterien aus der wässrigen Phase zu entfernen. Nach ca. halbminütigem intensivem Mischen wurde die Emulsion zentrifugiert (10000 rpm, 1 Minute, 4°C) und die obere wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Dieser wurde das 2,5-fache Volumen an eiskaltem Ethanol zugegeben und die DNA 20 Minuten bei -20°C gefällt. Durch anschließende Zentrifugation (14000 rpm, 10 Minuten, 4°C) bildeten diese dann einen Niederschlag, der nach Verwerfen des Überstands in 1 ml Ethanol (70% [v/v]) gewaschen, dann in Vakuum getrocknet und in 15 µl sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen wurde.

Da in dem Isolat noch die bakterielle RNA enthalten war, wurde nachfolgenden Restriktionsansätzen immer RNase zugesetzt.

Aufschlußlösung: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 2,5 M LiCl; 62,5 mM NaEDTA;
4% (v/v) Triton X-100

2.3.8 Vektoren zur konstitutiven Expression

2.3.8.1 Konstruktion des Vektors pPH zur konstitutiven Expression von *p1/hc-pro*

Die kodierende Sequenz von *p1/hc-pro* wurde unter Verwendung der cDNA des Stamms „Sidney 81“ des Weizenstrichelmosaikvirus (von Dr. Kay Scheets, State University of Oklahoma, USA, zur Verfügung gestellt) als template amplifiziert. Das PCR-Programm hatte folgenden Ablauf: Zu Beginn erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 Minuten. Die folgenden 40 Zyklen hatten einen Denaturierungsschritt von 95°C für 1 Minute, einen Hybridisierungsschritt von 60°C für 1 Minute und einen Elongationsschritt von 72°C für 90 s. Nach Ablauf der 40 Zyklen erfolgte eine letzte Elongationsphase bei 60°C von 5 Minuten. Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 50 µl beinhaltete 1× PCR-Reaktionspuffer, 200 µM dNTP, 1 µM forward Primer, 1 µM reverse-Primer, 1,5 mM MgCl₂, 200 pg WSMV-cDNA, 1u Taq-Polymerase, H₂O_{bidest.}

An den Enden der kodierenden Sequenz von P1/HC-Pro wurden durch entsprechendes Primerdesign die Restriktionsstellen für *Bam*HI angehängt, so dass das PCR-Produkt durch nichtdirektionale Klonierung in einen pBluescript[®] SK (+)-Vektor (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 3) eingefügt werden konnte. Dazu wurde das PCR-Produkt nach Sambrook und Russell gereinigt (Sambrook und Russell, in: *Molecular Cloning*, 2001, S. 8.25 – 8.29), indem eine Proteinase K-Behandlung mit anschließender Standard-Ethanol-Präzipitation, Abtrennung der nicht-eingebauten Primer durch Agarosegelelektrophorese und Wiedergewinnung des PCR-Produkts aus dem Agarosegel durchgeführt wurde.

Das so gereinigte PCR-Produkt wurde mit *Bam*HI nach Herstellerangaben restringiert. Die abgetrennten Enden wurden wiederum durch Agarosegelelektrophorese entfernt und das PCR-Produkt aus dem Agarosegel wiedergewonnen. Das verwendete pBluescript[®] SK (+)-Phagemid wurde mit *Bam*HI linearisiert und durch Phosphatase (*cal*f intestine alkaline phosphatase)-Behandlung dephosphoryliert, um die Wahrscheinlichkeit einer Selbstligation zu verringern. Die Ligation des PCR-Produkts mit dem dephosphorylierten Vektor erfolgte mittels T4-Ligase (Fermentas) nach Herstellerangaben. Der Ligationsansatz wurde für die Transformation der rekombinanten Plasmide in kompetente Zellen (*E. coli* DH5a) verwendet. α-Komplementierung war durch die Verwendung des Bakterienstamm *E. coli* DH5-α in Kombination mit pBluescript[®] SK (+) möglich, so dass Kolonien, deren Phagemid ein Insert enthielt, durch Blau-Weiss-Selektion selektiert werden konnten. Einbau und Insertionsrichtung der *p1/hc-pro*-kodierenden Sequenz

wurden durch Kontrollrestriktionen mit *Bam*HI und *Eco*RV überprüft.

Aus pUBIGFP (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 4) wurde der Ubiquitin-Promotor durch Restriktion mit *Pst*I ausgeschnitten und durch nichtdirektionale Klonierung vor *p1/hc-pro* in den Vektor pBS-P1/HC-Pro eingebaut. Der Einbau des Promotors wurde durch Restriktion mit *Pst*I und *Sal*I verifiziert.

Aus pSG516 (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 5) wurde die Polyadenylierungssequenz des Nopalinsynthasegens aus *A. tumefaciens* mit *Sac*I ausgeschnitten und durch nichtdirektionale Klonierung in pBS-Ubi-P1/HC-Pro eingebracht. Zur Analyse wurden Kontrollrestriktionen mit *Bsp*TI und *Eco*RV durchgeführt. Bei richtigem Einbau wurden Fragmente von 3,1 kbp, 2,8 kbp und 1,5 kbp erzielt.



Abbildung 11: pPH (7472 bp). Dieses modifizierte pBluescript® SKII (+) Phagemid beinhaltet die kodierende Sequenz für das Polyprotein P1/HC-Pro des Weizenstrichelmosaikvirus unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais und des Nos-Terminators des Nopalinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

2.3.8.2 Konstruktion der Vektoren pUBINOS-P1 und pUBINOS-HC-Pro zur konstitutiven Expression von *p1* und *hc-pro*

Für die Konstruktion der Vektoren pUBINOS-P1 und pUBINOS-HC-Pro wurde statt der in Abschnitt 2.3.8.1 eingesetzten „Restriktions-/Ligationsmethode“ das Gateway®-Rekombinationsverfahren nach Herstellerangaben (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Beim lysogenen Weg benutzt der Phage λ einen gezielten Rekombinationsmechanismus, um sein Genom in das Bakterienchromosom zu integrieren. Das Gateway®-system der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nutzt den Rekombinationsmechanismus des Phagen λ aus, um Sequenzen effizient in Vektoren einbringen zu können. Dazu werden in einem ersten Schritt Sequenzen durch PCR amplifiziert, wobei während der PCR *attB*-Rekombinationsstellen angehängt werden.

In einem ersten Rekombinationsschritt (der sogenannten BP-Reaktion) wird die

amplifizierte Sequenz dann in einen „Donorvektor“ (z.B. pDONR221®) eingebracht. Dabei wird die von attP-Stellen flankierte Sequenz des Donorvektors, die zumeist ein *ccdB*-Gen und ein Resistenzgen (z.B. Chloramphenicol-Resistenzgen) enthält, ersetzt durch eben die amplifizierte Sequenz. Die dabei neu entstehende, das eingebrachte Gen nun flankierende Sequenz wird als attL-Site bezeichnet. Transformierte Zellen werden positiv gegen ein Antibiotikum (z.B. Kanamycin) selektiert, sowie negativ durch die Expression des *ccdB*-Gens. Dieses bewirkt durch seine Eigenschaft als Gyrasehemmer, dass Zellen, die mit dem Donorvektor transformiert wurden, sich nicht vermehren können. Durch negative und positive Selektion werden nur Zellen erhalten, die einen Vektor mit der amplifizierten Sequenz tragen. Die erhaltenen Vektoren (nun Entry-Vektoren genannt) werden durch geeignete Restriktionsspaltungen überprüft sowie die Zielsequenz durch Sequenzierung über M13-Stellen verifiziert.

Von besonderem Vorteil ist, dass die in einem Entry-Vektor enthaltene Zielsequenz in einer zweiten Rekombinationsreaktion in eine Vielzahl von Destinationsvektoren eingebracht werden kann, ohne die Notwendigkeit diese Sequenz nochmals durch Sequenzierung zu überprüfen, da die Rekombinationsreaktion konservativ ist. Transformierte Zellen werden wiederum, wie oben beschrieben, negativ und positiv selektiert.

Konversion von pUBINOS in einen Gateway®-Vektor

Zunächst wurde der Vektor pUBINOS zur konstitutiven Expression (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 6) in einen Gateway®-Vektor konvertiert. Die Konversion des Vektors wurde mit Hilfe des Gateway® Conversion-Kits nach Herstellerangaben (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Eine Kontrollrestriktion mit *PstI* zeigte, dass der Leserahmen B (bestehend aus attR-Rekombinationsstellen, *ccdB*-Gen und Chloramphenicol-Resistenzgen) in der richtigen Orientierung eingebaut worden war.



Abbildung 12: pUBINOS-Gateway®-Vektor (7156 bp; Ubiquitin-Promotor = Ubiquitin-Promotor aus Mais; *attR1*, *attR2*: attR-Rekombinationsstellen; *chl^r*: Chloramphenicol-Resistenzgen; *ccdB*: *ccdB*-Gen, Gyrasehemmer; Nos-Terminator = Polyadenylierungssequenz des Nopalinsynthesgens aus *Agrobacterium tumefaciens*)

pUBINOS-P1

Die kodierende Sequenz von *p1* wurde unter Verwendung des in Abschnitt 2.3.8.1 beschriebenen pBluescript®-Vektors als template, der die kodierende Sequenz von *p1/hc-pro* enthält, amplifiziert. Das PCR-Programm hatte folgenden Ablauf: Zu Beginn erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 95°C für 30 Sekunden. Die folgenden 30 Zyklen hatten einen Denaturierungsschritt von 95°C für 30 Sekunden, einen Hybridisierungsschritt von 50°C für 30 Sekunden und einen Elongationsschritt von 72°C für 90 s. Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 50 µl beinhaltete 1× PCR-Reaktionspuffer, 800 µM dNTP, 400 µM forward Primer, 400 µM reverse Primer, 2,5 mM MgCl₂, 60 ng pBluescript-*p1/hc-pro*, 1u Taq-Polymerase, H₂O_{bidest.} Reinigung des PCR Produkts und BP-Rekombination mit pDONR221® (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 7) erfolgten nach Herstellerangaben. Nach Verifizierung des Inserts durch Sequenzierung erfolgte die LR-Rekombination des erhaltenen Entry-Vektors pENTR221-P1 mit dem Destinationsvektor pUBINOS-Gateway® (siehe Abschnitt 2.3.8.2, Abbildung 12) nach Herstellerangaben, um den Expressionsvektor pUBINOS-P1 zu erzielen.

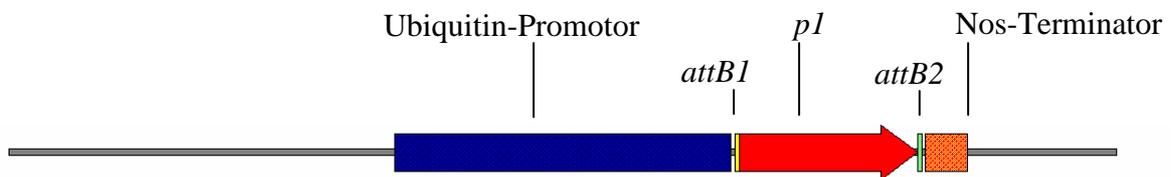


Abbildung 13: pUBINOS-P1 (6560 bp). Dieser von pUBINOS-Gateway® abgeleitete Vektor beinhaltet unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais und des Nos-Terminators des Nopalinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens* die Sequenz für die kodierende Sequenz von *p1* aus dem Weizenstrichelmosaikvirus (Ubiquitin-Promotor = Ubiquitin-Promotor aus Mais; *attB1*, *attB2*: attB-Rekombinationsstellen; *p1*: kodierende Sequenz von P1(Protein1) von WSMV; Nos-Terminator = Poyladylierungssequenz des Nopalinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens*).

pUBINOS-HC-Pro

Die kodierende Sequenz von *hc-pro* wurde unter Verwendung des in Abschnitt 2.3.8.1 beschriebenen pBluescript®-Vektors als template, der die kodierende Sequenz von *p1/hc-pro* enthält, amplifiziert. Das PCR-Programm hatte folgenden Ablauf: Zu Beginn erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 95°C für 1 Minute. Die folgenden 30 Zyklen hatten einen Denaturierungsschritt von 95°C für 1 Minute, einen Hybridisierungsschritt von 53°C für 1 Minute und einen Elongationsschritt von 72°C für 90 s. Der Reaktionsansatz mit einem

Volumen von 50 µl beinhaltete 1× PCR-Reaktionspuffer, 1,6 mM dNTP, 400 µM forward Primer, 400 µM reverse Primer, 2,5 mM MgCl₂, 60 ng pBluescript-*p1/hc-pro*, 2u Taq-Polymerase, H₂O_{bidest.} Reinigung des PCR Produkts und BP-Rekombination mit pDONR221® (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 7) erfolgten nach Herstellerangaben. Nach Verifizierung des Inserts durch Sequenzierung erfolgte die LR-Rekombination des erhaltenen Entry-Vektors pENTR221-HC-Pro mit dem Destinationsvektor pUBINOS-Gateway® (siehe Abbildung 12) nach Herstellerangaben, um den Expressionsvektor pUBINOS-HC-Pro zu erzielen.

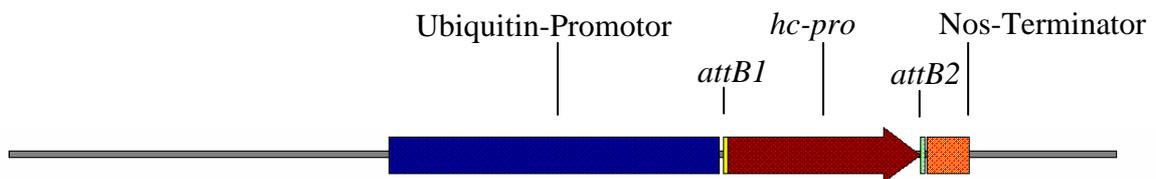


Abbildung 14: pUBINOS-HC-Pro (6659 bp). Dieser von pUBINOS-Gateway® abgeleitete Vektor beinhaltet unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais und des Nos-Terminators des Nopalinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens* die Sequenz für die kodierende Sequenz von *hc-pro* aus dem Weizenstrichelmosaikvirus (Ubiquitin-Promotor = Ubiquitin-Promotor aus Mais; *attB1*, *attB2*: attB-Rekombinationsstellen; *hc-pro*: kodierende Sequenz für HC-Pro (*helper component proteinase*) aus WSMV; Nos-Terminator = Poyladylierungssequenz des Nopalinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens*).

2.3.9 Vektoren zur Expression des mutierten *p1/hc-pro* bzw. *p1*

Gerichtete Mutagenese des FIVMG-Motivs in P1 aus WSMV

Durch gerichtete Mutagenese wurde das in P1 konservierte FIVMG-Motiv durch Insertion eines Tripeptids aus Asparagin, Histidin und Glycin unterbrochen (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16). Das Motiv liegt am C-terminalen Ende des reifen P1-Proteins bzw. im nicht-prozessierten P1/HC-Pro-Polyprotein nahe der Spaltstelle von P1 und HC-Pro.

Laut Verchot *et al.* (1991) resultierte die Insertion von 9 Nukleotiden in der Einführung eines TMA-Tripeptid auf Aminosäureebene. Allerdings wurde der Insertionsort nie sequenziert, so dass die genaue Insertion nicht bekannt ist (Prof. V.B. Vance, pers. Mitteilung). Aufgrund der in den Veröffentlichungen angegebenen Daten ist zu vermuten, dass die Insertion nicht, wie angegeben, auf Aminosäureebene in der Insertion eines TMA-Peptids resultierte, sondern in der Insertion eines NHG-Tripeptids.

Zudem wurde die Mutation zunächst als „TEV-F“ bezeichnet (Verchot und Carrington, 1995a,b; Shi *et al.*, 1997), während spätere Untersuchungen zeigten, dass die

entsprechende Mutation in der ursprünglich als „TEV-B“ bezeichneten Mutante vorlag (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Prof. V.B. Vance, pers. Mitteilung).

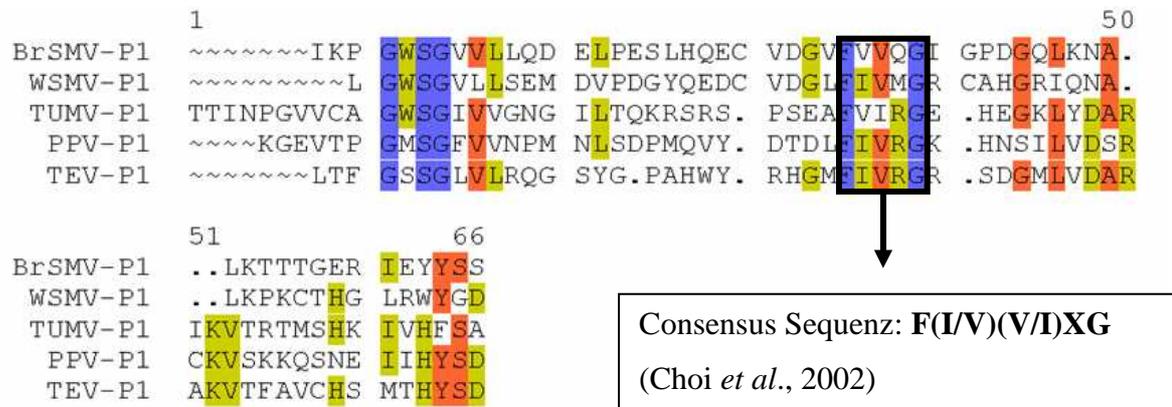


Abbildung 15: Aminosäuren-Sequenzvergleich der C-terminalen Region von P1 aus *Brome streak mosaic virus* (BrSMV), *Weizenstrichelmosaikvirus* (WSMV), *Turnip mosaic virus* (TUMV), *Plum pox virus* (PPV) und *Tobacco etch virus* (TEV). Hervorgehoben ist die konservierte Region, die durch die Consensus-Sequenz F(I/V)(V/I)XG gekennzeichnet ist.

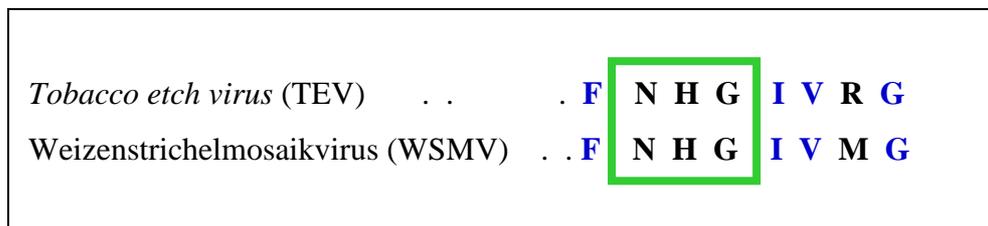


Abbildung 16: Insertion eines Tripeptids aus Asparagin, Histidin und Glycin in das konservierte F(I/V)(V/I)XG-Motiv von P1 aus *Tobacco etch virus* (TEV) und *Weizenstrichelmosaikvirus* (WSMV).

Kit

Zur Durchführung der gerichteten Mutagenese wurde das “QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) nach Herstellerangaben mit den in Abschnitt 2.3.2 angegebenen Primern verwendet.

Während der Mutagenese-Reaktion wird das gesamte Plasmid unter Verwendung der Primer durch eine Polymerase repliziert. Das ursprüngliche Plasmid wird dann durch ein methylierungssensitives Enzym zerstört, während die neu synthetisierten, nicht-methylierten Plasmide intakt bleiben. Nach Transformation in *E.coli* XL1 Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) wurden Einzelkolonien vermehrt und das mutierte

Plasmid durch Restriktion und Sequenzierung überprüft.

2.3.9.1 Vektor pPH-mut zur konstitutiven Expression des mutierten *p1/hc-pro*

Gerichtete Mutagenese des FIVMG-Motivs von P1 aus WSMV im Vektor pPH

Der Reaktionsansatz ($V = 50 \mu\text{l}$) beinhaltete $5 \mu\text{l}$ 10-fach Reaktionspuffer, 50 ng dsDNA template (pPH, vgl. 2.3.8.1, Abbildung 11), 125 ng primer 1, 125 ng primer 2, $1 \mu\text{l}$ dNTP-Mix, $1 \mu\text{l}$ PfuTurbo DNA-Polymerase ($2.5 \text{ U}/\mu\text{l}$) sowie optional $2 \mu\text{l}$ DMSO.

Das PCR-Programm hatte folgenden Ablauf: Zu Beginn erfolgte ein Denaturierungsschritt bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 Sekunden. Die folgenden 18 Zyklen hatten einen Denaturierungsschritt von $95 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 Sekunden, einen Hybridisierungsschritt von $55 \text{ }^\circ\text{C}$ für 1 Minute und einen Elongationsschritt von $68 \text{ }^\circ\text{C}$ für 7,5 Minuten ($1 \text{ min}/\text{kb}$). Der Erfolg der Mutation wurde durch Restriktion mit *NcoI* und Sequenzierung überprüft. Durch die 9bp-Insertion war eine neue *NcoI*-Restriktionsstelle etwa in der Mitte der kodierenden Sequenz von *p1/hc-pro* eingeführt worden, so dass die Insertion durch das erhaltene Bandenmuster überprüft werden konnte. Die Mutageneseeffizienz in Reaktionsansätzen ohne DMSO betrug 20 %, in Ansätzen mit DMSO 81 %.

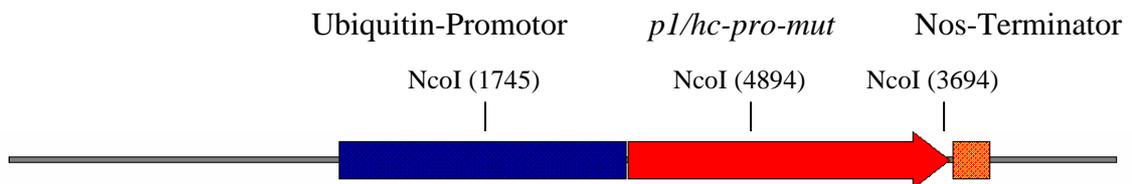


Abbildung 17: pPH-mut (7481 bp). Dieser von pPH abgeleitete Vektor beinhaltet unter der Kontrolle des konstitutiven Ubiquitin-Promotors aus Mais und des Nos-Terminators des Nopalinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens* die kodierende Sequenz für das modifizierte Polyprotein P1/HC-Pro des Weizenstrichelmosaikvirus. Durch die Insertion von 9 Nukleotiden entstand eine neue *NcoI*-Restriktionsstelle in der *p1/hc-pro*-kodierenden Sequenz.

2.3.9.2 Konstruktion des Vektors pUBINOS-P1-mut zur konstitutiven Expression des mutierten *p1*

Die gerichtete Mutagenese des Vektors pENTR221-P1 (siehe Abschnitt 2.3.8.2, Konstruktion des Vektors pUBINOS-P1) wurde wie in Abschnitt 2.3.9.1 für pPH beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass der Elongationsschritt nur 4 Minuten

betrug, da der als Template verwendete Vektor pENTR221-P1 wesentlich kürzer war als pPH. Durch die Insertion von 9 Nukleotiden entstand eine neue *NcoI*-Restriktionsstelle in der *p1*-kodierenden Sequenz. Nach Überprüfung der erfolgten Insertionsmutation durch Restriktion mit *NcoI* und Sequenzierung wurde das mutierte P1 über eine Gateway®-LR-Reaktion zur konstitutiven Expression in den Vektor Destinationsvektor pUBINOS-Gateway® (siehe Abschnitt 2.3.8.2, Abbildung 12) eingebracht.

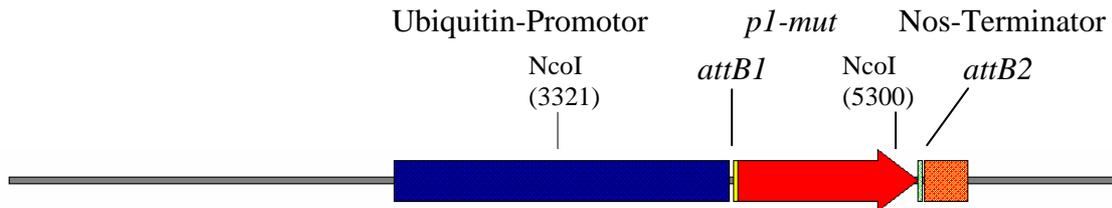


Abbildung 18: pUBINOS-P1-mut (6569 bp). Dieser von pENTR221-P1 und PUBINOS-Gateway® abgeleitete Vektor beinhaltet unter der Kontrolle des konstitutiven Ubiquitin-Promotors aus Mais und des Nos-Terminators des Nopalinsynthesegens aus *Agrobacterium tumefaciens* die Sequenz für das modifizierte Protein P1 des Weizenstrichelmosaikvirus. Durch die Insertion von 9 Nukleotiden entstand eine neue *NcoI*-Restriktionsstelle in der *p1*-kodierenden Sequenz.

2.3.10 Vektoren zur subzellulären Lokalisierung

2.3.10.1 Konstruktion des Vektors pK7FWG2-P1 zur zellulären Lokalisierung von P1

Die kodierende Sequenz von *p1* wurde unter Verwendung des in Abschnitt 2.3.8.1 beschriebenen pBluescript®-Vektor als template, der die kodierende Sequenz von *p1/hc-pro* enthält, amplifiziert. Die mit *attB*-Rekombinationsstellen versehenen Primer wurden so gewählt, dass sich am 5'-Ende der amplifizierten *p1*-Sequenz ein Start-, am 3'-Ende aber kein Stopp-Codon befindet. Das letztere würde eine C-terminale Fusion unmöglich machen. Am 3'-Ende der Sequenz von *p1* wurde noch ein C hinzugefügt, um den *reading frame* („Leseraster A“), den die meisten für C-terminale Fusionen vorgesehenen Gateway®-Zielvektoren benutzen, einzuhalten.

Das PCR-Programm hatte folgenden Ablauf: Zu Beginn erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 95°C für 1 Minute. Die folgenden 30 Zyklen hatten einen Denaturierungsschritt von 95°C für 1 Minute, einen Hybridisierungsschritt von 53°C für 1 Minute und einen Elongationsschritt von 72°C für 90 s. Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 50 µl beinhaltete 1× PCR-Reaktionspuffer, 1,6 mM dNTP, 400 µM forward Primer, 400 µM reverse Primer, 2,5 mM MgCl₂, 60 ng pBluescript-*p1/hc-pro*, 2u Taq-Polymerase,

H₂O_{bidest.} Reinigung des PCR Produkts und BP-Rekombination mit pDONR221® (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 7) erfolgten nach Herstellerangaben. Nach Verifizierung des Inserts durch Sequenzierung erfolgte die LR-Rekombination des erhaltenen Entry-Vektors pENTR221-P1-fus mit dem Destinationsvektor pK7FWG2 (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 10) nach Herstellerangaben, um den Expressionsvektor pK7FWG2-P1 zu erzielen.



Abbildung 19: pK7FWG2-P1 (11282 bp) dient der Expression eines P1:GFP-Fusionsproteins, wobei P1 an den N-Terminus von GFP fusioniert ist. Das Fusionsprotein steht unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors (*egfp*: enhanced green fluorescent protein; *attB2*, *attB1*: attB-Rekombinationsstellen; *p1*: kodierende Sequenz von *p1* (*protein1*) von WSMV; RB: right border; *spec^r*: Spectinomycin-/Streptomycin-Resistenzgen; LB: left border; *kan^r*: Kanamycin-Resistenzgen)

2.3.10.2 Konstruktion des Vektors pK7FWG2-HC-Pro zur zellulären Lokalisierung von HC-Pro

Die kodierende Sequenz von *hc-pro* wurde unter Verwendung des in Abschnitt 2.3.8.1 beschriebenen pBluescript®-Vektor als template, der die kodierende Sequenz von *p1/hc-pro* enthält, amplifiziert. Die mit attB-Rekombinationsstellen versehenen Primer wurden so gewählt, dass sich am 5'-Anfang der amplifizierten *hc-pro*-Sequenz ein Start-, am 3'-Ende aber kein Stopp-Codon befindet. Das letztere würde eine C-terminale Fusion unmöglich machen. Am 3'-Ende der Sequenz von *hc-pro* wurde noch ein C hinzugefügt, um das Leseraster („Leseraster A“), das die meisten für C-terminale Fusionen vorgesehenen Gateway®-Zielvektoren benutzen, einzuhalten.

Das PCR-Programm hatte folgenden Ablauf: Zu Beginn erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 95°C für 1 Minute. Die folgenden 30 Zyklen hatten einen Denaturierungsschritt von 95°C für 1 Minute, einen Hybridisierungsschritt von 53°C für 1 Minute und einen

Elongationsschritt von 72°C für 90 s. Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 50 µl beinhaltete 1× PCR-Reaktionspuffer, 1,6 mM dNTP, 400 µM forward Primer, 400 µM reverse Primer, 2,5 mM MgCl₂, 60 ng pBluescript-*p1/hc-pro*, 2u Taq-Polymerase, H₂O_{bidest.} Reinigung des PCR Produkts und BP-Rekombination mit pDONR221® (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 7) erfolgten nach Herstellerangaben. Nach Verifizierung des Inserts durch Sequenzierung erfolgte die LR-Rekombination des erhaltenen Entry-Vektors pENTR221-HC-Pro-fus mit dem Destinationsvektor pK7FWG2 (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 10) nach Herstellerangaben, um den Expressionsvektor pK7FWG2-HC-Pro zu erzielen.



Abbildung 20: pK7FWG2-HC-Pro (11382 bp) dient der Expression eines HC-Pro:GFP-Fusionsproteins, wobei HC-Pro an den N-Terminus von GFP fusioniert ist. Das Fusionsprotein steht unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors (*egfp*: enhanced green fluorescent protein; *attB2*, *attB1*: attB-Rekombinationsstellen; *hc-pro*: kodierende Sequenz von *hc-pro* (helper component proteinase) von WSMV; RB: right border; *spec^r*: Spectinomycin-/Streptomycin-Resistenzgen; LB: left border; *kan^r*: Kanamycin-Resistenzgen)

2.3.11 Vektoren zur induzierbaren Expression

2.3.11.1 Konstruktion des Vektors pMDC7-GUS zur induzierbaren Expression von *glucuronidase* als Reportergen

Der Vektor pMDC7-GUS dient der Estradiol-induzierbaren Expression von *glucuronidase*. pMDC7-GUS wurde nach Angaben von Invitrogen (Karlsruhe) hergestellt durch Gateway®-Rekombination des Destinationsvektors pMDC7 und des Entryvektors pENTR-gus® (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 8 und Abbildung 9).

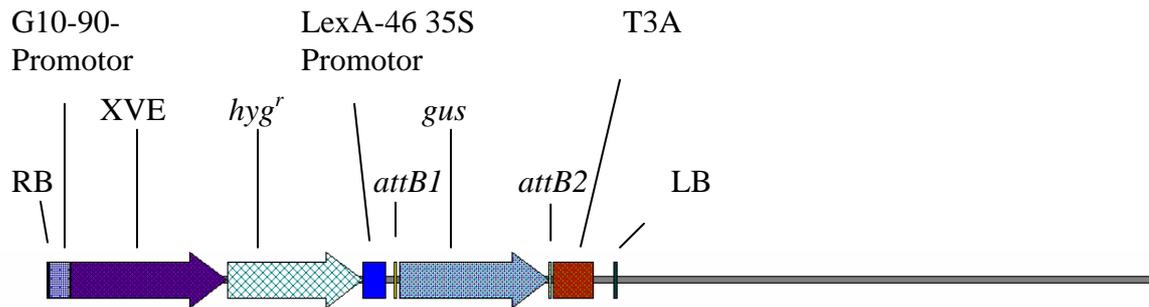


Abbildung 21: pMDC7-GUS (13415 bp). Dieser von pMDC7 abgeleitete Vektor zur Estradiol-induzierbaren Expression von *glucuronidase* beinhaltet unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors G10-90 (Ishige *et al.*, 1999) die kodierende Sequenz des Transkriptionsfaktors XVE. In aktiviertem Zustand bindet XVE an die LexA Operatorsequenz und induziert damit die Expression von *glucuronidase*. (RB: right border; G10-90-Promotor: Tetramer der G-Box 10-Sequenz (GCCACGTGCC) fusioniert an einen minimalen -90 CaMV-35S-Promotor; XVE: chimärer Transkriptionsfaktor; *hyg^r*: Hygromycin-Resistenzgen; LexA-46 35S Promotor: LexA Operatorsequenz fusioniert an minimalen -46-CaMV-35S-Promotor; *attB1*, *attB2*: attB-Rekombinationsstellen; *gus*: β -Glucuronidase-Gen; T3A: Polyadenylierungssequenz; LB: left border)

2.3.11.2 Konstruktion des Vektors pMDC7-P1 zur induzierbaren Expression von *p1*

Der Vektor pMDC7-P1 dient der Estradiol-induzierbaren Expression von *p1* aus WSMV. pMDC7-P1 wurde nach Angaben von Invitrogen (Karlsruhe) hergestellt durch Gateway®-Rekombination des Destinationsvektors pMDC7 (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 9) und des Entryvektors pENTR-P1 (siehe Abschnitt 2.3.8.2, Konstruktion des Vektors pUBINOS).

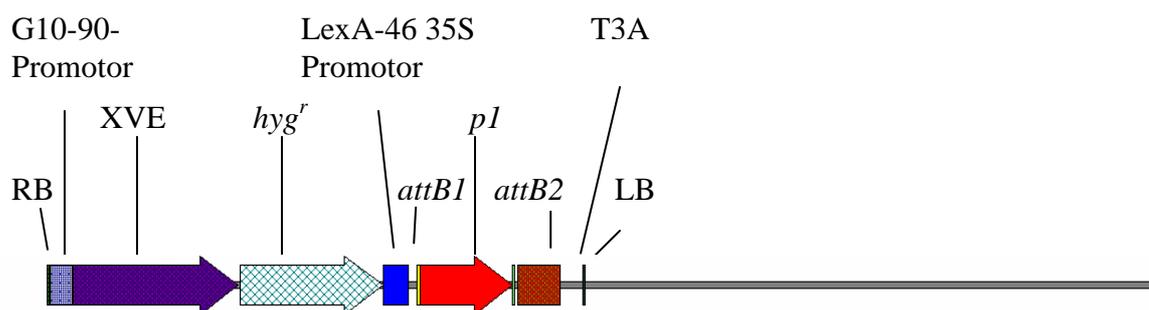


Abbildung 22: pMDC7-P1 (12633 bp). Dieser von pMDC7 abgeleitete Vektor zur Estradiol-induzierbaren Expression von *p1* beinhaltet unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors G10-90 (Ishige *et al.*, 1999) die kodierende Sequenz des Transkriptionsfaktors XVE. In aktiviertem Zustand bindet XVE an die LexA Operatorsequenz und induziert damit die Expression von *p1*. (RB: right border; G10-90-Promotor: Tetramer der G-Box 10-Sequenz (GCCACGTGCC) fusioniert an einen minimalen -90 CaMV-35S-Promotor; XVE: chimärer Transkriptionsfaktor; *hyg^r*: Hygromycin-Resistenzgen; LexA-46 35S Promotor: LexA Operatorsequenz fusioniert an minimalen -46-CaMV-35S-Promotor; *attB1*, *attB2*: attB-Rekombinationsstellen; *p1*: kodierende Sequenz von *p1* (*protein1*) von WSMV; T3A: Polyadenylierungssequenz; LB: left border)

2.3.12 Anlegen von Bakteriendauerkulturen

Um Bakterienstämme lange Zeit zu lagern wurden glycerinhaltige Kulturen angelegt, die bei -80°C aufbewahrt wurden.

2.4 Biolistische Transformation von Weizen

2.4.1 Verwendete Kultivare

Für die stabile und transiente Transformation wurde die Sommerweizenvarietät *Triticum aestivum* cv. ‚Combi‘ (Engelen Büchling, Oberschneiding; Zulassung 1990) verwendet, die in Deutschland agronomisch eingesetzt wird, sowie die Varietät ‚Bobwhite‘ SH 98 26 (CIMMYT, El Batan, Mexiko).

Die Varietät ‚Brujo‘ (Criadero Klein S.A., Argentinien) wurde nur für die stabile Transformation eingesetzt.

2.4.2 Anzucht des Pflanzenmaterials

Keimung und Anzucht der Spenderpflanzen erfolgte ganzjährig im Gewächshaus in 10 Liter Plastikgefäßen, in die je 30 Karyopsen ausgesät wurden. Als Substrat diente ein Gemisch aus 70 % Kompost und 30 % Lehm. Die Mindesttemperatur betrug 20°C und die Mindestbeleuchtungsstärke $180\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in Pflanzenhöhe, die durch Zusatzbeleuchtung mit Quecksilberdampflampen gewährleistet wurde.

2.4.3 Plasmide

pGFPBAR (M. Huber *et al.*, 2002)

pGFPBAR dient der konstitutiven Expression der Reportergene *bar* und *gfp* in monokotyledonen Pflanzen. Der zur Transformation von Pflanzen wichtige Abschnitt enthält das 2,69 kb *NotI*-Fragment aus pMON30049 (Pang *et al.*, 1996). Dieses Fragment besteht aus einem Mais Hitzeschock-Protein 70 Intron sowie einem chimären S65T*gfp*-Intron-Gen, deren Expression durch einen verstärkten 35S-Promoters kontrolliert wird. Das zweite Intron entspricht dem IV2-Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffeln und wurde in eine kryptische 5'-Spleiß-Stelle der S65T-Sequenz eingefügt. Des Weiteren enthält der Vektor das 2,88 kb *HindIII/EcoRI*-Fragment aus pAHC25 mit einem chimären *bar*-Gen

unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais (Christensen und Quail, 1996). Das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Spencer *et al.*, 1990) bewirkt eine Resistenz gegen Phosphinotricin, das die Glutaminsynthese hemmt.

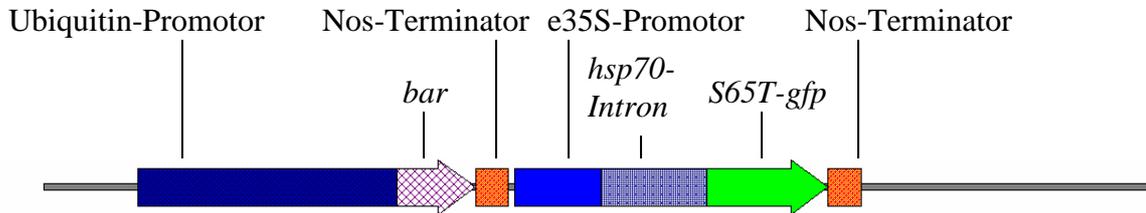


Abbildung 23: pGFPBAR (8510 bp). Der Vektor dient der konstitutiven Expression des Resistenzgens *bar* sowie von *gfp* in monokotyledonen Pflanzen. (Ubiquitin-Promotor: Ubiquitin-Promotor aus Mais; *bar*: Resistenzgen gegen Phosphinotricin aus *Streptomyces hygroscopicus*; Nos-Terminator: Polyadenylierungssequenz des Nopalinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens*; e35S-Promotor: verstärkter 35S Promotor aus *cauliflower mosaic virus*; *hsp70*-Intron: Mais Hitze-Schock-Protein 70 Intron; *S65T-gfp*: chimäres S65T-*gfp*-Gen mit Intron).

pAHC25 (Christensen und Quail, 1996)

pAHC25 dient der konstitutiven Expression des Resistenzgens *bar* gegen Phosphinotricin und des Reportergens β -glucuronidase in monokotyledonen Pflanzen. Die Expression beider Gene wird durch den Ubiquitin-Promotor aus Mais kontrolliert.

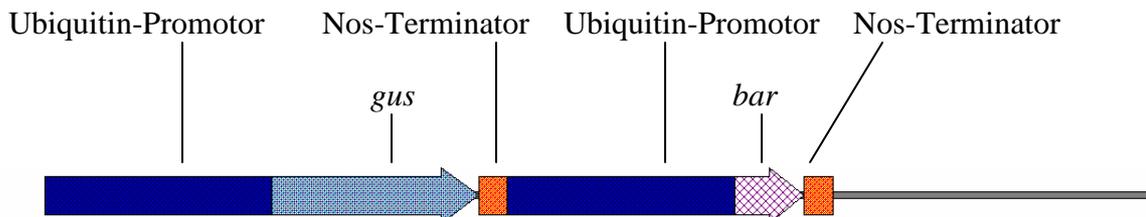


Abbildung 24: pAHC25 (9706 bp). Dieser Vektor dient zur konstitutiven Expression der Reportergene *glucuronidase* bzw. *bar* unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors (Ubiquitin-Promotor: Ubiquitin-Promotor aus Mais; *gus*: β -Glucuronidase-Gen; Nos-Terminator: Polyadenylierungssequenz des Nopalinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens*; *bar*: Resistenzgen gegen Phosphinotricin aus *Streptomyces hygroscopicus*).

2.4.4 Partikelbeschuss

Sämtliche Transformationsexperimente wurden mit der Partikelbeschusstechnik (Sanford *et al.*, 1987) durchgeführt. Die Apparatur (PDS-1000/He, Russel-Kikkert, 1993) sowie alle Zubehörteile wurden von der Firma BioRad, München, bezogen.

Geräteeinstellungen

Der Innenraum wurde durch 70%igen [v/v] Ethanol oberflächensterilisiert, die Abstoppgitter durch Erhitzen auf 180° C für 2 Stunden oder abflammen. Das Vakuum beim Partikelbeschuss betrug 27 Zoll Quecksilbersäule, was einem Unterdruck von ca. 915 hpa entspricht. Für den Beschuss wurde Helium der Reinheit 4.6 verwendet.

Vorbereitung des Mikroprojektils

250 mg Gold (Biorad, München) wurde in 5 ml deionisiertem Wasser suspendiert. Nach einer Ultraschallbehandlung wurde das Gold zweimal in Wasser gewaschen, danach in 5 ml reinem Ethanol aufgenommen und in 250 Aliquots à 20 µl portioniert. Die Reaktionsgefäße wurden mit Parafilm verschlossen.

Die Fällung der DNA auf die Goldpartikel (BioRad Gold, 0,6 µm Durchmesser) erfolgte nach Pellegrineschi (Pellegrineschi *et al.*, 2002). Dazu wurden zunächst 20 µl der im Ultraschallbad kurz homogenisierten Goldsuspension mit je 5 µl DNA (ca. 1 µg/µl) versetzt und gut durchmischt. Die Fällung der DNA wurde durch gleichzeitige Zugabe von 50 µl einer 2,5 M CaCl₂-Lösung und 20 µl einer 0,1 M Spermidinlösung erreicht. Die Suspension wurde anschließend 15 min durchmischt und kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 250 µl 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen und in 120 µl reinem Ethanol aufgenommen. Direkt vor dem Beschuss wurde die Suspension kurz im Ultraschallbad homogenisiert. Pro Beschuss wurden 12 µl der Suspension eingesetzt, was einer Goldmenge von 100 µg entspricht. Für die 0,1 molare Spermidinlösung wurden 145 mg Spermidin ((3-Aminopropyl)-1,4-diaminobutan) in 10 ml H₂O_{bidest} aufgenommen und durch Filtration mit Filtropur S 0.2 Filtern von Sarstedt AG & Co (Nürnbrecht) sterilisiert. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Für die 2,5 molare CaCl₂-Lösung wurden 11 g CaCl₂ × 6H₂O in H₂O_{bidest} in einem Endvolumen von 20 ml gelöst und ebenfalls durch Filtration mit Filtropur S 0.2 Filtern von Sarstedt AG & Co (Nürnbrecht) sterilisiert. Die CaCl₂-Lösung wurde in 1-ml Aliquots bei 4 °C aufbewahrt.

Vorbereitung der Makroprojekte

Die Makroprojekte wurden für 1-2 Minuten in 70 %igem [v/v] Ethanol oberflächensterilisiert, die Halterungen durch Erhitzen auf 180°C für 2 Stunden oder abflammen. Nachdem die Makroprojekte getrocknet und in die Halterungen eingesetzt worden waren, wurden 12 µl DNA-beladene Goldsuspension mittig aufgetropft. Die Trocknung der Goldsuspension erfolgte unter der Sterilbank.

2.4.5 Transiente Transformation

Vorbereitung des Zielgewebes

Zur Untersuchung der transienten Expression der viralen Suppressoren unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors wurden 2-3 mm große Embryonen aus Karyopsen der Varietät ‚Combi‘ verwendet. Zunächst wurden die entspelzten Karyopsen einer 15-minütigen Oberflächensterilisation in einer 25 %igen Sterilisations-Stammlösung und 0,01 % Tween 20 unterzogen und anschließend fünfmal in sterilem Wasser gewaschen. Unreife Embryonen wurden unter dem Stereomikroskop präpariert, indem die Karyopse knapp oberhalb des Embryos aufgeschnitten und der Embryo mit leichtem Druck auf die Spitze der Karyopse herausgedrückt wurde. Die so präparierten unreifen Embryonen wurden mit der embryonalen Achse nach unten auf MSE3-Medium (siehe Abschnitt 2.4.6.2) gelegt und bei 25°C und Dunkelheit kultiviert. Die Sterilisations-Stammlösung enthält 10,5 % (w/v) NaOCl; 0,3 % (w/v) Na₂CO₃; 10 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) NaOH.

Zur subzellulären Lokalisierung von GFP-Fusionsproteinen wurden junge Blätter sowie unreife Körner der Weizenkultivare ‚Combi‘ und ‚Bobwhite SH 98 26‘ verwendet, die auf MS Medium ausgelegt wurden.

Partikelbeschuss

Der Partikelbeschuss sowohl zur Untersuchung der transienten Expression von viralen Suppressoren in Embryonen als auch zur subzellulären Lokalisierung von GFP-Fusionsproteinen wurde wie unter Abschnitt 2.4.4 beschrieben durchgeführt. Die Abstände betragen zwischen Berstscheibe und Makroprojektil ca. 10 mm, zwischen Makroprojektil und Abstoppgitter ca. 3 mm.

Bei der Durchführung des Partikelbeschusses zur transienten Expression der viralen

Suppressoren wurden Berstscheiben eines Sollwerts von 1350 psi sowie ein Abstand von 9,5 cm zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter gewählt; bei den Partikelbeschüssen zur Lokalisierung der Fusionsproteine wurden Berstscheiben eines Sollwerts von 900 psi bzw. 1100 psi verwendet, während der Abstand zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter zwischen 6,5 und 9,5 cm variierte.

Dokumentation und Auswertung

transiente Expression in Weizenembryonen

Um zu überprüfen, ob der Beschuss der Embryonen zu einer transienten Expression der auf den eingebrachten Plasmiden enthaltenen Genen führte, wurde die *gfp*-Expression mit einem GFP-Scope (Leica MZFL3, Leica Camera AG, Solms) visualisiert und mit einer CCD-Kamera (Zeiss Axio Cam, Carl Zeiss GmbH, Oberkochen) dokumentiert.

Pro Beschuss wurden ca. 100 Weizenembryonen präpariert und mit verschiedenen Konstrukten transformiert. Beschüsse der Embryonen mit einem bestimmten Konstrukt wurden dreimal in unabhängigen Versuchen wiederholt. Einen Tag nach Beschuss wurden 20-30 Embryonen mit etwa 20 bis 50 *gfp*-exprimierenden Zellen ausgewählt. Die *gfp*-Expression wurde mit dem Programm ImageProPlus (ProMicron, Kirchheim/Neckar) analysiert. Dieses Programm kann Farb- und Helligkeitsunterschiede in den beschossenen Geweben registrieren und dadurch sowohl Fläche als auch Anzahl der *gfp*-exprimierenden Zellen pro Scutellum bestimmen. Fünf Tage nach Beschuss wurden Fläche und Anzahl der *gfp*-exprimierenden Zellen erneut bestimmt. Dabei wurde jeweils die gleiche Vergrößerungsstufe und Belichtungszeit nach einem und fünf Tagen für die Fotos gewählt. Die einen Tag nach Beschuss bestimmten Werte bezüglich Fläche der *gfp*-exprimierenden Zellen wurden addiert und die Summe gleich 100 % gesetzt. Entsprechend wurden die fünf Tage nach Beschuss bestimmten Werte addiert und in Relation zu der für Tag eins berechneten Summe gesetzt. Daraus ergibt sich die relative Fläche *gfp*-exprimierender Zellen fünf Tage nach Beschuss. Analog wurden die relative Anzahl *gfp*-exprimierender Zellen fünf Tage nach Beschuss bestimmt.

transiente Expression zur subzellulären Lokalisierung von Fusionsproteinen

Für Lokalisierungsstudien wurde ein konfokales Mikroskop des Typs Leica TCS SP Leica MZFL3 (Leica Camera AG, Solms) verwendet.

2.4.6 Stabile Transformation

Weizen der Varietät ‚Bobwhite SH 98 26‘ wurde nach der Methode von Pellegrineschi *et al.* (2002) transformiert. In Abbildung 25 ist der Ablauf der stabilen Transformation von Weizen schematisch dargestellt. Abbildung 26 zeigt einzelne Schritte wie Präparation der Embryonen, Kallusbildung und Regeneration transgener Pflanzen.

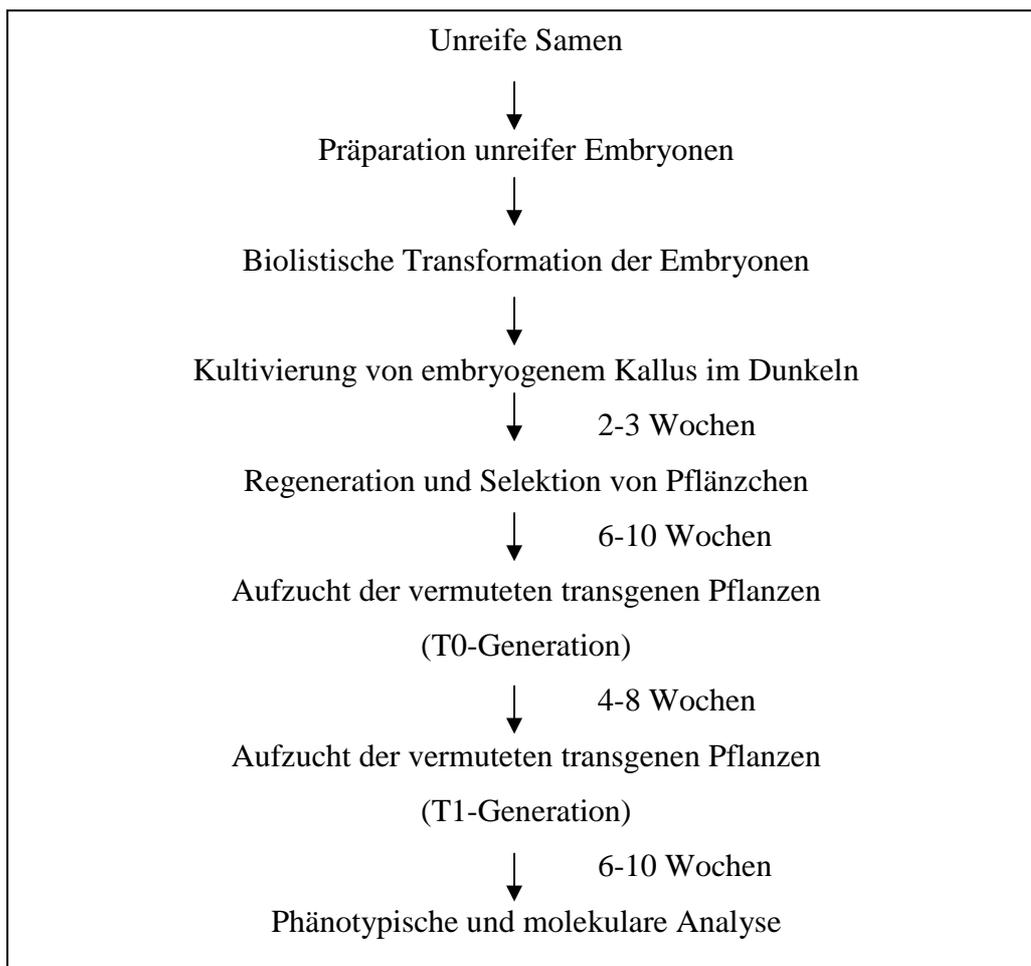


Abbildung 25: Schematisches Schaubild zum zeitlichen Ablauf der Weizentransformation. Der gesamte Vorgang von Partikelbeschuss der Embryonen bis zur Gewinnung von transgenen Pflanzen (T0-Generation) dauert mindestens 3 Monate; Pflanzen der ersten Nachkommen-Generation (T1-Generation) können frühestens 4,5 bis 5 Monate nach Partikelbeschuss analysiert werden.

Es gibt prinzipiell 4 Parameter, die die Effizienz der Weizentransformation bestimmen: Der Genotyp des verwendeten Weizenkultivars, der Zustand der Donorpflanzen, Beschussbedingungen und Dauer und Art der Gewebekultur. Einen umfassenden

Überblick über die verwendete Methoden der Weizentransformation bieten Ingram *et al.*, (2001) und Bhalla *et al.* (2006).

Beschussbedingungen können durch Veränderung physikalischer und biologischer Parameter verändert werden. Physikalische Parameter schließen ein: Art der Fällung der verwendeten DNA auf Microcarrier, Art und Größe der Microcarrier, Beschussystem, Beschussdruck, angelegter Unterdruck, Abstand zwischen Berstscheibe und Macrocarrier, Abstand zwischen Macrocarrier und Stoppgitter und Abstand zwischen Stoppgitter und zu beschießendem biologischen Material. Biologische Parameter umfassen: Größe der verwendeten Embryonen, Art der Exzision der Embryonen aus den Körnern, Vorkultur der Embryonen zur Induktion von embryogenem Gewebe vor Beschuss, Art und Dauer einer Vorbehandlung der Embryonen vor und nach Beschuss. Grundsätzlich werden die Beschussbedingungen so gewählt, dass eine Schädigung der Embryonen durch den Beschuss mit Microcarriern minimiert wird und gleichzeitig die Einbringung der verwendeten DNA in den Zellkern transformierter Zellen möglichst effizient ist. Bei zu starker Schädigung der Embryonen entsteht kein oder zu wenig embryogener Kallus, die Regenerationsrate und damit die Transformationsrate sinkt. Bei ungenügendem Transfer von DNA entsteht kein oder zu wenig transgener Kallus, so dass aus dem embryogenen Kallus keine transgenen Pflanzen entstehen.

Die beschossenen Embryonen werden für zwei bis vier Wochen im Dunkeln kultiviert, um die Entstehung embryogenen Kallus zu fördern. Hierbei spielt die Art des Gewebekulturmediums und die Höhe der Auxinkonzentration in diesem Medium eine entscheidende Rolle. Auch kann bereits in diesem Stadium ein Selektionsagens zugefügt werden. Zumeist werden Medien verwendet, die auf dem MS-Medium beruhen (Murashige und Skoog, 1962). Als künstliches Auxin wird meist 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) verwendet. An diese Kultivierungsphase schließt sich eine Regenerationsphase im Licht an. Dazu werden die Kalli auf Regenerationsmedium überführt, welches üblicherweise kein Auxin mehr enthält. Diesem Regenerationsmedium wird ein Selektionsmittel zugeführt, um die Entstehung nicht-transgener Pflanzen zu hemmen.

Zwar wurden die Parameter Genotyp, Beschussbedingungen und Gewebekultur von Pellegrineschi *et al.* (2002) optimiert, doch treten auch am CIMMYT nicht erklärbare Schwankungen der Qualität der Donorpflanzen auf, die die Transformationseffizienz stark beeinträchtigen. Es ist zwar allgemein anerkannt, dass möglichst vitale

Donorpflanzen essentiell für einen Transformationserfolg sind, wie dieser Zustand aber erreicht und gemessen werden kann, bleibt unklar. Nimmt man noch die häufigen Ausfälle durch Infektionen der Gewebekultur hinzu, sollte man Angaben sowohl zur Reproduzierbarkeit als auch Höhe der veröffentlichten Transformationseffizienzen im Allgemeinen mit einem Fragezeichen versehen. Da es in der Weizentransformation notwendig ist, auf embryonales Gewebe zurückzugreifen, scheint die intensive Erforschung der Parameter, die die Qualität der Donorpflanzen und damit des embryonalen Gewebes bestimmen, eine vordringliche Aufgabe, da andernfalls eine reproduzierbare Etablierung der Transformationsmethode nicht gewährleistet werden kann.

2.4.6.1 Plasmide

Zur Durchführung der stabilen Transformation wurden Plasmide verwendet, die mit Hilfe des Plasmid Midi Kits (Qiagen, Hilden) aus *E.coli* isoliert worden waren. Die Konzentration wurde mittels Spektroskopie (siehe Abschnitt 2.2.2) auf 0,5 µg/µl eingestellt. Die Qualität der DNA wurde auf einem Agarosegel überprüft.

2.4.6.2 Medien

MSE3-Medium

Dieses Medium wurde für die Induktion von embryonem Kallus verwendet und basiert auf dem MS Medium von Murashige and Skoog (1962).

Tabelle 1: Zusammensetzung des MSE3-Mediums.

	1000 ml
MS Makroelemente (10×)	200 ml
MS Mikroelemente (10×)	100 ml
MS Vitamine (1000×)	1 ml
Thiamin-Cl	0.040 mg
L-Asparagin	0.150 g
Saccharose	20 g
2,4-D (1 mg/ml)	2.5 ml
Bacto-Agar	9 g

Für das MSE3-Maltose-Medium zur Behandlung der Embryonen vor dem Beschuss wurde Saccharose durch Maltose (15 % w/v) ersetzt.

MS Makroelemente, MS Mikroelemente, MS Vitamine, Thiamin-Cl, Asparagin, Saccharose, 2,4-D und Maltose wurden von Sigma (München) bezogen, Bacto-Agar von Becton Dickinson (Sparks, MD, USA).

MSR-Medium

Dieses Medium wurde zur Regeneration der Weizenpflanzen aus Kallus verwendet und basiert ebenfalls auf dem MS Medium von Murashige and Skoog (1962). Zur Selektion vermuteter transgener Weizenpflanzen mit einer Resistenz gegen Phosphinotricin (PPT) wurden nach Sterilisation des Mediums 5 ml einer PPT-Lösung (1 mg/ml) zugegeben. Die PPT-Lösung wurde nach Sterilisation mit Filtropur S 0.2 Filtern von Sarstedt AG & Co (Nürnbrecht) bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des MSR-Mediums.

	1000 ml
MS Salze	4.43 g
Thiamin-Cl	0.040 mg
L-Asparagin	0.15 g
Saccharose	20 g
Bacto-Agar	9 g

MS Salze wurden von Sigma (München) bezogen, Phosphinotricin (PPT) von Duchefa (Haarlem, Niederlande).

2.4.6.3 Partikelbeschuss

Der Partikelbeschuss wurde wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben durchgeführt, allerdings mit einigen kleinen Modifikationen. So betrug die Distanz zwischen Berstscheibe und Makroprojektil ca. 20 mm, zwischen Makroprojektil und Abstoppgitter ca. 8 mm und zwischen Abstoppgitter und Zielgewebe 9,8 cm. Es wurden 900 psi-Berstscheiben verwendet.

2.4.6.4 Vorbereitung des Zielgewebes

Die unreifen Körner wurden wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben sterilisiert, wobei bei der Präparation der Embryonen die Embryonalachse mit einem Skalpell entfernt wurde (Abbildung 26 A, B). Es wurden vorzugsweise etwa 1 mm große Embryonen verwendet, die auf MSE3-Maltose-Medium platziert wurden. Die Präparation der Embryonen wurde vormittags durchgeführt, der Partikelbeschuss am frühen Nachmittag. Daraus ergibt sich eine unterschiedliche Verweildauer der Embryonen auf dem MSE3-Maltose-Medium von einer bis vier Stunden.

2.4.6.5 Gewebekultur

Die Embryonen wurden entweder am Tag des Beschusses oder am darauffolgenden Tag von MSE3-Maltose-Medium auf MSE3-Medium überführt. Sie wurden für 2 bis 3 Wochen im Dunkeln bei 27°C kultiviert, um die Kallusbildung hervorzurufen (Abbildung 26 C, D). Zum Zeitpunkt des Transfers sollten die Kalli zwischen 0,4 bis 0,7 cm groß sein. Die beste Regenerationsfähigkeit zeigt embryogener, globulärer Kallus, der etwas härter und cremefarben ist. Üblicherweise formt sich embryogener Kallus an den Seiten des Embryos. Der Kallus sollte spätestens nach 3 Wochen auf das Regenerationsmedium MSR überführt werden, das als Selektionsmittel 5 mg/l Phosphinotricin (Duchefa, Haarlem, Niederlande) enthält, und in eine Lichtkammer bei 26°C und einer Photoperiode von 16h:8h gestellt werden, um die Entstehung von Schossen zu induzieren (Abbildung 26 E, F). Sobald Pflänzchen aus den Transformationsexperimenten regeneriert sind und die Kontrolle (Kallus aus nicht transformierten Embryonen) abgestorben ist, werden die vermuteten transgenen Pflanzen entweder einer zweiten Selektionsrunde unterworfen oder zur Wurzelbildung in MS Medium ohne Selektionsmittel überführt (Abbildung 26 G). Wenn die Pflanzen stark genug sind und ein gut entwickeltes Wurzelsystem haben, erfolgt die Überführung in Erde. Sie bleiben dann für etwas 3 Tage unter einer Plastikhaube in einer Klimakammer und werden dann in das Gewächshaus überführt (Abbildung 26 H).

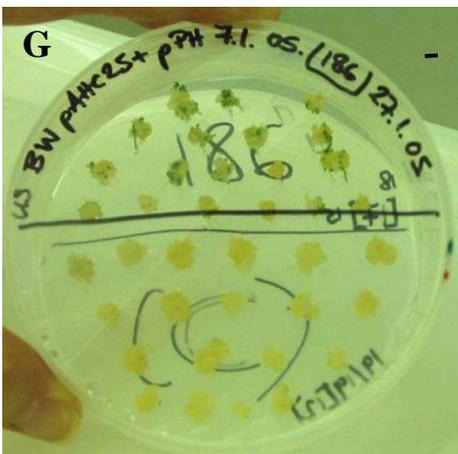
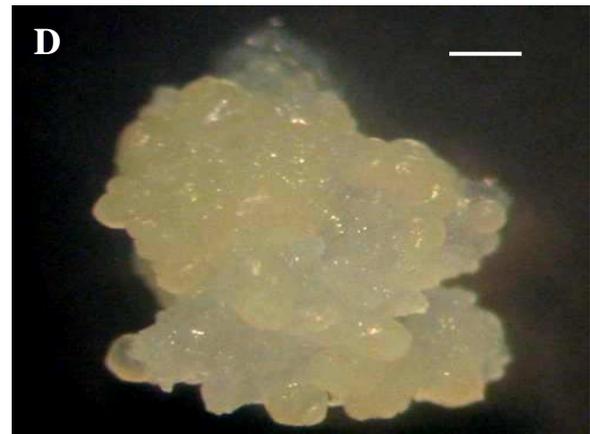
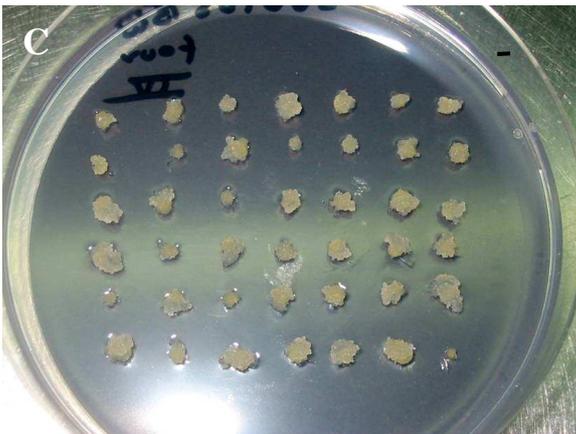


Abbildung 26: Ablauf der Weizentransformation. (A) Präparation unreifer Embryonen aus Körnern. (B) Unreife Embryonen vor biolistischem Beschuss. (C) Embryonen 2-3 Wochen nach Kultivierung im Dunkeln. (D) Embryogener Kallus. (E, F) Aus embryogenem, transgenem Kallus sich regenerierender, *gfp*-exprimierender Spross, (E) im Tageslicht, (F) nach Anregung der GFP-Fluoreszenz. (G) Selektion vermuteter transgener Schösslinge im Vergleich zur Kontrolle (untere Hälfte, nicht transformiert). (H) Aufzucht transgener Pflanzen. Der Größenmaßstab in A bis F stellt jeweils 1 mm dar. Die Weizenpflanzen in H haben etwa eine Höhe von 10 cm.

2.5 Analyse der transgenen Weizen-Pflanzen

2.5.1 Aufzucht

Die Aufzucht der transgenen Pflanzen erfolgte im Gewächshaus wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben.

2.5.2 Extraktion genomischer DNA

60-100 mg Blattmaterial (ca. 2-3 cm Weizenblatt) wurden in einem 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammen mit 2 Edelstahlkugeln (Durchmesser ca. 1 mm) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Einsätze der Kugelmühle wurden in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und das Gewebe dann bei Maximalgeschwindigkeit für 3 min zerkleinert. Nach Zugabe von 1300 µl Extraktionspuffer pro Reaktionsgefäß wurden diese nach kurzem Mischen bei 65 °C, vorzugsweise bei Intervallschütteln, für 15 min inkubiert. Nach kurzem Abkühlen (1 min) bei Raumtemperatur wurde 650 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) zugegeben und kräftig gemischt. Nach Zentrifugation (2 min, RT, 14000 rpm) wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde eine RNase-Behandlung mit 10 µl RNase (10 µg/µl in TE-Puffer) für 10-20 Minuten bei 37°C durchgeführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 700µl Isopropanol. Nach Zentrifugation (2 min, RT, 14000 rpm) wurde der Überstand entfernt, 1 ml Waschpuffer zugegeben und nach 5 Minuten zwei Minuten lang bei Raumtemperatur und 14000 rpm nochmals zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands erfolgte ein letzter Waschschrift durch Zugabe von 2 ml Ethanol (70 % [v/v]) und eine nochmalige Zentrifugation (2 min, RT, 14000 rpm). Der Niederschlag wurde nach Trocknung bei Raumtemperatur in 50 µl H₂O_{bidest} gelöst und ein Aliquot von 1 µl zur Kontrolle der Qualität der genomischen DNA auf einem Agarosegel aufgetragen.

Extraktionspuffer: 0,13 M Tris-Cl, pH 7,5; 0,92 M NaCl; 0,067 M EDTA, pH 8,0
Waschpuffer: Ethanol 76 % [v/v] ; 10 mM Ammoniumacetat

2.5.3 PCR

2.5.3.1 Primer

PCR-Produkt	Oligonukleotidsequenz	Produktlänge
P1	5'-CCGGATCCAATGGCAACAGCGAATTGT-3' 5'-CCCGGATCCTCAATACCATCTAAGTCCATG-3'	1077 bp

PCR-Produkt	Oligonukleotidsequenz	Produktlänge
P1/HC-Pro	5'-CCGGATCCAATGGCAACAGCGAATTGT-3' 5'-CCGGATCCTCAGCCAATTTTGTAATCTTT-3'	2228 bp

PCR-Produkt	Oligonukleotidsequenz	Produktlänge
Hyg- LexA35S- Promotor	5'-ACACAAATCGTCGCCCGCAGAAG-3' 5'- TCAGCGTGTCTCTCCAAATG -3'	739 bp

2.5.3.2 PCR Programm für *p1* bzw. *p1/hc-pro*

Zu Beginn erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 Minuten. Die folgenden 40 Zyklen hatten einen Denaturierungsschritt von 95°C für 1 Minute, einen Hybridisierungsschritt von 60°C für 1 Minute und einen Elongationsschritt von 72°C von 90 s im Falle der Amplifikation von *p1* und von 150 s im Falle der Amplifikation von *p1/hc-pro*. Nach Ablauf der 40 Zyklen erfolgte eine letzte Elongationsphase bei 60°C von 5 Minuten. Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 50 µl beinhaltete 1× PCR-Reaktionspuffer, 200 µM dNTP, 1 µM forward Primer, 1 µM reverse Primer, 1,5 mM MgCl₂, 1 µg genomische DNA, 1u Taq-Polymerase, H₂O_{bidest.} Alle verwendeten Reagenzien wurden von Fermentas bezogen.

Die amplifizierten Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die Größe der Produkte über einen Standard (1-kb-GeneRuler-Ladder, Fermentas) abgeschätzt.

2.5.3.3 PCR Programm für Hyg-LexA-35S

Eine allen von pMDC7 abgeleiteten Vektoren gemeinsame Sequenz bestehend aus einem Teil der kodierenden Sequenz des Hygromycinresistenzgens sowie dem LexA-35S-Promotor wurde amplifiziert (Hyg-LexA-35S). Zu Beginn erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 Minuten. Die folgenden 29 Zyklen hatten einen Denaturierungsschritt von 95°C für 1 Minute, einen Hybridisierungsschritt von 57 °C für 1 Minute und einen Elongationsschritt von 72°C von 1 Minute. Nach Ablauf der 30 Zyklen erfolgte eine letzte Elongationsphase bei 72 °C von 5 Minuten. Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 25 µl beinhaltete 1× PCR-Reaktionspuffer, 200 µM dNTP, 1 µM forward Primer, 1 µM reverse Primer, 1,5 mM MgCl₂, 1 µg genomische DNA, 1u Taq-Polymerase, H₂O_{bidest.} Alle verwendeten Reagenzien wurden von Fermentas bezogen.

2.5.4 Nachweis der β-Glucuronidase Aktivität

2.5.4.1 Kolorimetrischer Nachweis

Kleingeschnittenes Blattmaterial (50-100 mg) von Weizen- oder *Arabidopsis*-Pflanzen wurde unter Zuhilfenahme der Kugelmühle zerkleinert, wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben. Nach Zugabe von 80 µl Extraktionspuffer und gutem Mischen wurden die Blattreste durch eine Zentrifugation (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 10000 rpm, 10 min) sedimentiert. Der Überstand (= Protein-Rohextrakt) wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Protein-Konzentration unter Verwendung des BioRad Protein Assay Farbstoff-Konzentrats nach Bradford (1976) bestimmt.

Der Protein-Rohextrakt (50 µg Gesamtprotein), wurde mit eisgekühltem Reaktionspuffer auf 500 µl aufgefüllt. Die Enzymreaktion wurde durch eine Inkubation bei 37°C im Wasserbad gestartet. Die Probenentnahme erfolgte nach 0, 15, 30 und 60 min, indem 100 µl aus dem Reaktionsansatz entnommen und in ein mit 900 µl Stopp-Puffer vorbereitetes Eppendorfggefäß gegeben wurden. Anschließend wurde die Konzentration des freigesetzten 4-Methylumbelliferons (MU) im Fluoreszenzspektrometer (Jasco FP6300) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Spaltenbreite von 2,5 nm bzw. einer Emissionswellenlänge von 450 nm und einer Spaltenbreite von 5,0 nm bestimmt. Die Einstellung des mechanischen Nullpunkts erfolgte mit Stopp-Puffer, die Kalibrierung anhand einer MU-Eichgerade in Stopp-Puffer. Die Enzymaktivität wurde in pmol

freigesetztes MU pro mg Protein und Minute angegeben und nach folgendem Weg berechnet: Zunächst wurden die Fluoreszenzwerte mit dem Faktor 10 (Verdünnungsfaktor in Stopp-Puffer) multipliziert. Dann wurde die Differenz zwischen benachbarten Werten ermittelt (z.B. Differenz zwischen dem Wert bei 15 Minuten und dem Wert bei 0 Minuten). Die ermittelten Werte wurden durch die entsprechende Minutenzahl (15 Minuten, bzw. 30 Minuten) geteilt, um so den Fluoreszenzwert pro Minute zu erhalten. Aus diesen Werten wurde der durchschnittliche Fluoreszenzwert mit Standardabweichung berechnet. Über die Regressionsformel $y = 0,0002 x^{1,0183}$ wurde der dem Fluoreszenzwert entsprechende Wert der Molarität des freigesetzten Methylumbelliferol berechnet. Man erhält somit die Molarität des freigesetzten Methylumbelliferol pro Minute.

Extraktionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄-Puffer, pH 7,0; 10 mM Dithiothreitol (DTT);

1 mM EDTA; 0,1 % [w/v] Laurylsarcosin; 0,1 % [w/v] Triton X-100

Reaktionspuffer: 1 mM 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (gelöst in Dimethylformamid) in Extraktionspuffer

Stopp-Puffer: 0,2 M Na₂CO₃

2.5.4.2 Histochemischer Nachweis

Der histochemische Nachweis der β-Glucuronidase-Aktivität erfolgte an Embryonen (24 h nach Beschuß), Blättern und Pollen. Die Färbung wurde durch Inkubation in GUS-Färbelösung (18-24 h, 37°C) durchgeführt, bei Blättern wurde zusätzlich vorher der Reaktionspuffer durch ein kurzes Anlegen von Vakuum in die Blätter infiltriert.

GUS-Färbelösung: 50 mM NaH₂PO₄ /Na₂HPO₄-Puffer, pH 7,0; 0,5 mM X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronid, Cyclohexylammoniumsalz, Roth, Karlsruhe); 0,5 mM K-Hexacyanoferrat (II); 0,5 mM K-Hexacyanoferrat (III)

2.5.5 Estradiol-Induktion

Als Estradiol-haltiges Festmedium wurde MS-Medium verwendet, wobei der pH-Wert auf 5,7 vor Zugabe der Saccharose eingestellt wurde. Nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 40 °C wurde β-Estradiol (Sigma, München) einer Stammlösung in einer Menge entsprechend der gewünschten Endkonzentration zugegeben, d.h. beispielsweise 2 ml einer 10 mM Stammlösung (in DMSO) für eine Endkonzentration von 20 µM β-Estradiol.

Tabelle 3: Zusammensetzung des MS-Mediums.

	1000 ml
MS-Pulver	4.4 g
Saccharose	20 g
Plant Agar	6 g

MS Pulver, Saccharose und Plant Agar wurden von Duchefa (Haarlem, Niederlande) bezogen.

Als Positivkontrolle wurden transgene Arabidopsispflanzen zur Estradiol-induzierbaren *gus*-Expression (pMDC136-5-5-1 Ler: pMDC17 GT10-90XVE::GUS) verwendet, die freundlicherweise von Dr. Mark Curtis, ETH Zürich, zur Verfügung gestellt worden waren. Samen wurden steril auf Hygromycin-haltigen (25 ng/ml) MS-Agarplatten ausgesät und kultiviert.

2.5.6 Phänotypische Untersuchungen

2.5.6.1 Keimungstest

Jeweils 15 Embryonen einer Länge von ca. 2 mm wurden aus unreifen Weizenkörnern transgener sowie wildtyp-Weizenpflanzen herausgeschnitten und auf Estradiol-haltigem MS-Medium so ausgelegt, dass nur das Skutellum in Kontakt mit dem Medium war. Nach 24 Stunden Inkubation bei Raumlicht erfolgte die Belichtung der Embryonen in der Lichtkammer. Die Keimungsrate wurde nachfolgend jeweils alle 24 Stunden erfasst. Die Versuche mit wildtyp-Pflanzen wurden dreimal wiederholt, während die Versuche mit transgenen Weizenpflanzen nur einmal durchgeführt werden konnten.

2.6 Bioinformatische Methoden

GCG (Wisconsin oder GCG-Paket der Firma Accelrys, früher Genetics Computer Group)

Über dieses Programm konnte auf zahlreiche bioinformatische Analyseprogramme zugegriffen werden. *Gap* diente zum optimalen *Alignment* und Vergleich zweier Sequenzen. *PileUp* wurde verwendet, um mehrere Sequenzen miteinander zu vergleichen (multiples *Alignment*), was beispielsweise für die Ermittlung von Ähnlichkeitsgrades der

Aminosäuresequenzen von P1 aus Potyviren und Tritimoviren der Fall war. *Translate* diente der Übersetzung von cDNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen.

JaMBW 1.1 (http://members.aol.com/_ht_a/lucatoldo/myhomepage/JaMBW/;
verantwortlicher Programmierer: Eugen Buehler)

Unter dieser Java Molecular Biologist's Workbench genannten Seite finden sich mehrere Programme, die Hilfestellungen für molekularbiologische Arbeiten liefern. Die Programme dienen zum Invertieren von DNA-Sequenzen in komplementäre Sequenzen und zum Berechnen der Primeranlagerungstemperaturen.

SimVector 3.0

Dieses Programm von PREMIER Biosoft International (Palo Alto, Kalifornien, USA) wurde verwendet, um Vektorkarten zu erstellen sowie um Restriktionsanalysen und die Konstruktion von Vektoren zu planen.

2.7 Statistische Auswertung

Zur Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurde der ONE WAY ANOVA Test im Programm SigmaStat verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Konstitutive Expression viraler Suppressoren (transiente Transformation)

In einem transienten Assay sollte anhand der Aktivitätsbestimmung eines Reportergens überprüft werden, ob die konstitutive Expression von *p1/hc-pro* aus WSMV auf eine Suppressoraktivität schließen lässt. Zunächst wurde ein Konstrukt verwendet, das die gesamte kodierende Sequenz von *p1/hc-pro* unter der Kontrolle des konstitutiven Ubiquitin-Promotors enthielt. Dies bietet den Vorteil, dass *p1/hc-pro* wie im viralen Genom als Polyprotein exprimiert werden und durch autoproteolytische Spaltung des Polyproteins durch die Proteinase P1 zwei Proteine vorliegen, die den bei Virusinfektion entstehenden P1 und HC-Pro entsprechen. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob sich die Suppressoraktivität einem der beiden Proteine zuordnen lässt, ob die Proteine zusammenwirken, um die Suppressoraktivität zu erhöhen und ob eine in ein konserviertes Motiv von P1 eingeführte Mutation die Aktivität von P1 bzw. P1/HC-Pro einschränkt.

Wegen des Vorteils, die Expression von *gfp* *in vivo* beobachten zu können und damit die Veränderung der *gfp*-Expression in denselben transformierten Objekten beobachten zu können, wurden Weizenembryonen mit Konstrukten zur konstitutiven Expression verschiedener mutmaßlicher viraler Suppressoren zusammen mit einem Konstrukt zur konstitutiven Expression von *gfp* nach der in Abschnitt 2.4.5 beschriebenen Methode kotransformiert. Die verwendeten Vektoren pUBIGFP, pPH, pUBINOS-P1, pUBINOS-HC-Pro, pPH-mut und pUBINOS-P1-mut zur Expression von *gfp*, *p1/hc-pro*, *p1*, *hc-pro*, mutiertem *p1/hc-pro* und mutiertem *p1* sind in den Abschnitten 2.3.3, 2.3.8.1, 2.3.8.2, 2.3.9.1 und 2.3.9.2 beschrieben sowie in Abbildung 4, Abbildung 11, Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 17 und Abbildung 18 gezeigt. Weizenembryonen wurden ausgewählt, weil sie steril kultiviert werden können und sie kein Chlorophyll enthalten, dessen Fluoreszenz die GFP-Fluoreszenz überdecken könnte. Da auch beabsichtigt war, den Effekt von P1/HC-Pro auf siRNA von *gfp* zu untersuchen, wurden reifere Embryonen einer Länge von 2-3 mm verwendet, da so eine größere Menge transformierten Gewebes zur Isolierung von *gfp*-siRNA gewonnen werden sollte.

Die Fläche bzw. Anzahl *gfp*-exprimierender Zellen einen Tag und fünf Tage nach Beschuss wurden wie in den Abschnitten 2.4.5 und 2.7 beschrieben bestimmt und statistisch ausgewertet.

3.1.1 Konstitutive Expression von *p1/hc-pro*

Expression von gfp

Zunächst wurde *gfp* in Abwesenheit viraler Suppressoren in Weizenembryonen transient exprimiert. Die *gfp*-Expression transformierter Zellen wurde wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben nach einem und nach fünf Tagen ermittelt. Dieser Versuch diente als Kontrolle, um Stärke und Verlauf der *gfp*-Expression ohne Beeinflussung durch Suppressoren zu beobachten.

Abbildung 27 zeigt exemplarisch denselben Embryo zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Transformation mit pUBIGFP alleine. Fünf Tage nach Beschuss waren nur mehr wenige *gfp*-exprimierende Zellen zu erkennen.

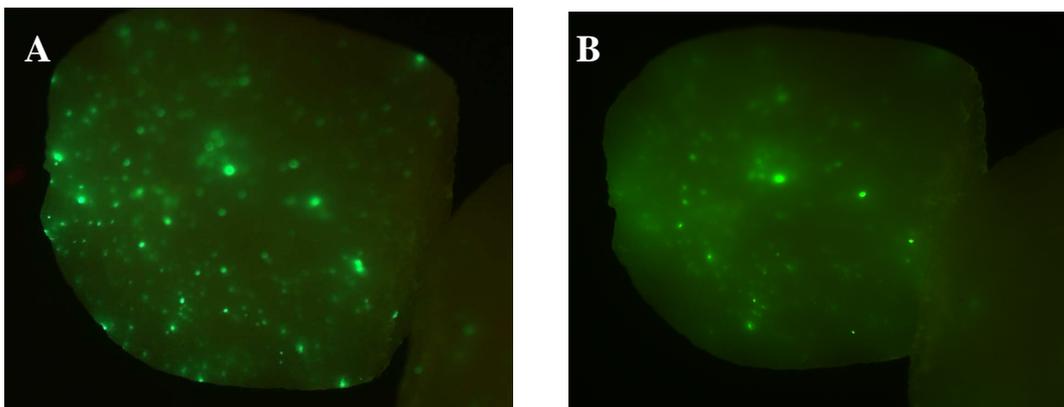


Abbildung 27: Transiente *gfp*-Expression in einem mit pUBIGFP transformierten Weizenembryo einer Länge von 2 mm. (A) Ein Tag nach Beschuss. (B) Derselbe Embryo wie in (A) fünf Tage nach Beschuss.

Expression von gfp und p1/hc-pro

Um zu überprüfen, ob die Expression von *p1/hc-pro* eine verlängerte *gfp*-Expression bewirkt, wurde eine analoge Transformation unter Verwendung der Vektoren pUBIGFP und pPH durchgeführt. Dabei wurden beide Plasmide gleichzeitig auf Gold gefällt, so dass in den transformierten Zellen sowohl *gfp* als auch *p1/hc-pro* exprimiert wurden.

Abbildung 28 zeigt wiederum exemplarisch einen Embryo einen Tag und fünf Tage nach Beschuss.

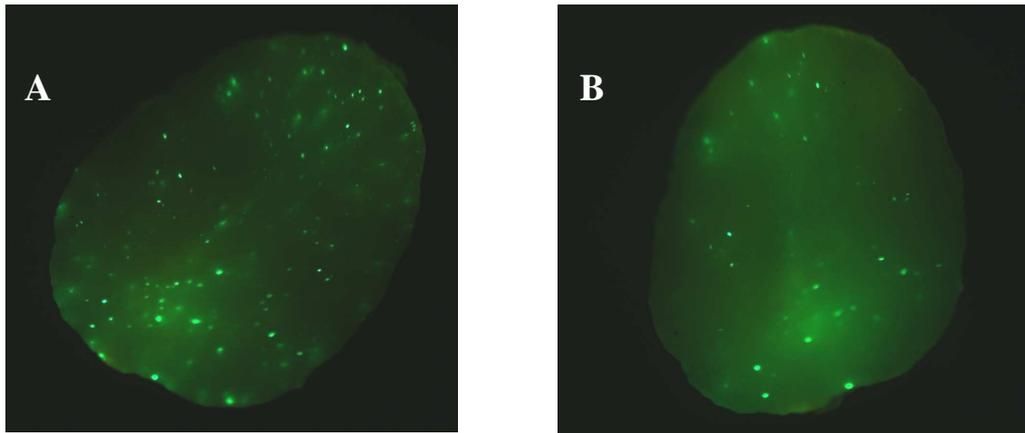


Abbildung 28: Transiente Expression von *gfp* und *p1/hc-pro* in einem mit pUBIGFP und pPH transformierten Weizenembryo mit einer Länge von 2 mm. (A) Ein Tag nach Beschuss. (B) Derselbe Embryo wie in (A) fünf Tage nach Beschuss.

Fläche bzw. Anzahl *gfp*-exprimierender Zellen fünf Tage nach Beschuss in Relation zu Fläche bzw. Anzahl einen Tag nach Beschuss sind für alle Beschusseexperimente, unter anderem *gfp* alleine und *gfp* mit *p1/hc-pro*, in Tabelle 4 und Tabelle 5 zusammengefasst. Klar erkennbar ist, dass sich die relative *gfp*-exprimierende Fläche an Tag 5 der Kotransformationen von *gfp* und *p1/hc-pro* sehr signifikant von der Kontrolle (*gfp* alleine) unterscheidet.

Tabelle 4: Die relative *gfp*-exprimierende Fläche fünf Tage nach Transformation mit *gfp* allein (Kontrolle), *gfp* und *p1/hc-pro*, *gfp* und *p1* und *hc-pro* (auf getrennten Plasmiden), *gfp* und *p1*, *gfp* und *hc-pro*, *gfp* und mutiertem *p1* sowie *gfp* und mutiertem *p1/hc-pro*. Die *gfp*-exprimierende Fläche nach einem Tag wurde gleich 100 % gesetzt. Mittelwerte, die sich sehr signifikant ($p \leq 0,01$) von der Kontrolle (*gfp* allein) unterschieden, sind mit zwei Sternen (**) gekennzeichnet.

Relative <i>gfp</i> - exprimierende Fläche nach 5 Tagen	GFP	GFP + P1/HC-Pro	GFP + P1 + HC-Pro	GFP + P1	GFP + HC-Pro	GFP + P1-mut	GFP + P1/HC- Pro-mut
1. Versuchsreihe	26,9	55,7	45,4	43,9	24,5	10,6	26,5
2. Versuchsreihe	18,5	44,7	48,2	48,1	29,2	27,9	13,2
3. Versuchsreihe	28,0	65,0	62,4	57,3	18,7	22,3	14,6
Mittelwert	24,5	55,1**	52,0**	49,8**	24,1	20,3	18,1
Standard- abweichung	5,2	10,2	9,1	6,9	5,3	8,8	7,3

Tabelle 5: Relative Anzahl der *gfp*-exprimierenden Zellen fünf Tage nach Transformation mit *gfp* allein, *gfp* und *p1/hc-pro* (Polyprotein), *gfp* und *p1* und *hc-pro* (auf getrennten Plasmiden), *gfp* und *p1*, *gfp* und *hc-pro*, *gfp* und mutiertem *p1* sowie *gfp* und mutiertem *p1/hc-pro*. Die *gfp*-exprimierende Fläche nach einem Tag wurde gleich 100 % gesetzt. Mittelwerte, die sich signifikant ($p \leq 0,05$) von der Kontrolle (*gfp* allein) unterschieden, sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Rel. Anzahl der <i>gfp</i> -expr. Zellen nach 5 Tagen	GFP	GFP + P1/HC-Pro	GFP + P1 + HC- Pro	GFP + P1	GFP + HC-Pro	GFP + P1-mut	GFP + P1/HC- Pro-mut
1. Versuchsreihe	29,2	41,5	51,2	47,3	38,0	28,2	20,2
2. Versuchsreihe	17,3	58,0	37,4	36,9	21,4	13,2	14,9
3. Versuchsreihe	24,8		55,8	48,4	25,5	24,1	15,6
Mittelwert	23,8	49,8*	48,1*	44,2*	28,3	21,8	16,9
Standard- abweichung	6,0	11,7	9,6	6,3	8,7	7,8	2,9

Expression von gfp, p1 und hc-pro

Da die *gfp*-Expression durch P1/HC-Pro sehr signifikant verstärkt war, sollte in einem weiteren Versuch geklärt werden, ob P1 und HC-Pro auch eine verlängerte *gfp*-Expression bewirken könnten, wenn sie zwar kotransformiert, aber alleine auf getrennten Vektoren exprimiert werden. Eine getrennte Expression der Suppressoren sollte es ermöglichen zu untersuchen, ob die autokatalytische Spaltung des Polyproteins *in cis* durch die Serinprotease P1 notwendig für die Suppressoraktivität ist. Entsprechend wurden Embryonen kotransformiert mit pUBIGFP sowie pUBINOS-P1 und pUBINOS-HC-Pro.

Abbildung 29 zeigt wiederum exemplarisch einen Embryo einen Tag und fünf Tage nach Beschuss.

P1 und HC-Pro führten auch bei getrennter Expression zu einer sehr signifikanten Verstärkung der *gfp*-Expression vergleichbar mit der Expression des Polyproteins P1/HC-Pro, welches erst durch autokatalytische Spaltung in die reifen Proteine P1 und HC-Pro prozessiert wird (siehe Tabelle 4 und Tabelle 5).

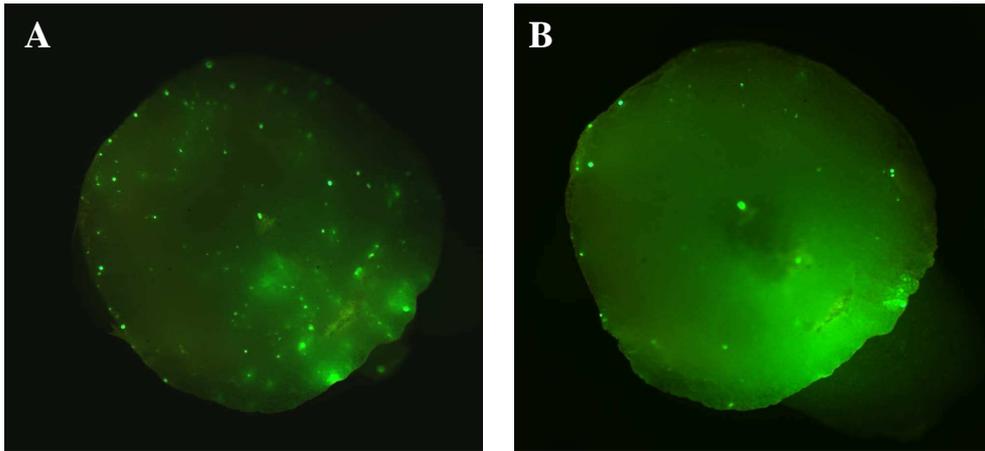


Abbildung 29: Transiente Expression von *gfp*, *p1* und *hc-pro* in einem mit pUBIGFP, pUBINOS-P1 und pUBINOS-HC-Pro transformierten Weizenembryo mit einer Länge von 2 mm. (A) Ein Tag nach Beschuss. (B) Derselbe Embryo wie in (A) fünf Tage nach Beschuss.

Expression von *gfp* und *p1* (alleine) bzw. *gfp* und *hc-pro* (alleine)

Da eine Suppressoraktivität von P1/HC-Pro beobachtet wurde unabhängig davon, ob P1/HC-Pro als Polyprotein oder als reife Proteine P1 und HC-Pro exprimiert wurden, sollte in weiteren Versuchen überprüft werden, ob P1 oder HC-Pro alleine eine verstärkte *gfp*-Expression bewirken könnten. Entsprechend wurden Embryonen in weiteren Versuchen zunächst kotransformiert mit pUBIGFP und pUBINOS-P1 (siehe Abbildung 30) bzw. mit pUBIGFP und pUBINOS-HC-Pro (siehe Abbildung 31).

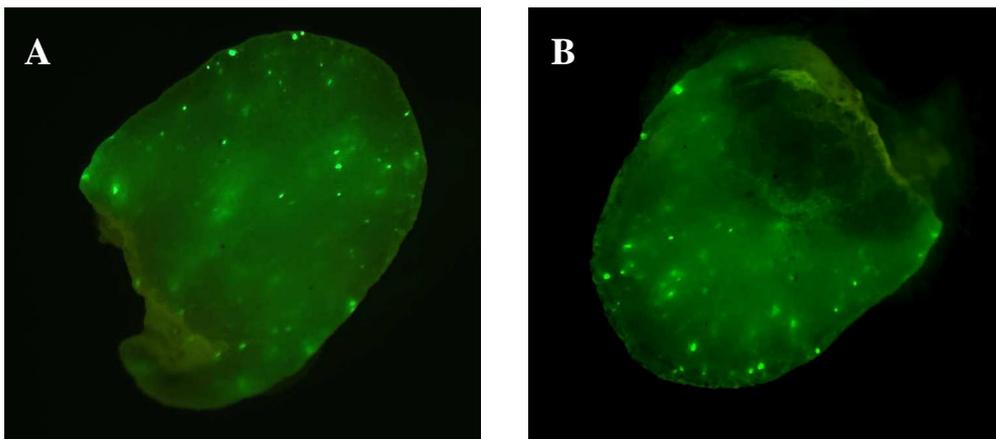


Abbildung 30: Transiente Expression von *gfp* und *p1* in einem mit pUBIGFP und pUBINOS-P1 transformierten Weizenembryo mit einer Länge von 2 mm. (A) Ein Tag nach Beschuss. (B) Derselbe Embryo wie in (A) fünf Tage nach Beschuss.

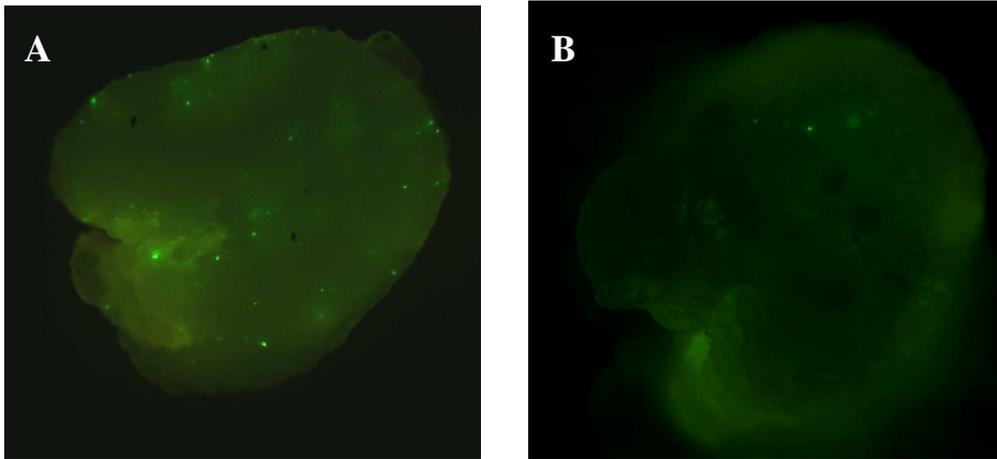


Abbildung 31: Transiente Expression von *gfp* und *hc-pro* in einem mit pUBIGFP und pUBINOS-HC-Pro transformierten Weizenembryo mit einer Länge von 2 mm. (A) Ein Tag nach Beschuss. (B) Derselbe Embryo wie in (A) fünf Tage nach Beschuss.

P1 alleine verstärkte die *gfp*-Expression in einem vergleichbaren Maß wie P1/HC-Pro (Polyprotein) sowie P1 und HC-Pro (kotransformiert, aber getrennt exprimiert). Hingegen unterscheidet sich die relative *gfp*-exprimierende Fläche an Tag fünf der Kotransformation von *gfp* und *hc-pro* nicht signifikant von der Kontrolle (siehe auch Tabelle 4 und Tabelle 5). Eine Verstärkung der *gfp*-Expression konnte daher in Gegenwart von P1/HC-Pro sowie P1 alleine beobachtet werden, überraschenderweise jedoch nicht bei Expression von *hc-pro* alleine. Klar zu erkennen ist, dass HC-Pro die durch P1 bewirkte Verstärkung der *gfp*-Expression nicht beeinflusst.

Ein Northern Blot zum Nachweis einer verringerten Bildung von *gfp*-siRNA in Gegenwart der Suppressoren wurde ebenfalls durchgeführt, jedoch war die Menge der siRNA unterhalb der Nachweisgrenze, vermutlich wegen der im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen geringen Anzahl der durch Beschuss transformierten Zellen des Weizenembryos und dem daraus resultierenden geringen Anteil an *gfp*-mRNA bzw. *gfp*-siRNA an der gesamten RNA.

3.1.2 Konstitutive Expression von mutiertem *p1/hc-pro* bzw. *p1*

Expression von gfp und mutiertem p1/hc-pro

Es sollte untersucht werden, ob ein mutiertes P1 bei Bildung des P1/HC-Pro-Polyproteins noch eine verstärkte *gfp*-Expression verursachen könnte. Mallory hatte gefunden, dass

transgene Tabakpflanzen, in denen *p1/hc-pro* durch eine Insertion von 9 Nukleotiden in dem konservierten FIVRG-Motiv von P1 aus TEV mutiert war, keine Entwicklungsstörungen mehr zeigten, P1/HC-Pro ihre Suppressoraktivität jedoch behalten hatten (Mallory *et al.*, 2002). Falls die transiente *gfp*-Expression in Gegenwart der mutierten Suppressoren verstärkt wäre, wäre dies ein Hinweis, dass die eingeführte Mutation ähnlich wie von Mallory beschrieben auch in transgenem Weizen wirken könnte. In entsprechenden Versuchen wurden Embryonen kotransformiert mit pUBIGFP und pPH-mut (siehe Abbildung 32). Jedoch unterscheidet sich die relative *gfp*-exprimierende Fläche an Tag fünf der Kotransformation von *gfp* und mutiertem *p1/hc-pro* nicht signifikant von der Kontrolle (siehe Tabelle 4 und Tabelle 5).

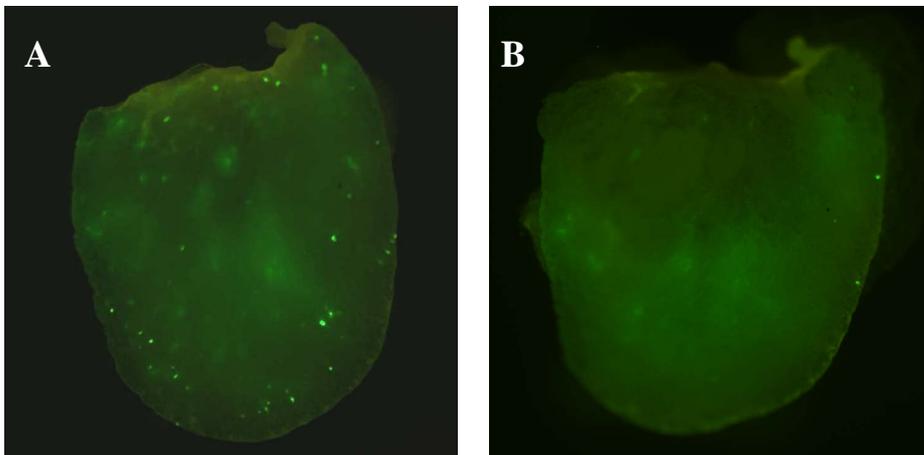


Abbildung 32: Transiente Expression von *gfp* und mutiertem *p1/hc-pro* in einem mit pUBIGFP und pPH-mut transformierten Weizenembryo mit einer Länge von 2 mm. (A) Ein Tag nach Beschuss. (B) Derselbe Embryo wie in (A) fünf Tage nach Beschuss.

Expression von *gfp* und mutiertem *p1*

Da in den vorhergehenden Versuchen gezeigt wurde, dass P1 alleine zu einer Verstärkung der *gfp*-Expression führt, sollte untersucht werden, ob auch ein mutiertes P1 alleine eine solche verstärkte *gfp*-Expression verursachen könnte. Embryonen wurden daher kotransformiert mit pUBIGFP und pUBINOS-P1-mut (siehe Abbildung 33). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden (siehe Tabelle 4 und Tabelle 5).

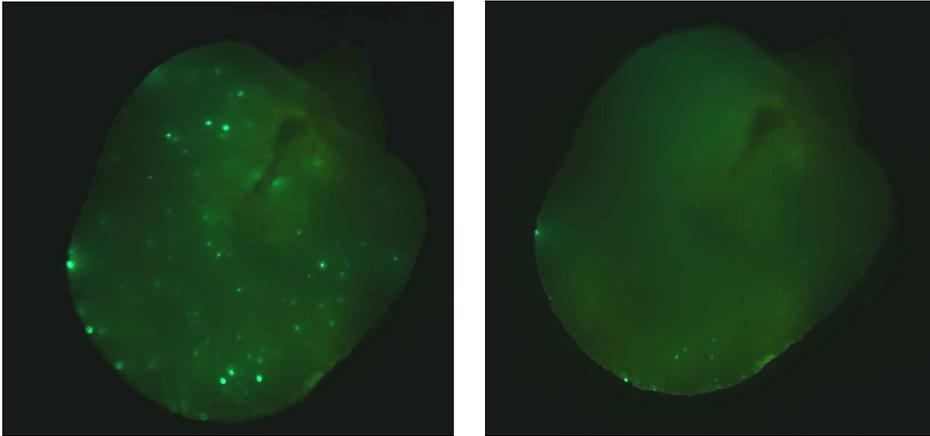


Abbildung 33: Transiente Expression von *gfp* und mutiertem *p1* in einem mit pUBIGFP und pUBINOS-P1-mut transformierten Weizenembryo mit einer Länge von 2 mm. (A) Ein Tag nach Beschuss. (B) Derselbe Embryo wie in (A) fünf Tage nach Beschuss.

3.1.3 P1/HC-Pro bzw. P1 verstärken die Expression von *gfp*

Klar erkennbar ist, dass P1/HC-Pro (Polyprotein), P1 und HC-Pro (kotransformiert, aber getrennt exprimiert) und P1 (alleine) gleichermaßen eine sehr signifikante, verstärkte *gfp*-Expression bewirken. Die *gfp*-Expression in Gegenwart von HC-Pro unterscheidet sich hingegen nicht signifikant von der Kontrolle. Auch bei Expression des mutierten *p1* bzw. mutierten *p1/hc-pro* konnte eine verstärkte *gfp*-Expression nicht beobachtet werden.

3.2 Lokalisierungsstudien

3.2.1 Cytoplasmatische Lokalisierung eines P1:GFP-Fusionsproteins

Cytoplasmatische Lokalisierung des P1:GFP-Fusionsproteins in Blattepidermiszellen

Mittels transienter Expression von *p1:gfp* nach Beschuss verschiedener Gewebe aus Weizen sollte untersucht werden, ob über die subzelluläre Lokalisation des P1:GFP-Fusionsproteins eine Aussage über die mögliche Funktionalität von P1 getroffen werden könnte, die einen Rückschluss auf die vermutete Rolle von P1 als Suppressor ermöglichen könnte. Die Unterseite junger Weizenblätter (var. „Bobwhite SH 98 26“), die Testa unreifer Weizenkörner und unreife Weizenembryonen (var. „Combi“) wurden wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben durch Partikelbeschuss mit dem Vektor pK7FWG2-P1 (siehe

Abschnitt 2.3.10.1, Abbildung 19) transformiert.

Eine transformierte Zelle eines Weizenprimärblatts zeigte eine typische cytoplasmatische Lokalisierung des P1:GFP-Fusionsproteins (Abbildung 34). In diesem Stadium der Zellentwicklung wird die Zelle zum größten Teil von einer oder mehreren Vakuolen ausgefüllt, so dass sich das Cytoplasma auf einen schmalen Bereich an der Zellwand sowie um den Zellkern anordnet.

Cytoplasmatische Lokalisation des P1:GFP-Fusionsproteins in Zellen der Testa unreifer Weizenkörner

Junge Weizenkörner besitzen eine Schutzschicht aus nicht-chlorophyllhaltigen Zellen, die sogenannte Testa (Samenschale aus den Integumenten), die sich leicht abpräparieren lässt. Sie eignet sich insbesondere zur Untersuchung transienter *gfp*-Expression, da aufgrund des fehlenden Chlorophylls die Fluoreszenz von GFP besonders deutlich zu sehen ist. Auch hier war eine deutliche cytoplasmatische Lokalisierung des P1:GFP-Fusionsproteins zu beobachten (Abbildung 35).

Abbildung 36 zeigt eine vergleichbare cytoplasmatische Lokalisierung von GFP in einem Kontrollexperiment nach Partikelbeschuss mit pUBIGFP (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 4).

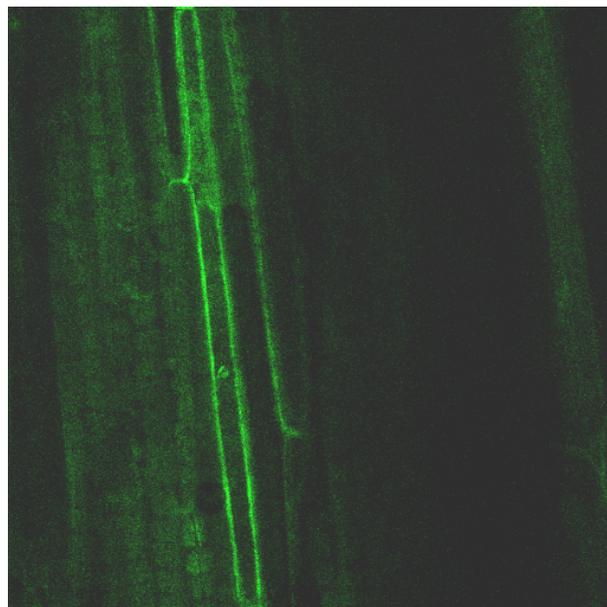


Abbildung 34: Cytoplasmatische Lokalisation des P1:GFP-Fusionsproteins in einer Blattepidermiszelle. Konfokale mikroskopische Aufnahme (Kantenlänge 650 μm) einer gesamten Zelle auf der Ebene des Zellkerns 11h nach Beschuss des Blattes mit pK7FWG2-P1.

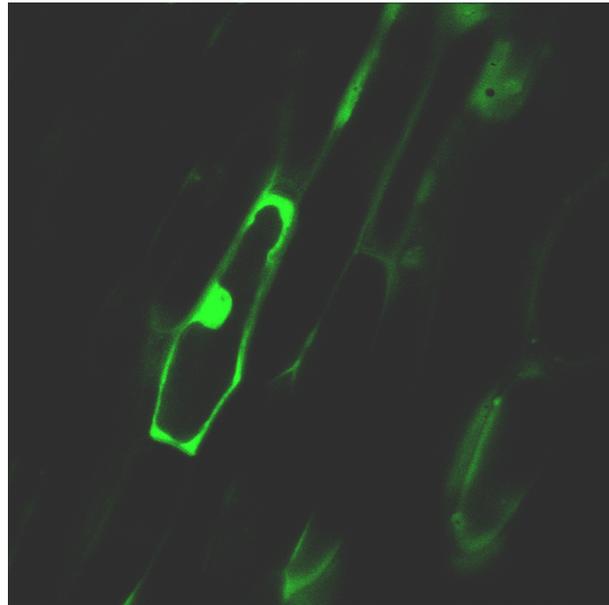


Abbildung 35: Cytoplasmatische Lokalisation des P1:GFP-Fusionsproteins in einer Zelle der Testa unreifer Weizenkörner. Konfokale mikroskopische Aufnahme (Kantenlänge 250 μm) einer gesamten Zelle auf der Ebene des Zellkerns 12 h nach Beschuss des Weizenkorns mit pK7FWG2-P1 aufgenommen. Deutlich zu erkennen ist in der Mitte der Zelle der große cytoplasmatische Bereich um den Zellkern.

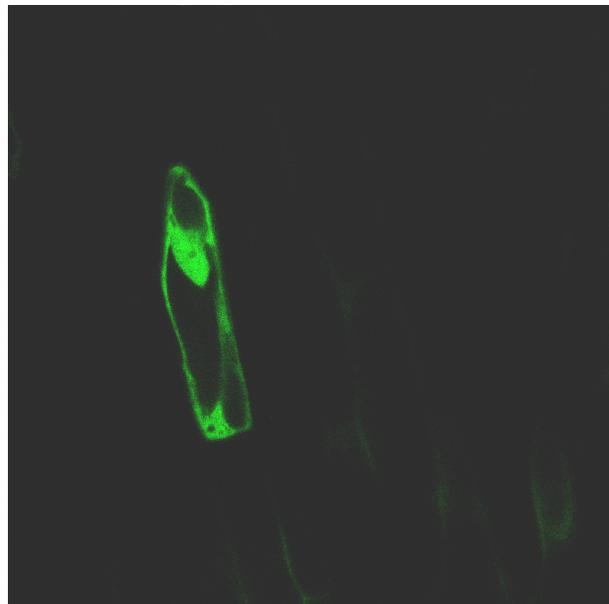


Abbildung 36: Cytoplasmatische Lokalisation von GFP (Kontrolle) in einer Zelle der Testa unreifer Weizenkörner. Konfokale Aufnahme (Kantenlänge 250 μm) einer *gfp*-exprimierenden Zelle der Testa eines unreifen Weizenkorns 13 h nach Beschuss des Weizenkorns mit pUBIGFP. Deutlich zu sehen ist die Konzentration des Cytoplasmas um den Zellkern sowie einige die Vakuole durchspannende Cytoplasmabrücken.

Eine analog durchgeführte Transformation unreifer Embryonen mit pK7FWG2-P1 zeigte ebenfalls eine deutliche cytoplasmatische Lokalisierung vergleichbar denen der cytoplasmatischen Lokalisierung des HC-Pro:GFP-Proteins (Abbildung 37).

3.2.2 Cytoplasmatische Lokalisierung eines HC-Pro:GFP-Fusionsproteins

Cytoplasmatische Lokalisation des HC-Pro:GFP-Fusionsproteins in unreifen Embryonen

Zur subzellulären Lokalisierung eines HC-Pro:GFP-Fusionsproteins sollten wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben Blattepidermiszellen, die Testa junger Weizenkörner sowie unreife Embryonen durch Partikelbeschuss mit pK7FWG2-HC-Pro (siehe Abschnitt 2.3.10.2, Abbildung 20) transformiert werden. Im Vergleich zu der in Abschnitt 3.2.1 dargestellten cytoplasmatischen Lokalisierung des P1:GFP-Fusionsproteins war sowohl die Zahl der Zellen, die *hc-pro:gfp* exprimierten, geringer als auch die Stärke der Expression selbst. Nur in unreifen Embryonen konnten *hc-pro:gfp*-exprimierende Zellen entdeckt werden, anhand derer sich eine cytoplasmatische Lokalisierung des HC-Pro:GFP-Fusionsproteins ergab.

Abbildung 37 zeigt die cytoplasmatische Lokalisierung des HC-Pro:GFP-Fusionsproteins in einer dieser transformierten Zellen.

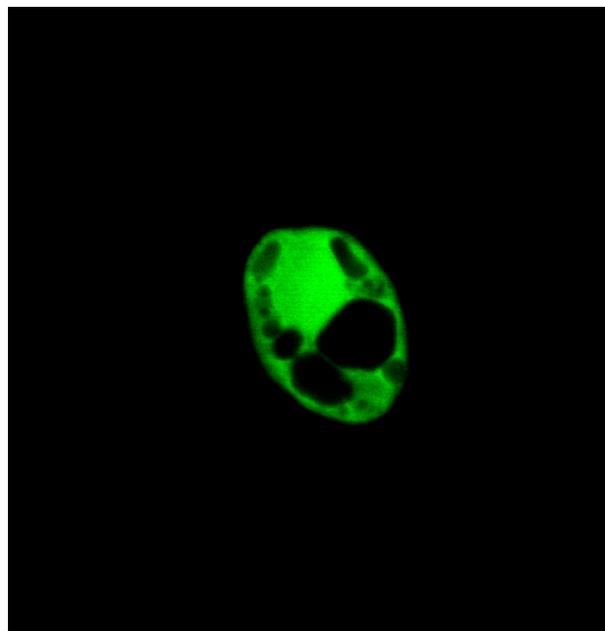


Abbildung 37: Cytoplasmatische Lokalisation eines HC-Pro:GFP-Fusionsproteins in Zellen unreifer Embryonen. Konfokale Aufnahme (Kantenlänge 79 μm) einer Zelle 12 h nach Beschuss des Embryos mit dem Plasmid pK7FWG2-HC-Pro. Eine Konzentration des Cytoplasmas um den Zellkern sowie einige die Vakuole durchspannende Cytoplasmabrücken sind klar zu erkennen.

Da die Zellen im Vergleich zu Blattepidermiszellen oder Zellen der Testa in einem jüngeren Entwicklungsstadium sind, ist der Anteil des Cytoplasmas am Zellvolumen größer, bzw. der vakuoläre Anteil geringer. In einem Kontrollexperiment zur Demonstration einer cytoplasmatischen Lokalisation von GFP wurden unreife Embryonen mit pUBIGFP (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 4) transformiert.

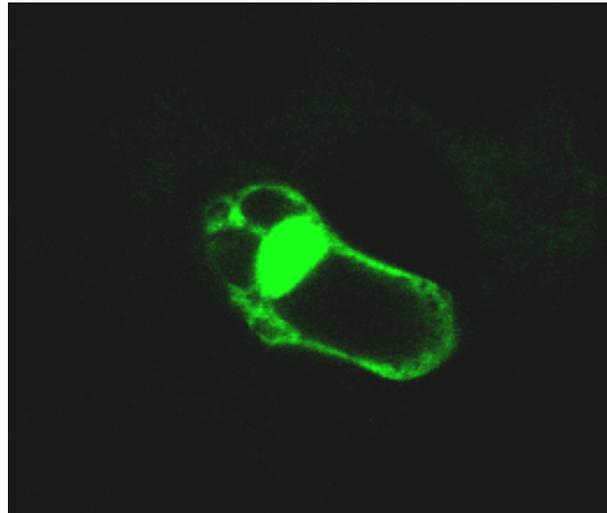


Abbildung 38: Cytoplasmatische Lokalisation von GFP (Kontrolle) in einer Zelle eines unreifen Weizenembryos. Konfokale Aufnahme (Kantenlänge 125 μm) einer Zelle eines Weizenembryos 12 h nach Beschuss des Embryos mit pUBIGFP. Aufgrund des jungen Entwicklungsstadiums der Zelle ist der Anteil des Cytoplasmas höher und der Anteil der Vakuole entsprechend geringer.

3.3 Stabile Transformation

3.3.1 Konstitutive und induzierbare Expression viraler Suppressoren

Transformation der Kultivare ‚Combi‘ und ‚Brujo‘

Die Weizenvarietät ‚Combi‘ wurde zunächst für Transformationsversuche ausgewählt, weil sie die Weizenvarietät mit der höchsten Transformationseffizienz in Deutschland ist. Es wurde vermutet, dass eine Etablierung der an der Universität Hohenheim verwendeten Transformationsmethode unter Verwendung der Varietät ‚Combi‘ auch in Bayreuth gelingt. Im Jahre 2002 wurden 965 Embryonen nach der von Huber (Universität Hohenheim) entwickelten Methode (Huber *et al.*, 2002) mit dem Konstrukt pGFPBAR (siehe Abschnitt 2.4.3, Abbildung 23) zur konstitutiven Expression der Reportergene *gfp* und *bar* beschossen. Daraus konnte jedoch nur eine transgene, *gfp*-exprimierende Pflanze

(Kontrolle) regeneriert werden. Dies entsprach einer Transformationseffizienz von weniger als 0,1 %, d.h. einer um den Faktor 10 bis 50 geringeren Transformationseffizienz verglichen mit Werten, wie sie üblicherweise unter Verwendung der Weizenvarietät ‚Combi‘ erreicht werden. Auffallend war eine schlechte Qualität des sich aus dem Scutellum entwickelnden embryogenen Kallus; ein Grund für diese schlechte Qualität konnte jedoch nicht gefunden werden. Ebenfalls im Jahr 2002 wurden 2372 Embryonen kobombardiert mit pGFPBAR und pPH, einem Vektor zur konstitutiven Expression von *pI/hc-pro*. Daraus konnte keine transgene Pflanze regeneriert werden.

Im Jahre 2003 wurden 621 Embryonen der Weizenvarietät ‚Combi‘ sowie 501 Embryonen der argentinischen Weizenvarietät ‚Brujo‘ mit pGFPBAR und pPH kobombardiert. Um die Qualität des embryogenen Kallus zu verbessern, wurde eine von Daniel Eduardo Souza-Canada am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth, zur Transformation der Varietät ‚Brujo‘ erfolgreich eingeführte Methode verwendet, die hauptsächlich auf einer Veränderung des Nährmediums während der Gewebekultur beruht (Souza-Canada, Doktorarbeit noch nicht veröffentlicht). Es bildet sich ein vergleichsweise höherer Anteil an embryogenem Kallus. Auch unter Verwendung dieser Methode konnte jedoch keine transgene Pflanze gewonnen werden. Dies ist erstaunlich, denn selbst unter der Annahme einer geringen Transformationseffizienz von 0,1 % hätte man die Gewinnung von 3-4 transgenen Pflanzen erwarten können.

Transformation des Kultivars ‚Bobwhite SH 98 26‘

Vor Durchführung weiterer Versuche zur stabilen Transformation mit viralen Suppressoren sollte in Bayreuth eine Transformationsmethode etabliert werden, mit der zuverlässig hohe Transformationseffizienzen erzielt werden könnten. Die weltweit beste Transformationsmethode mit Effizienzen von 70 % unter Verwendung der Varietät ‚Bobwhite SH 98 26‘ wurde am International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) in der Arbeitsgruppe von Dr. Alessandro Pellegrineschi entwickelt (Pellegrineschi *et al.*, 2002). Eine Etablierung dieser Methode in Bayreuth in den Jahren 2003 und 2004 scheiterte, da sich nach Beschuss von Embryonen mit pGFPBAR zur konstitutiven Expression des Resistenzgens *bar* sowie *gfp* kein transgener embryogener Kallus entwickelte und daher auch keine transgenen Pflanzen gewonnen wurden.

Da inzwischen bekannt war, dass die konstitutive Expression von *p1/hc-pro* aus TEV und TuMV eine schädliche Wirkung auf die pflanzliche Entwicklung hatten (Mallory *et al.*, 2002; Kasschau *et al.*, 2003), konnte man zu diesem Zeitpunkt vermuten, dass dies auch für P1/HC-Pro aus WSMV zutreffen könnte. Da die Regeneration transgener Weizenpflanzen im Vergleich zu Tabak und *Arabidopsis* überaus schwierig ist, könnte eine schädliche Wirkung die ohnehin geringe Transformationseffizienz weiter senken und damit die Regeneration transgener Pflanzen verhindern.

Umso wichtiger war die Nutzung eines etablierten, zuverlässigen Systems zur Weizentransformation, wie es am CIMMYT gegeben schien. Daher wurden während eines durch den DAAD geförderten Forschungsaufenthalts am CIMMYT von Oktober 2004 bis Februar 2005 Transformationsexperimente mit verschiedenen durch transiente Expression überprüften Konstrukten zur konstitutiven Expression von viralen Suppressoren sowie zur induzierbaren Expression von viralen Suppressoren durchgeführt. Besonderer Schwerpunkt lag auf der Transformation mit konstitutiv exprimiertem *p1/hc-pro* (siehe Abschnitt 2.3.8.1 und Abbildung 11 zu verwendetem Vektor pPH) und induzierbarem *p1* (siehe Abschnitt 2.3.11.2 und Abbildung 22 zu verwendetem Vektor pMDC7-P1). Mit *p1/hc-pro* sollte überprüft werden, ob die Transformationseffizienz bei konstitutiver Expression von *p1/hc-pro* tatsächlich geringer ist. Mit induzierbarem *p1* sollte versucht werden, im Falle einer schädlichen Wirkung von P1/HC-Pro bzw. P1 alleine diese durch Induktion der Expression zeitlich und hinsichtlich der Höhe der Expression zu kontrollieren.

Üblicherweise werden Kotransformationen am CIMMYT anstelle von pGFPBAR mit dem Konstrukt pAHC25 (siehe Abschnitt 2.4.3, Abbildung 24) zur konstitutiven Expression der Reportergene *gus* und *bar* durchgeführt. Die Selektion transgener Pflanzen erfolgt dann alleine durch Resistenz gegen die Herbizide Basta® bzw. Phosphinotricin. Während die *in vivo* Selektion durch *gfp*-Expression transgener Pflanzen damit ausgeschlossen ist, kann ein Effekt der viralen Suppressoren auf die Höhe der Genexpression des Reportergens *gus* durch kolorimetrische Messung der GUS-Aktivität (siehe Abschnitt 2.5.4.1) einfach quantifiziert werden. Neben der Anzahl der beschossenen Embryonen zur Ermittlung der Transformationseffizienz wurde der Anteil embryogener Kalli ermittelt, um zu überprüfen, ob in Versuchen zur konstitutiven Expression von viralen Suppressoren deren Anteil geringer ist. Falls in Versuchen zur konstitutiven Expression von viralen Suppressoren signifikant weniger embryogener Kallus entstände und dies mit einer geringeren

Transformationseffizienz korrelierte, könnte auf einen negativen Effekt der viralen Suppressoren auf die Entstehung embryogenen Kallus geschlossen werden. Ein geringer Anteil von embryogenem Kallus hätte wiederum eine geringere Transformationseffizienz zur Folge.

Zusammenfassung: stabile Transformation der Weizenvarietät Bobwhite ,SH 98 26'

Die Anzahl der am CIMMYT beschossenen Embryonen, der prozentuale Anteil embryogener Kalli, die produzierten transgenen Pflanzen und die daraus resultierende Transformationseffizienz sind in Tabelle 6 bis Tabelle 8 für die verschiedenen Konstrukte zusammengefasst.

Tabelle 6: Anzahl der am CIMMYT beschossenen Embryonen, prozentualer Anteil embryogener Kalli, produzierte transgene Pflanzen und die daraus resultierende Transformationseffizienz in Transformationsexperimenten mit dem Vektor pAHC25, sowie in Kotransformationsexperimenten mit den Vektoren pAHC25 und pPH bzw. pAHC25 und pMDC7-P1.

Vektor	pAHC25	pAHC25 + pPH	pAHC25 + pMDC7-P1
Anzahl an Embryonen	1140	1207	878
Transgene Pflanzen	1	1	11
Anteil embryogener Kalli	44,0 ± 24,8	49,6 ± 29,7	54,8 ± 21,6
Transformationseffizienz	0,1 %	0,1 %	1,3 %

Tabelle 7: Anzahl der am CIMMYT beschossenen Embryonen, prozentualer Anteil embryogener Kalli, produzierte transgene Pflanzen und die daraus resultierende Transformationseffizienz in Kotransformationsexperimenten mit den Vektoren pAHC25 und pUBINOS-P1, pAHC25 und pUBINOS-HC-Pro bzw. pAHC25 und pPH-mut.

Vektor	pAHC25 + pUBINOS-P1	pAHC25 + pUBINOS-HC- Pro	pAHC25 + pPH-mut
Anzahl an Embryonen	656	1226	442
Transgene Pflanzen	0	0	0
Anteil embryogener Kalli	45,9 ± 27,0	31,5 ± 32,3	54,5 ± 28,0
Transformationseffizienz	0 %	0 %	0 %

Tabelle 8: Anzahl der am CIMMYT beschossenen Embryonen, prozentualer Anteil embryogener Kalli, produzierte transgene Pflanzen und die daraus resultierende Transformationseffizienz in Kotransformationsexperimenten mit den Vektoren pAHC25 und Konstrukten zur estradiol-induzierbaren Expression von *hc-pro* und *gus*.

Vektor	Konstrukte zur Estradiol-induzierbaren Expression u.a. von <i>hc-pro</i> und <i>gus</i> .
Anzahl an Embryonen	1400
Transgene Pflanzen	0
Anteil embryogener Kalli	52,7 ± 25,0
Transformationseffizienz	0 %

Es wurden insgesamt 207 Beschüsse durchgeführt, nur von 9 Beschüssen konnten jedoch transgene Pflanzen gewonnen werden. Die Transformationseffizienz war auch in diesen 9 Beschüssen mit einer Bandbreite von 0,9 % bis 5,9 % pro Beschuss weit von einer Marke von 70 % entfernt. Die durchschnittliche Transformationseffizienz aller Beschüsse mit pAHC25 alleine (Kontrolle) zur konstitutiven Expression des Resistenzgens *bar* und *gus* lag bei 0,1 %. Auch die Transformationseffizienz der Cobombardements mit pAHC25 und pPH zur konstitutiven Expression von *p1/hc-pro* lag bei 0,1 %. Alleine die Transformationseffizienz der Cobombardements mit pAHC25 und pMDC7-P1 zur induzierbaren Expression von *p1* war mit 1,3 % etwas höher. Erstaunlicherweise wurden alle Pflanzen, die das Konstrukt zur induzierbaren Expression von *p1* enthielten, aus nur 7 Beschüssen, die innerhalb eines Zeitfensters von 2 Wochen durchgeführt wurden, gewonnen, nicht jedoch aus weiteren 13 Beschüssen.

Experimente, aus denen erfolgreich transgene Pflanzen gewonnen werden konnten, unterschieden sich hinsichtlich des Prozentsatzes an embryogenem Kallus nicht signifikant von nicht-erfolgreichen Experimenten. Auch die Unterschiede zwischen den erzielten Transformationseffizienzen aus Transformationen mit pAHC25 alleine sowie Kotransformationen mit pAHC25 und pPH bzw. pMDC7-P1 waren nicht signifikant.

Bezüglich des Prozentsatzes an embryogenem Kallus unterscheiden sich die Experimente nicht signifikant mit Ausnahme der Transformationsexperimente mit dem Vektor pUBINOS-HC-Pro. Diese unterscheiden sich signifikant sowohl im Vergleich zu Versuchen mit den anderen konstitutiv exprimierten Suppressoren ($p = 0,008$) als auch im Vergleich zu den Versuchen mit Estradiol-induzierbaren Konstrukten ($p < 0,001$), nicht jedoch im Vergleich zu Versuchen mit pAHC25.

Eine Linie zur konstitutiven Expression von *p1/hc-pro* sowie elf Linien zur induzierbaren Expression von *p1* wurden erzielt

Die aus Transformationsversuchen regenerierten Pflanzen wurden in Mexiko im Gewächshaus kultiviert und teilweise bereits in der T0-Generation mittels PCR auf das Resistenzgen *bar* überprüft. Die reifen Samen wurden geerntet und nach Bayreuth verschickt. 1420 Samen der T1-Generation von 108 vermuteten transgenen Linien wurden ausgesät und im Gewächshaus kultiviert. 12 bereits in Mexiko überprüfte Linien mit positivem PCR-Signal bezüglich des Reportergens *bar* wurden mittels PCR auf Anwesenheit des Genabschnitts von *p1/hc-pro* bzw. bei Linien zur induzierbaren Expression von *p1* auf *p1* oder einer Teilsequenz des LexA-Promotors (siehe Abschnitt 2.5.3) überprüft. Auf diese Weise wurde eine Linie (Linie 21595) zur konstitutiven Expression von *p1/hc-pro* detektiert, sowie zehn Linien zur induzierbaren Expression von *p1* (Linien 21602, 21604, 21656, 22070, 22082, 22087, 22138, 22191, 22198, 22271). Als Negativkontrolle wurde immer auch nichttransformierter Wildtyp-Weizen (*Triticum aestivum* L. var. ‚Bobwhite SH9826‘) verwendet. Abbildung 39 und Abbildung 40 zeigen beispielhaft das Ergebnis eines solchen PCR-Screenings transgener Linien anhand der Auftrennung der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

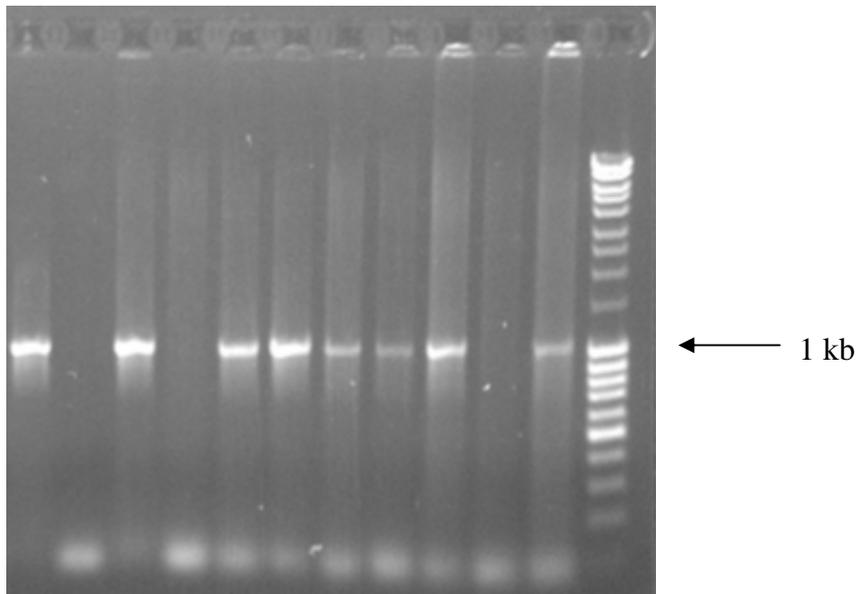


Abbildung 39: PCR-Screening mutmaßlich transgener *p1*-induzierbarer Linien bezüglich *p1* (Länge des Produkts ca. 1 kb). Von links nach rechts: Positivkontrolle Plasmid pMDC7-P1 (1), Negativkontrolle ohne Plasmid (2), Positivkontrolle transgene Linie (3), Negativkontrolle wildtyp-Weizen (4), mutmaßlich transgene Linien (5-11), Standard (12).

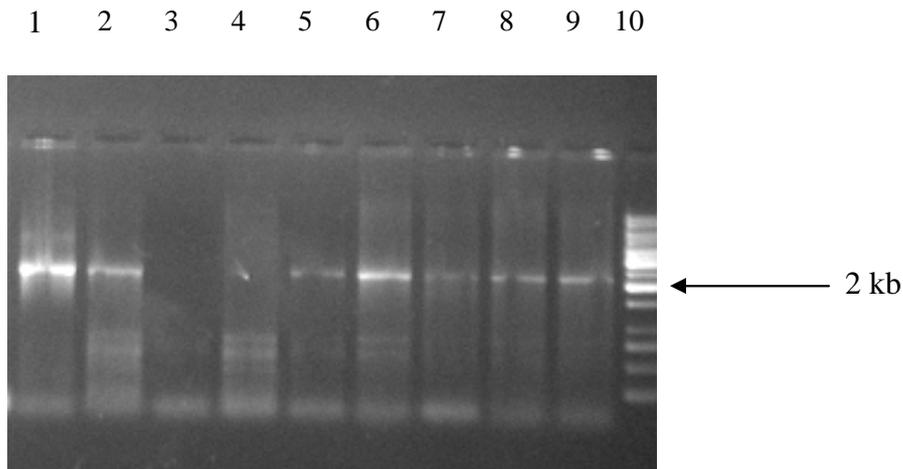


Abbildung 40: PCR-Screening mutmaßlich *p1/hc-pro*-transgener Pflanzen der 21595-Linie bezüglich *p1/hc-pro* (Länge des Produkts ca. 2,2 kb). Von links nach rechts: Positivkontrolle Plasmid pPH (1), Positivkontrolle *p1/hc-pro*-transgene Pflanze (2), Negativkontrolle ohne Plasmid (3), Negativkontrolle wildtyp-Weizen (4), mutmaßlich transgene Pflanzen (5-9), Standard (10).

Die Expression der Reportergene *gus* und *bar* wurde in den PCR-positiven Pflanzen sowie den übrigen vermuteten transgenen Linien mittels histochemischer GUS-Färbung von Pollen oder Blättern (Abbildung 41) oder durch Besprühen mit einer 0,3 %-igen Basta®-Lösung (BayerCropScience, Monheim) auf Resistenz gegen Phosphinotricin überprüft (siehe Tabelle 10).

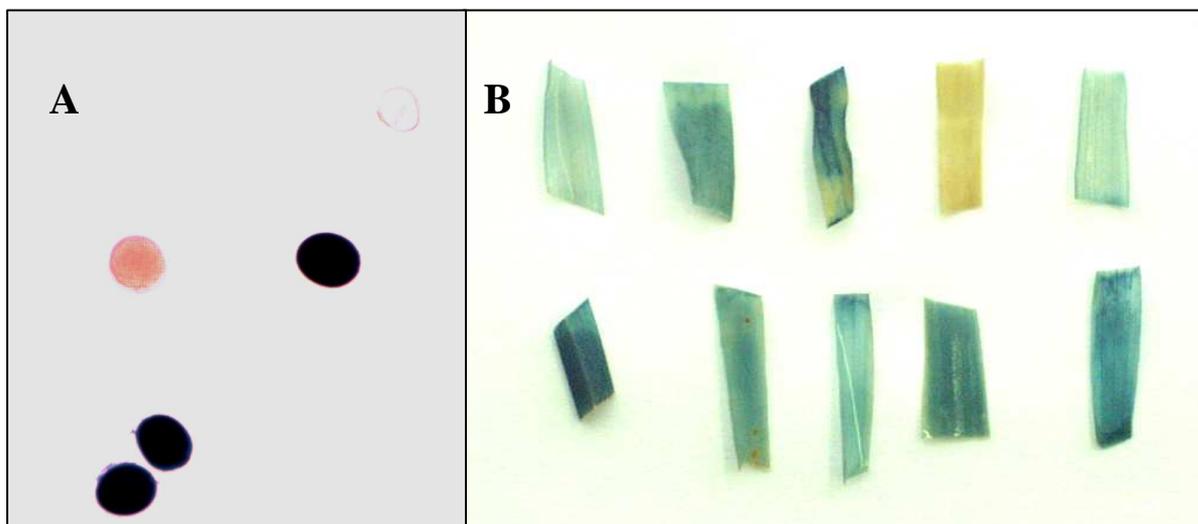


Abbildung 41: Histochemische GUS-Färbung in Pollen (A) und Blättern (B) *gus*-exprimierender transgener Weizenlinien. (B): Reihenfolge obere Reihe von links nach rechts: Linien 21585, 21602, 21604, 21656, 22070; Reihenfolge untere Reihe von links nach rechts: Linien 22082, 22087, 22138, 22191, 22271. Linie 21585 (links oben) ist aus Transformationsexperimenten mit *gus* allein ohne Kotransformation mit *p1* oder *p1/hc-pro* hervorgegangen, die anderen Linien aus Kotransformationen mit *gus* und induzierbarem *p1*. Während Linie 21656 (obere Reihe, vorletztes Blatt) offensichtlich keine GUS-Aktivität in den Blättern aufweist, zeigen andere Linien histochemisch nachweisbare GUS-Aktivität.

Auf diese Weise wurde eine weitere transgene Linie (Linie 22088) zur induzierbaren Expression von *pI* gefunden, wobei die Linie ebenfalls mittels PCR auf Anwesenheit der Gensequenz von *pI* überprüft wurde. Auch die Linie 21585, die aus Transformationsversuchen nur mit dem Vektor pAHC25 (Kontrolle) hervorgegangen war, exprimierte *gus* und *bar*.

3.3.2 Auswahl transgener Linien für weitere Untersuchungen

Konstitutive Expression von *pI/hc-pro*

Linie 21595 exprimiert weder gus noch bar und vermutlich auch nicht pI/hc-pro

Im Falle der Linie 21595 konnten zwar positive PCR-Signale bezüglich *pI/hc-pro* nachgewiesen werden, jedoch keine GUS-Aktivität (kolorimetrischer Nachweis) und keine Resistenz gegen Phosphinotricin (siehe Abbildung 40, Tabelle 9). In vielen Fällen korreliert das *silencing* der Reportergene mit dem *silencing* des eingebrachten Zielgens, in diesem Fall also mit *pI/hc-pro*. Zudem zeigten die transgenen Pflanzen keinen von nichttransformierten Kontrollpflanzen verschiedenen Phänotyp, so dass wir davon ausgingen, dass *pI/hc-pro* in dieser Linie selbst dem *silencing* unterworfen ist und, wenn überhaupt, nur sehr schwach exprimiert wird. Die Analyse dieser transgenen Linie wurde daher zurückgestellt.

Tabelle 9. Expression der Reportergene *glucuronidase* (kolorimetrischer Nachweis) und *bar* in der transgenen Weizenlinie 21595.

Linie	PCR (P1/HC-Pro)	GUS-Aktivität [pMol/mg*min]	Resistenz gegen Phosphinotricin
21595	+	0,02 ± 0,05	-

Induzierbare Expression von *pI*

Wie oben erwähnt, wurden 11 transgene Linien mittels PCR auf Anwesenheit von *pI* bzw. LexA-Promotor sowie in Hinsicht auf Expression der Reportergene *gus* (siehe Abschnitt 3.3.3.2, Tabelle 12, linke Spalte „GUS-Aktivität vor Induktion der Expression von *pI*“) und *bar* überprüft. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Linien zur induzierbaren Expression von *pI* konnten demnach in drei Gruppen eingeordnet

werden.

5 Linien exprimieren gus und bar

In der ersten Gruppe (Linien 21602, 21604, 22070, 22138, 22191) waren die PCR-Signale bezüglich *pI* und des LexA-Promotors positiv, sowie eine GUS-Aktivität und Phosphinotricin-Resistenz vorhanden.

2 Linien exprimieren gus, jedoch nicht bar

In der zweiten Gruppe (Linien 22082, 22087) waren die PCR-Signale bezüglich *pI* und des LexA-Promotors ebenfalls positiv und eine GUS-Aktivität vorhanden, jedoch waren die Pflanzen nicht resistent gegen eine Herbizidbehandlung mit Phosphinotricin.

2 Linien exprimieren bar, jedoch nicht gus

Die dritte Gruppe (Linien 22088, 22198) zeigte positive PCR-Signale bezüglich *pI* und des LexA-Promotors und war resistent gegen Phosphinotricin, hatte jedoch keine GUS-Aktivität.

Eine Kosegregation der exprimierten Reportergene, des LexA-Promotors und *pI* wurde in allen Linien bestätigt.

Linien 22271 und 21656 konnten keiner der drei Gruppen zugeordnet werden. 22271 zeigte ein negatives PCR-Signal für *pI*, für den Promotor jedoch ein positives, während Linie 21656 umgekehrt ein positives PCR-Signal für *pI* zeigte und ein negatives für den Promotor.

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen konzentrierten sich demzufolge besonders auf die *pI*-induzierbaren Linien 21602, 21604, 22070, 22138, 22191, 22082, 22087, 22088 und 22198.

Tabelle 10. Expression der Reportergene *glucuronidase* (GUS Aktivität) und *bar* (Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin) und Kosegregation der Reportergene und *p1* in den *p1*-induzierbaren transgenen Weizenlinien.

	PCR (P1)	PCR (Promotor)	Gus Aktivität	Resistenz gegen Phosphinotricin
21602	+	+	+	+
21604	+	+	+	+
22070	+	+	+	+
22138	+	+	+	+
22191	+	+	+	+
22082	+	+	+	-
22087	+	+	+	-
22088	+	+	-	+
22198	+	+	-	+
21656	+	-	-	-
22271	-	+	+	+

3.3.3 Induktion der Expression von *p1*

Transiente, estradiol-induzierbare *gus*-Expression

Um zu überprüfen, ob durch Estradiol in Weizen die Expression von Transgenen induziert werden kann, wurden Weizenembryonen auf 10 μ M Estradiol-haltigem MS Medium (siehe Abschnitt 2.5.5) ausgelegt, mit dem Vektor pMDC7-GUS (siehe Abschnitt 2.3.11.1, Abbildung 21) wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben biolistisch transformiert und die Expression von *gus* durch histochemische Färbung (siehe Abschnitt 2.5.4.2) nachgewiesen. In transformierten Embryonen, die auf estradiol-haltigem MS Medium ausgelegt wurden, wurden GUS-Spots entdeckt, nicht jedoch in Embryonen auf MS Medium ohne Estradiol. In Abbildung 42 wird die Expression von *gus* nach Induktion durch Estradiol gezeigt sowie die gleichzeitige, konstitutive Expression von *gfp* nach Kotransformation mit den Vektoren pMDC7-GUS sowie pGFPBAR (siehe Abschnitt 2.4.3, Abbildung 23).

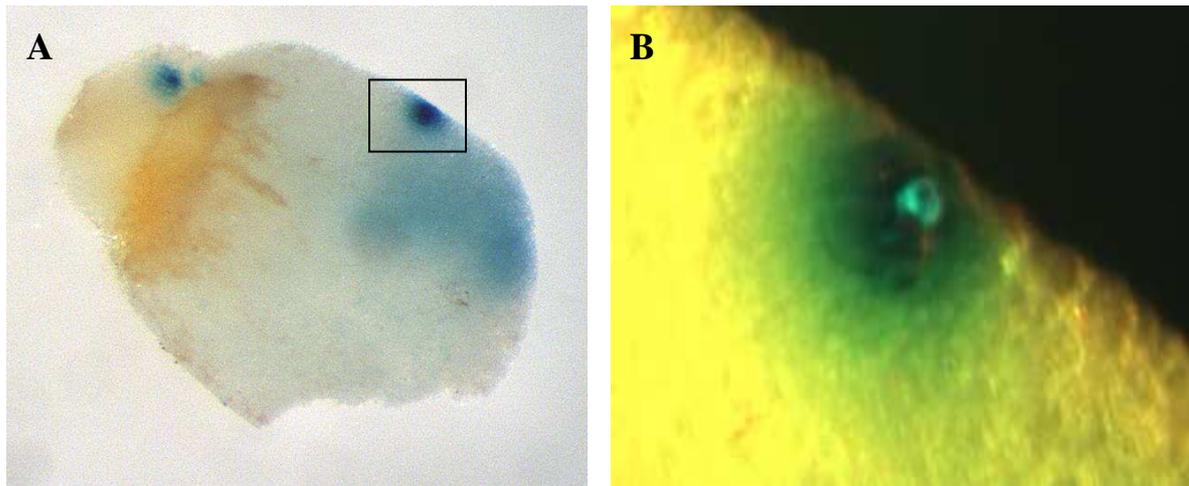


Abbildung 42: (A) *gus*-Expression nach Partikelbeschuss eines Weizenembryos (Länge 1 mm) mit den Vektoren pMDC7-GUS und pGFPBAR bei Estradiol-Induktion. (B) zeigt in einem vergrößerten Ausschnitt des Embryos aus (A) einen GUS-Spot mit einer *gfp*-exprimierenden Zelle. Der Farbstoff diffundiert während des histochemischen Nachweises aus der transformierten Zelle in das umliegende Gewebe. Daher ist der blau gefärbte Gewebebereich größer als die *gfp*-exprimierende Zelle.

3.3.3.1 Retardierte Keimung von *p1*-transgenen Weizenembryonen

Aufgrund der bekannten Entwicklungsstörungen, die durch die konstitutive Expression von *p1/hc-pro* in Tabak und *Arabidopsis* hervorgerufen werden und aufgrund der Schwierigkeiten, *p1/hc-pro* konstitutiv exprimierende, transgene Weizenpflanzen zu erhalten, wurde vermutet, dass eine Expression von *p1/hc-pro* einen ähnlich starken Phänotyp in Weizen, z.B. im Bezug auf Wachstumshemmung oder Entwicklungsstörungen hervorrufen könnte. Da die Suppressorfunktion des Polyproteins P1/HC-Pro aus WSMV aufgrund des Ergebnisses der transienten Expression auf P1 eingegrenzt war, sollte es möglich sein, in transgenen Pflanzen nach Induktion der Expression von *p1* einen abweichenden Phänotyp zu beobachten. Insbesondere vermuteten wir, dass die konstitutive Expression von *p1/hc-pro* in Transformationsversuchen die Regeneration transgener Pflanzen verhindern könnte, so dass vor allem ein hemmender Effekt der Expression von *p1* nach Induktion durch Estradiol auf den analogen Vorgang der Keimung zu erwarten war. Je ca. 15 Embryonen transgener Weizenpflanzen der T2-Generation fünf verschiedener Linien sowie nichttransformierter Pflanzen derselben Varietät wurden aus unreifen Körnern herausgeschnitten und auf Estradiol-haltigem MS-Medium (20 μ M Estradiol) wie in Abschnitt 2.5.6.1 beschrieben unter Beleuchtung kultiviert.

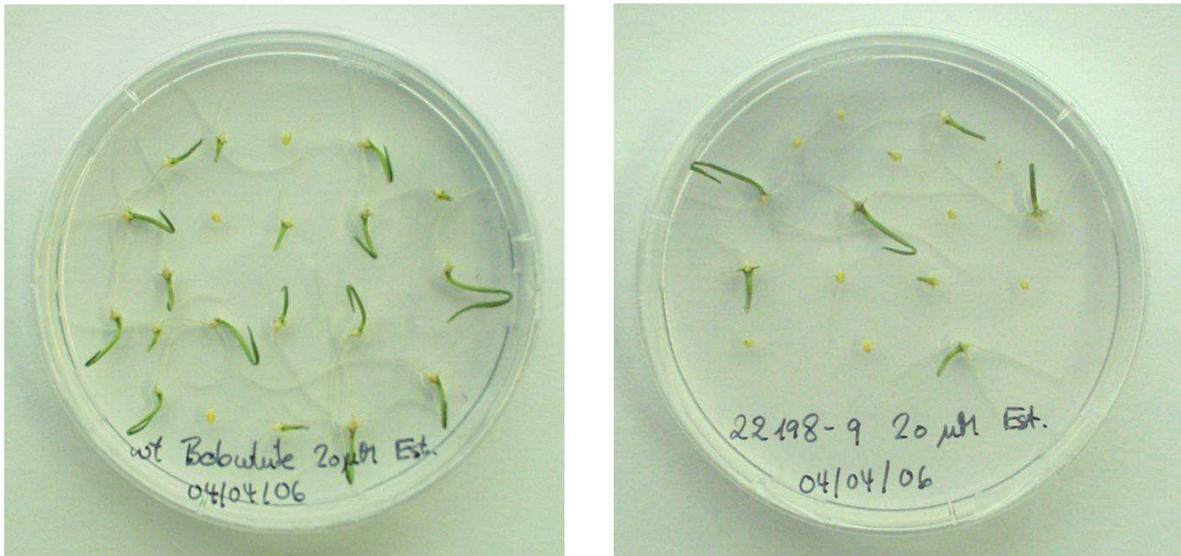


Abbildung 43. Keimung von Embryonen am Tag 6 nach Präparation aus Körnern nichttransformierten Weizens sowie einer *pI*-induzierbaren transgenen Linie (22198) auf Estradiolhaltigem MS Medium (20 μ M Estradiol).

Die Keimungsrate der Embryonen (Anteil der keimenden Embryonen an der Gesamtheit der präparierten Embryonen) je transgene Linie und Kontrolle wurde in Abständen von 24 Stunden bis 7 Tage sowie 10 Tage nach Präparation bestimmt. Die individuellen Keimungsraten der transgenen Linien werden im Anhang (siehe Abschnitt 8, Tabelle 14) aufgeführt. Tabelle 11 zeigt die gemittelte Keimungsrate der transgenen Linien und der Kontrollen mit den entsprechenden Standardabweichungen. Ein verzögerter Beginn der Keimung sowie eine verringerte Keimungsrate der *pI*-induzierbaren Linien im Vergleich zur Kontrolle ist deutlich zu erkennen, wobei der Unterschied an den Tagen 5 und 7 nach Präparation signifikant ($p \leq 0,05$), an Tag 6 sehr signifikant ($p \leq 0,01$) war. Die statistische Auswertung der Keimungstests erfolgte mit dem Programm Sigmastat (siehe Abschnitt 2.7).

Tabelle 11. Keimungsrate *p1*-induzierbarer Linien vs. Kontrolle auf 20 μ M Estradiol-haltigem MS Medium 1 bis 7 Tage sowie 10 Tage nach Präparation der Embryonen (Tag 0).

Tage nach Präparation der Embryonen	Keimungsrate <i>p1</i> -induzierbare Linien [%]	Keimungsrate Kontrolle [%]	Signifikanz
0	0	0	-
1	0	0	-
2	0	0	-
3	0	5,2 \pm 4,6	-
4	18,9 \pm 12,2	50,1 \pm 29,5	P = 0,073
5	32,8 \pm 14,4	72,3 \pm 29,2	P = 0,039
6	36,2 \pm 18,1	93,4 \pm 7,8	P = 0,002
7	55,1 \pm 25,2	96,3 \pm 3,4	P = 0,034
10	84,9 \pm 14,3	98,4 \pm 2,8	P = 0,167

3.3.3.2 Verstärkte Expression des Reportergens *glucuronidase* durch P1

Ein Aspekt der Estradiol-induzierten Expression von *p1* in transgenen Linien trifft eine der Kernfragen der vorliegenden Arbeit. Falls die Suppressorfunktion des Polyproteins P1/HC-Pro aus WSMV tatsächlich auf P1 beschränkt wäre, worauf die Resultate zur transienten Expression in Embryonen hinwiesen (siehe Abschnitt 3.1, Tabelle 4 und Tabelle 5), müsste man nach Induktion der Expression von *p1* einen Effekt von P1 auf die Expression des Reportergens *glucuronidase* beobachten. Analog zu dem von Mallory *et al.* (2002) in Tabak beschriebenen System sollte ein vermuteter Suppressor des RNA *silencing* (P1) die Expression von *gus* erhöhen, wobei dies anhand der erhöhten GUS-Aktivität quantitativ erfasst werden könnte. So würde eine Zunahme der GUS-Aktivität zugleich einen Nachweis der Funktionalität des Estradiol-induzierbaren Systems an sich als auch der Funktionalität von P1 als Suppressor des RNA *silencing* in Weizen erbringen.

Behandlung der Pflanzen mit Estradiol

Um zunächst die Linien mit einer erhöhten GUS-Aktivität nach Behandlung mit Estradiol zu finden, wurde pro transgener Linie je eine 6 Wochen alte Pflanze der T2-Generation für 5 Minuten in eine Estradiol-haltige Lösung getaucht, die mit Detergens (Tween 20) versetzt war. Dadurch sollte eine maximale Benetzung und Aufnahme erzielt werden, so

dass ein Effekt in demjenigen Gewebe zu beobachten wäre, das direkt mit Estradiol in Kontakt gebracht worden war. Um andere Einflüsse weitgehend auszuschließen, wurden die Pflanzen unter einheitlichen Bedingungen in einer Klimabox bei 20°C und einer Lichtperiode von 16:8 Stunden angezogen. Die GUS-Aktivität wurde vor der Behandlung mit Estradiol sowie 24 Stunden nach Estradiol-Behandlung bestimmt. Als Negativkontrolle wurde nicht-transformierter Weizen („Bobwhite SH9826“) verwendet. Als Positivkontrolle zur Bestimmung der Funktionsfähigkeit des Estradiol-induzierbaren Systems dienten von Dr. Mark Curtis (ETH Zürich) zur Verfügung gestellte *gus*-transgene *Arabidopsis*-Pflanzen (siehe Abschnitt 2.5.5), deren *gus*-Expression durch Bestreichen der Blätter mit einer Estradiol-haltigen Lösung induziert wird (Brand *et al.*, 2006). Zuo *et al.* (2000) fand eine maximale Induktion der *gfp*-Expression in *gfp*-transgenen *Arabidopsis* 24 Stunden nach Behandlung der Pflanzen mit einer mindestens 5 µM Estradiollösung. Mangels eines bereits etablierten Estradiol-induzierbaren Systems in monokotyledonen Pflanzen wurden die *p1*-transgenen Weizenpflanzen wie oben beschrieben zunächst mit einer 20 µM Estradiollösung behandelt. Nach Messung der GUS-Aktivität 24 Stunden nach Behandlung wurden dieselben Pflanzen mit einer 100 µM Estradiollösung behandelt und 24 Stunden später wiederum die GUS-Aktivität ermittelt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Der kolorimetrische Nachweis der GUS-Aktivität und Bestimmung der Standardabweichung erfolgte wie in Abschnitt 2.5.4.1 beschrieben.

Messung der GUS-Aktivität

Nach der Behandlung mit einer 20 µM Estradiollösung konnte zunächst in keiner der transgenen Linien zur induzierbaren Expression von *p1* ein signifikanter Effekt auf die GUS-Aktivität nach 24 Stunden beobachtet werden. Nach der Verstärkung der Estradiol-Induktion (100 µM) ergab sich bei denjenigen Linien, die bereits vor der Behandlung mit Estradiol eine relativ hohe GUS-Aktivität hatten, eine drastische Steigerung der GUS-Aktivität um 98 % (Linie 21604) und 89 % (Linie 21602). Interessanterweise gehören diese Linien zu der Gruppe der transgenen Pflanzen, die neben der GUS-Aktivität auch eine Herbizidresistenz aufweisen. Zumindest ein anderes Mitglied dieser Gruppe, Linie 22070, zeigte ebenfalls eine Steigerung der GUS-Aktivität zu diesem Zeitpunkt. Bei Linien 22138, 22191, 22082 und 22087 war eine kaum erhöhte GUS-Aktivität zu beobachten. In den Linien 22088 und 22198, die weder GUS-Aktivität noch Herbizidresistenz zeigen, konnte auch nach Behandlung mit Estradiol keine erhöhte GUS-Aktivität nachgewiesen

werden. Auch bei Linie 22271, die kein positives PCR-Signal für *pI* gezeigt hatte, führte eine Behandlung mit Estradiol zu einer nicht merklich höheren GUS-Aktivität.

Tabelle 12. Kolorimetrischer Nachweis der GUS-Aktivität [pMol/mg*min] in transgenen Linien zur induzierbaren Expression von *pI* aus WSMV. Die GUS-Aktivität wurde vor Behandlung der Pflanzen mit Estradiol sowie je 24 Stunden nach Behandlung mit einer 20 µM bzw. 100 µM Estradiollösung bestimmt. Als Negativkontrolle (wt) diente nicht-transformierter Weizen derselben Varietät, als Positivkontrolle transgene *Arabidopsis thaliana* zur induzierbaren Expression des Reportergens *gus*.

	Gus-Aktivität vor Induktion der Expression von <i>pI</i>	Gus-Aktivität nach Induktion der Expression von <i>pI</i> durch 20 µM Estradiol	Gus-Aktivität nach Induktion der Expression von <i>pI</i> durch 100 µM Estradiol
21602	8,1 ± 0,3	7,3 ± 0,7	15,4 ± 1,1
21604	14,4 ± 1,1	16,9 ± 1,0	28,6 ± 4,4
22070	6,7 ± 0,2	6,4 ± 0,1	9,1 ± 1,0
22138	1,6 ± 0,07	2,2 ± 0,01	2,6 ± 0,2
22191	1,5 ± 0,2	0,90 ± 0,2	2,2 ± 0,3
22082	5,8 ± 0,08	4,5 ± 0,6	6,4 ± 0,06
22087	1,3 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,1
22088	0,05 ± 0,004	0,06 ± 0,02	0,1 ± 0,04
22198	0,02 ± 0,008	0,03 ± 0,06	0,07 ± 0,09
22271	3,7 ± 0,2	3,9 ± 0,2	4,4 ± 0,9
Wt	0,02 ± 0,004	0,03 ± 0,04	0,07 ± 0,05
<i>A. thaliana</i>	0,1 ± 0,07	1,7 ± 0,09	2,1 ± 0,2

Die Messungen zeigten anhand der Kontrolle klar, dass die Aktivität und damit dieser vorausgehend die Expression des Reportergens *gus* in transgenen *Arabidopsis* nach Behandlung mit 20 µM Estradiol bzw. 100 µM Estradiol um den Faktor 17 bzw. 21 deutlich anstieg, womit die Funktionsfähigkeit des Estradiol-induzierbaren Systems an sich erwiesen war. Des Weiteren stieg wie erwartet die GUS-Aktivität in nicht-transformiertem Weizen nach Estradiol-Behandlung nicht an.

Da die Linien 21602 und 21604 die deutlichste Reaktion auf die Induktion mit Estradiol gezeigt hatten, wurden in nachfolgenden Experimenten parallel angezogene

Schwesterpflanzen mit Estradiol behandelt, wobei nun bereits zu Anfang eine 100 μM Estradiollösung verwendet wurde und die zweite Induktion weggelassen wurde. Die entsprechenden Messwerte sind in Tabelle 13 angeführt. Auch hier erfolgte der kolorimetrische Nachweis der GUS-Aktivität und die Bestimmung der Standardabweichung wie in Abschnitt 2.5.4.1 beschrieben.

Tabelle 13. Kolorimetrischer Nachweis der GUS-Aktivität [pMol/mg*min] in den transgenen Linien 21602 und 21604 zur indizierbaren Expression von *pI*. Die GUS-Aktivität wurde vor Behandlung der Schwesterpflanzen mit Estradiol sowie 24 Stunden nach Behandlung mit einer 100 μM Estradiollösung bestimmt.

	GUS Aktivität vor Estradiol- Induktion der Expression von <i>pI</i>	GUS Aktivität nach Estradiol- Induktion der Expression von <i>pI</i>
21602	13,9 \pm 3,0	19,5 \pm 0,2
21602	23,9 \pm 4,3	22,4 \pm 0,8
21602	18,7 \pm 2,0	26,4 \pm 2,9
21604	21,0 \pm 4,1	25,9 \pm 2,2
21604	19,5 \pm 2,1	21,4 \pm 5,1
21604	15,1 \pm 0,7	22,0 \pm 0,9
Mittelwert	18,7 \pm 3,6	23,0 \pm 2,6

Erstaunlich war einerseits zunächst, dass die GUS-Aktivität der Schwesterpflanzen innerhalb einer Linie vor Behandlung mit Estradiol zum Teil erheblich von einander abwich. So war in Linie 21602 die GUS-Aktivität der Pflanze mit der höchsten Aktivität im Vergleich zu der Pflanze mit der geringsten Aktivität (Tabelle 12) um den Faktor 2,9 höher. Etwas geringer war die Variationsbreite in Linie 21604, in der sich die GUS-Aktivität der entsprechenden Pflanzen nur um den Faktor 1,5 unterschied. Weiter bemerkenswert war, dass sich die GUS-Aktivität der Pflanzen beider Linien statistisch nicht signifikant unterschied.

Nach Estradiol-Behandlung zeigte sich ein uneinheitliches Bild: während in jeder Linie je zwei Pflanzen eine 23 % bis 45 % höhere GUS-Aktivität hatten, zeigte je eine Pflanze keine Veränderung. Keine der Pflanzen zeigte jedoch eine so deutliche Erhöhung der GUS-Aktivität wie ihre Schwesterpflanze des ersten Experiments (Tabelle 12). Dennoch

war die um 22 % erhöhte mittlere GUS-Aktivität der transgenen Pflanzen beider Linien statistisch signifikant ($p < 0,05$) (Tabelle 13). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaStat (siehe Abschnitt 2.7).

4 Diskussion

4.1 Konstitutive Expression von *p1* und *p1/hc-pro* (transiente Transformation)

In den meisten Untersuchungen über P1 und HC-Pro in Tabak und *Arabidopsis* wurde das Polyprotein P1/HC-Pro verwendet (Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau und Carrington, 1998; Mallory *et al.*, 2002; Kasschau *et al.*, 2003). Bereits Anandalakshmi hatte in einem transienten System in Tabak entdeckt, dass HC-Pro alleine eine Suppressorfunktion ausüben konnte, die allerdings in Gegenwart von P1 verstärkt wurde (Anandalakshmi *et al.*, 1998). Mallory bestätigte in einem stabil transformiertem Tabak, dass P1 aus TEV nicht als Suppressor wirkte, da in *p1*-transgenem Tabak weder eine gesteigerte Expression des Reportergens noch ein abweichender Phänotyp beobachtet wurde (Mallory *et al.*, 2002). Für die vorliegende Arbeit sind die Veröffentlichungen von Mallory *et al.* (2002) und Anandalakshmi *et al.* (1998) von besonderer Relevanz, da sie die Wirkung von P1/HC-Pro auf die Expression des Reportergens *gus* in stabil transformiertem Tabak zeigen. Andere Gruppen verwendeten transiente Systeme, z.B. *Agrobacterium*-vermittelte Kotransformation oder virale Vektoren zur Expression von *p1/hc-pro* von Potyviren (Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau und Carrington, 1998; Hamilton *et al.*, 2002; Valli *et al.*, 2006). Unterschiedliche Ergebnisse könnten somit in den verwendeten Verfahren begründet sein (Roth *et al.*, 2004; Qu und Morris, 2005). Wenn auch der Wirkungsmechanismus von den unterschiedlichen Verfahren beeinflusst sein mag, so ist doch in allen Untersuchungen bestätigt worden, dass P1/HC-Pro von Potyviren über den siRNA Metabolismus als Suppressoren des RNA *silencing* wirken.

Vor der Untersuchung der Wirkung von P1/HC-Pro aus WSMV in transgenen Weizenpflanzen stand die Herausforderung, ein transientes Expressionssystem zu entwickeln, mit dem die Funktionalität der Vektoren erprobt werden kann. Die bei Tabak verwendeten Systeme der Agrobakterien-Transformation bzw. Infektion eines viralen Vektors standen für Weizen nicht zur Verfügung, da keine geeigneten Agrobakterienstämme bzw. viralen Vektoren bekannt waren. Deshalb wurde Weizengewebe biolistisch mit den Expressionsvektoren transformiert. Zur Kotransformation mit *gfp* musste Gewebe ausgewählt werden, das kein Chlorophyll enthält, da dieses die Fluoreszenz des GFP überdeckt. Das Gewebe musste steril sein und über mehrere Tage am Leben gehalten werden, damit Veränderungen der Expression über

einen längeren Zeitraum beobachtet werden konnten. Diese 3 Kriterien trafen nur für Embryonen zu, die aus sterilisierten unreifen Körnern gewonnen wurden und die auch groß genug waren, um eine Vielzahl von transformierten Zellen pro Embryo ausmachen zu können.

4.1.1 P1/HC-Pro und P1, nicht jedoch HC-Pro wirken als Suppressoren des RNA silencing

In Anwesenheit des Polyproteins P1/HC-Pro zeigte sich eine um den Faktor 2 erhöhte *gfp*-Expression. Ein ähnliches Resultat erhielt man bei Kotransformation mit *p1* und *hc-pro* auf getrennten Vektoren (siehe Abschnitt 3.1, Tabelle 4 und Tabelle 5). Dies deutet an, dass die Expression von *p1/hc-pro* als Polyprotein und die nachfolgende Prozessierung durch autokatalytische Spaltung nicht notwendig für die Funktionalität der Proteine ist. Des Weiteren findet vermutlich eine korrekte Prozessierung des Polyproteins P1/HC-Pro in zwei reife und funktionale Proteine P1 und HC-Pro statt.

Ausgehend von den aus TEV bekannten Ergebnissen hätte man nun vermutet, dass bei Transformation mit *hc-pro* alleine, nicht aber mit *p1* alleine eine verstärkte *gfp*-Expression zu beobachten ist. Überraschenderweise war aber genau das Gegenteil der Fall: P1 alleine führte zu einem Anstieg der *gfp*-Expression um den Faktor zwei. Ein vergleichbarer Anstieg war nur bei Expression von *p1/hc-pro* (Polyprotein) bzw. bei gleichzeitiger Expression von *p1* und *hc-pro* (bei Kotransformation mit zwei Vektoren) zu sehen. HC-Pro alleine, d.h. in Abwesenheit von P1, führte jedoch zu keiner verstärkten *gfp*-Expression (siehe Tabelle 4 und Tabelle 5).

Grundsätzlich ist es natürlich möglich, dass die erzeugte *hc-pro* mRNA abgebaut wurde oder das HC-Pro Protein nicht stabil war und dass aus diesem Grund keine Wirkung bei alleiniger Expression von *hc-pro* zu erkennen war. Eine fehlerhafte Transkription ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da zum einen die Sequenz von *hc-pro* (ebenso wie die aller anderen Suppressoren) durch Sequenzierung überprüft worden war und zum anderen zur Expression von *gfp*, *p1*, *hc-pro* und der anderen Suppressoren derselbe Vektor verwendet wurde bzw. die kodierenden Sequenzen unter Kontrolle des gleichen Promotors standen. Es ist auch allgemein bekannt, dass virale Proteine in ihrer Wirtspflanze generell stabil sind.

Wahrscheinlicher scheint eine Funktionsverschiebung der Suppressorfunktion von HC-Pro bei TEV zu P1 bei WSMV. Die transienten Ergebnisse deuten an, dass HC-Pro aus WSMV keine Funktion als Suppressor hat, da P1 alleine für eine verstärkte *gfp*-Expression ausreicht. Auch scheint HC-Pro die Funktion von P1 nicht zu verstärken. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, welche Funktion HC-Pro hat, da die alleinige Rolle als Proteinase zur korrekten Prozessierung des N-Terminus des nachfolgenden P3 Proteins nicht sehr wahrscheinlich ist.

Die Ergebnisse der konstitutiven Expression von *p1* und *hc-pro* zeigen, dass WSMV einen Suppressor des RNA *silencing* kodiert und dass dieser Suppressor des RNA *silencing* das Protein P1 ist. Hingegen scheint HC-Pro keine Suppressoraktivität zu haben.

Dies findet Unterstützung durch die Untersuchung einer Deletionsmutante von HC-Pro aus WSMV durch Stenger *et al.* (2005). Überraschenderweise war diese WSMV-Mutante in der Lage, Weizen in gleichem Maße wie das Wildtyp-Virus zu infizieren. Wenn HC-Pro ein Suppressor des RNA *silencing* wäre (und damit auch des Verteidigungsmechanismus der befallenen Pflanze), würde man vermuten, dass eine Deletion zu einer verringerten Infektion führen würde. Da dies nicht der Fall ist, ist HC-Pro für Genomreplikation und Langstreckentransport entbehrlich und wirkt vermutlich nur verstärkend (Stenger *et al.*, 2005).

Valli *et al.* (2006) zeigten anhand des *Cucumber vein yellowing ipomovirus* (CVYV), dass auch in diesem Virus P1 als Suppressor des RNA *silencing* wirkt. CVYV gehört der Gattung *Ipomovirus* an und zählt somit ebenso wie TEV und WSMV zu der Familie *Potyviridae*. Das Virus zeigt den allen Mitgliedern der Familie gemeinsamen Genomaufbau (siehe Abschnitt 1.9), jedoch fehlt eine *hc-pro* kodierende Region.

Valli *et al.* (2006) fanden, dass CVYV zwei Kopien der P1 Protease mit 24 % Ähnlichkeit auf Aminosäureebene kodiert, wovon allein die zweite Kopie (P1b) als Suppressor des RNA *silencing* wirkt. Die beiden Kopien sind wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden. Die Suppressoraktivität von P1 aus CVYV beruht ebenso wie die des potyviralen HC-Pro vermutlich auf der Bindung von siRNA. Somit ersetzt P1 aus CVYV zumindest die Suppressoraktivität von HC-Pro.

Ein weiterer Vertreter der Gattung *Ipomovirus*, *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV), hat ebenfalls eine *p1* kodierende Region, welche eine Genduplikation ähnlich zu der von CVYV zeigt, jedoch nur eine Proteasedomäne am C-Terminus von P1 hat. Auch ist eine *hc-pro* kodierende Region in SPMMV noch vorhanden. Während die erste Kopie von P1 (P1a) aus CVYV den P1 Proteinen von Mitgliedern der Gattung *Potyvirus* (wie TEV und TuMV) ähnelt und auch dem N-Terminus von P1 aus SPMMV, ähnelt P1b (die zweite Kopie von P1 aus CVYV) und der C-terminale Teil von P1 aus SPMMV stärker den P1 Proteinen der Tritimoviren (z.B. WSMV).

Zusammengenommen legt dies nahe, dass sich innerhalb der Familie *Potyviridae* evolutionäre Entwicklungen zeigen, welche zu einem Ersatz der Suppressoraktivität von HC-Pro durch P1 führen. Am weitesten fortgeschritten scheint die Entwicklung in CVYV, in dem P1b als Suppressor wirkt und HC-Pro deletiert ist. In WSMV ist HC-Pro zwar noch vorhanden, scheint aber keine essentielle Funktion mehr zu haben und auch nicht mehr als Suppressor zu wirken, während P1 eine Aktivität als Suppressor zeigt. Von P1 aus SPMMV ist nicht bekannt, ob es eine Suppressoraktivität hat, bzw. ob HC-Pro dort noch als Suppressor wirkt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in den Ipomoviren durch die Genduplikation ein dem potyviralen P1 ähnliches Protein erhalten blieb. Demgegenüber ist nicht bekannt, ob in WSMV eine Genduplikation von P1 stattgefunden hat und die erste Kopie von P1 dann deletiert wurde oder ob das ursprüngliche P1 permutierte und nachfolgend die Suppressoraktivität von HC-Pro ersetzte. Die Untersuchungen von Stenger *et al.* (2005) zeigen, dass als nächster Schritt in der evolutionären Entwicklung von WSMV eine Deletion der *hc-pro*-kodierenden Region möglich ist, da HC-Pro keine essentiellen Funktionen mehr auszuüben scheint.

Die Wirkung von P1 aus Potyviren als Verstärker der Suppressoraktivität von HC-Pro (Pruss *et al.*, 1997; Anandalakshmi *et al.*, 1998; Valli *et al.*, 2006) konnte in der vorliegenden Arbeit umgekehrt für HC-Pro aus WSMV als Verstärker des Suppressors P1 nicht gezeigt werden. Valli *et al.* (2006) fanden, dass das potyvirale P1 nur als Verstärker von HC-Pro wirkt, wenn beide *in cis* exprimiert werden, d.h. als Polyprotein, welches durch die Proteaseaktivität von P1 in die beiden reifen Proteine P1 und HC-Pro prozessiert wird. Hingegen führte die Expression der potyviralen *p1* und *hc-pro* auf getrennten

Plasmiden nicht zu einer Verstärkung der Suppressoraktivität von HC-Pro. Valli *et al.* spekulieren, dass die physikalische Interaktion zwischen P1 und HC-Pro einen hypothetischen Suppressionskomplex des *silencing* stabilisieren könnte.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Valli *et al.* war die Suppressoraktivität von P1 in Gegenwart von HC-Pro in der vorliegenden Arbeit nicht erhöht und dies war unabhängig davon, ob P1/HC-Pro *in cis* prozessiert wurden oder getrennt exprimiert wurden. Dies legt nahe, dass HC-Pro aus WSMV zwar die Suppressoraktivität verloren hat, nicht jedoch als Verstärker des Suppressors P1 dient. Somit ist die Funktion des HC-Pro aus WSMV völlig unklar und HC-Pro scheint, zumindest im Hinblick auf die Suppression des *RNA silencing*, redundant zu sein.

4.1.2 Mutiertes P1/HC-Pro und mutiertes P1 zeigen keine Suppressoraktivität

Weder P1/HC-Pro noch P1 mit mutiertem FIVMG-Motiv hatten Suppressoraktivität (siehe Abschnitte 2.3.9 und 3.1, Tabelle 4 und Tabelle 5). Während eine analoge Mutation des konservierten Motivs in P1/HC-Pro aus TEV die Suppressoraktivität nicht beeinträchtigte (Mallory *et al.*, 2002), scheint die Insertion eines Tripeptids in dieses Motiv die Aktivität sowohl von P1/HC-Pro als auch P1 aus WSMV zu inhibieren.

Das Motiv mit der Consensus-Sequenz FI(V/I)(I/V)XG ist eines der wenigen Motive, die zwischen potyviraalem und tritimoviralem P1 konserviert sind (Choi *et al.*, 2002). Insofern ist eine essentielle Funktion wahrscheinlich. Die geringe *gfp*-Expression in Gegenwart des mutierten P1 bzw. mutierten P1/HC-Pro aus WSMV lässt eine Rolle des Motivs bei der Suppression des *RNA silencing* durch P1 vermuten.

Zum einen könnte das Motiv eine Bedeutung bei der Interaktion von P1 mit zellulären Komponenten haben. Für P1 und HC-Pro aus WSMV wurden noch keine zellulären Komponenten nachgewiesen, mit denen sie wechselwirken. Hingegen ist von HC-Pro aus TEV bekannt, dass es mindestens mit einem weiteren Protein (*rgsCaM*, *regulator of gene silencing calmodulin-like protein*) interagiert. Dieses ist Bestandteil eines Signaltransduktionsweges und ruft bei Überexpression einen ähnlichen Phänotyp in transgenen Pflanzen wie HC-Pro hervor (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Es ist zu vermuten, dass P1 aus WSMV als Suppressor ebenfalls mit zellulären Komponenten interagiert und dadurch in den Mechanismus des *RNA silencing* eingreift.

Alternativ bzw. zusätzlich könnte P1 aus WSMV *gfp*-siRNA binden und dadurch mit dem RNA *silencing* interferieren. Die an P1 gebundenen *gfp*-siRNAs werden dem RNA *silencing* Mechanismus entzogen und können dadurch beispielsweise den *silencing*-Effekt nicht mehr verstärken (siehe Abschnitt 1.8). Erst vor kurzem wurde entdeckt, dass HC-Pro aus TEV sowie viele nicht verwandte Suppressoren siRNA binden und dadurch als Suppressor wirken (Lakatos *et al.*, 2006; Merai *et al.*, 2006).

Es ist auch bekannt, dass P1/HC-Pro in transgenen *Arabidopsis* zu einer Akkumulation von miRNA führen (Kasschau *et al.*, 2003). Dies stört insbesondere die Regulation der Expression von Transkriptionsfaktoren und stellt vermutlich die Ursache der beobachteten Entwicklungsstörungen dar. Falls P1 aus WSMV, eventuell durch Interaktion mit HC-Pro, eine Funktion bei der Akkumulation der miRNA hat, könnte eine Insertion in das FIVMG-Motiv diese Funktion inhibieren, ohne die Funktion von P1 als Suppressor zu beeinträchtigen.

Die Mutation des FIVMG-Motivs könnte damit sowohl eine mögliche Interaktion mit einem zellulären Protein als auch die Bindung von siRNA und die über diese Interaktion/Bindung vermittelte Suppressoraktivität von P1 inhibieren.

Es ist auch möglich, dass das Motiv eine Rolle bei der Spaltung von P1/HC-Pro aus WSMV in die beiden Proteine P1 und HC-Pro spielt. Eine Mutation des Motivs könnte die Proteinaseaktivität von P1 und damit die autoproteolytische Spaltung inhibieren. Vermutlich ist die Trennung der beiden Proteine für die volle Aktivität von P1 notwendig. So ist bekannt, dass eine analoge Insertion von 9 bp in das konservierte FIVRG-Motiv in P1 aus TEV die Proteinaseaktivität von P1 inhibierte. Solcherart mutierte Viren waren unfähig, Pflanzen zu infizieren (Verchot und Carrington, 1995b; Kasschau und Carrington, 1995).

Dagegen zeigten Shi *et al.* (1997), dass die erwähnte Insertion in das FIVRG-Motiv von P1 aus TEV weder eine Prozessierung des reifen HC-Pro noch den durch P1/HC-Pro vermittelten Synergismus bei Koinfektion mit einem anderen Virus behindert. Auch Anandalakshmi *et al.* (1998) fanden, dass transgene Tabakpflanzen mit der kodierenden Sequenz für das mutierte *p1* sowohl *p1/hc-pro* mRNA als auch das HC-Pro Protein

akkumulierten.

Falls das Polyprotein P1/HC-Pro aus WSMV aufgrund der Insertion in das konservierte FIVMG-Motiv von P1 nicht mehr in die beiden Proteine P1 und HC-Pro gespalten würde, könnte P1 keine Suppressoraktivität entfalten; somit würde, wie beobachtet, das mutierte P1/HC-Pro keine erhöhte *gfp*-Expression bewirken. Dem steht einerseits entgegen, dass das mutierte P1 alleine auch keinen Effekt auf die *gfp*-Expression hat (siehe Abschnitt 3.1, Tabelle 4 und Tabelle 5). Andererseits hatten Mallory *et al.* (2002) gezeigt, dass P1/HC-Pro aus TEV mit mutiertem FIVRG-Motiv eine erhöhte GUS-Aktivität bewirkt, d.h. die Suppressoraktivität von P1/HC-Pro aus TEV wurde durch die Mutation nicht beeinträchtigt.

Unabhängig davon, ob das Motiv eine Rolle bei der autoproteolytischen Spaltung von P1/HC-Pro spielt, ist es daher wahrscheinlich, dass das Motiv für die Suppressoraktivität von P1 notwendig ist, entweder indem es an der Bindung von siRNA durch P1 oder an der Interaktion von P1 mit einer weiteren zellulären Komponente beteiligt ist.

4.2 Cytoplasmatische Lokalisierung von Suppressor-GFP-Fusionsproteinen

P1/HC-Pro: Movement-Proteine aus WSMV?

Der virale Vermehrungszyklus in der Pflanze besteht aus 3 Schritten: der viralen Replikation in den ersten infizierten Zellen, die Bewegung des Virus in benachbarte Zellen und die systemische Verbreitung in der Pflanze über das vaskuläre System, um vom ersten Infektionsort weit entfernte Teile der Pflanze zu befallen. Die Verbreitung der infektiösen viralen Partikel (Virionen, virale Nukleinsäuren, virale Nukleoproteinkomplexe oder eine Kombination davon) von Zelle zu Zelle erfolgt über Plasmodesmata, typisch pflanzliche Organellen (Lucas *et al.*, 1995; Ding, 1998; Oparka, 2004; Lucas, 2006). Für die systemische Verbreitung wird das vaskuläre System, insbesondere das Siebröhrensystem des Phloems, genutzt (Gilbertson and Lucas, 1996; Oparka and Santa Cruz, 2000; Lucas *et al.*, 2001; van Bel, 2003). Der Transport der Viruspartikel durch die Plasmodesmata ist ein aktiver Prozess, da eine passive Permeation der Partikel (z.B. Diffusion) im Hinblick auf die Größenausschlussgrenze der Plasmodesmata (*size exclusion limit*, SEL von 800 bis 1000 Da) unwahrscheinlich ist (Tucker, 1982; Goodwin, 1983; Citovsky und Zambryski, 1991; Deom *et al.*, 1992; Lucas *et al.*, 1993).

Viele Pflanzenviren kodieren sogenannte ‚movement‘ Proteine (MP), die eine Vergrößerung der SEL von Plasmodesmata bewirken und einen Übertritt der Partikel ermöglichen. Diese MPs können selbst über Plasmodesmata von Zelle zu Zelle zu wandern, sie können aber auch virale Nukleinsäuren binden und somit als Transportvektoren dienen. Zu den Viren, die solche MPs kodieren, zählen beispielsweise Tobamoviren (Tabakmosaikviren), Dianthoviren, Cucumoviren und Geminiviren (Lucas, 2006).

Es wird angenommen, dass in Potyviren HC-Pro, das Hüllprotein (*coat protein*, CP) und das *cylindrical inclusion* (CI) Protein (neben ihren anderen Funktionen) zusammen als MP wirken (Revers *et al.*, 1999). Arbeiten von Rojas *et al.* (1997) zeigten eine Rolle von HC-Pro sowohl des *Bean common mosaic necrosis potyvirus* (BCMNV) als auch des *Lettuce mosaic potyvirus* (LMV) als MP, da diese nach Mikroinjektion in Wirtszellen (Tabak) einen Anstieg des SEL und einen Transport viraler RNA von Zelle zu Zelle bewirkten, sowie selbst von Zelle zu Zelle wanderten. Interessanterweise führte HC-Pro verglichen mit CP zu einem stärkeren Anstieg des SEL und schien zudem mit CP kooperativ zusammenzuwirken. CI wird eine Rolle bei Positionierung eines Komplexes aus HC-Pro und viraler RNA an der Pore von Plasmodesmata zugeschrieben, nicht jedoch eine direkte Rolle als MP (Carrington *et al.*, 1998). Andere potyvirale Proteine, wie P1, NIa und NIb, waren nicht in der Lage, das SEL zu verändern (Rojas *et al.*, 1997) und scheinen daher nicht als MP zu wirken. Mutationen konservierter Aminosäurereste in der zentralen Domäne von HC-Pro aus TEV bewirkten zudem einen negativen Effekt auf den Langstreckentransport, an dem HC-Pro vermutlich beteiligt ist (Klein *et al.*, 1994; Cronin *et al.*, 1995; Kasschau *et al.*, 1997).

Üblicherweise bewirken MP einen Anstieg der SEL von Plasmodesmata. Da aber weder für P1 noch HC-Pro aus WSMV bisher entsprechende Versuche durchgeführt worden waren, konnte die Frage gestellt werden, ob der in Abschnitt 3.1 beschriebene Effekt von P1 auf die *gfp*-Expression möglicherweise nicht nur auf die Suppressorfunktion zurückzuführen sei, sondern auch auf einen Effekt auf die Plasmodesmata. Beispielsweise könnte eine Vergrößerung der SEL eine erhöhte Diffusion oder Transport von GFP aus der transformierten Zelle in benachbarte Zellen bewirken, was vermutlich ein schwächeres GFP-Signal nach mehreren Tagen zur Folge haben könnte und damit einen Effekt

beispielsweise von HC-Pro als Suppressor nicht deutlich zur Geltung bringen könnte. Andererseits könnte eine Lokalisierung von P1 an der Pore der Plasmodesmata möglicherweise den Transport von GFP verhindern, wie er insbesondere bei Transformation von sehr jungen Embryonen beobachtet wird. Eine scheinbar verstärkte *gfp*-Expression in Weizenembryonen durch P1 könnte somit alleine durch eine höhere Konzentration von GFP in transformierten Zellen vorgetäuscht werden.

Zur subzellulären Lokalisierung von P1 bzw. HC-Pro wurden Fusionsprodukte am N-Terminus von GFP verwendet, denn es ist bekannt, dass die Fusion von Reporter genen (GUS, GFP) an den N-Terminus von HC-Pro aus LMV einen negativen Einfluss auf dessen Funktionalität hat (German-Retana *et al.*, 2000; Candresse *et al.*, 2002). Da die meisten Signalpeptide am N-Terminus eines Proteins lokalisiert sind, sollte die Fusion von GFP an den C-Terminus der Suppressoren eine dem nativen P1 oder HC-Pro entsprechende Lokalisierung erlauben. Ein weiterer Vorteil der Fusion an den N-Terminus von GFP ist, dass sich Leserastermutationen erkennen lassen, da in einem solchen Fall keine *gfp*-Expression sichtbar wäre. Die Verwendung eines transienten Expressionssystems zur Beobachtung der subzellulären Lokalisierung hat weiterhin den Vorteil, dass auf eine insbesondere bei Weizen aufwändige Generierung transgener Pflanzen verzichtet werden kann, falls dies aufgrund der vermuteten schädlichen Wirkung von P1/HC-Pro überhaupt möglich wäre. Arbeiten von Mlotshwa *et al.*, (2002b), Escobar *et al.* (2003) und An *et al.* (2003) zeigten, dass ein transientes Expressionssystem, auch in Weizen, zur Lokalisierung von GFP-Fusionsproteinen geeignet ist. Ausserdem ist die transiente Expression im Vergleich zu stabil transformierten Pflanzen höher, was wiederum in Weizen von besonderer Bedeutung ist, da die GFP-Fluoreszenz in chlorophyllhaltigen Blättern *gfp*-transgener Pflanzen wegen der Chlorophyll-Fluoreszenz kaum sichtbar ist, selbst wenn *gfp* unter Kontrolle des starken Ubiquitin-Promotors exprimiert wird (eigene Beobachtung).

Aufgrund der Rolle von HC-Pro aus Potyviren als MP konnte eine Lokalisierung des Fusionsproteins an Plasmodesmata angenommen werden, wie für andere MP:GFP-Fusionsproteine bereits gezeigt (Oparka *et al.*, 1996; Crawford und Zambryski, 2000; Gillespie *et al.*, 2002; Escobar *et al.*, 2003). Andererseits ist nicht bekannt, ob WSMV ein Protein kodiert, welches alleine als MP wirkt. Auch wegen der vermuteten Verlagerung der Suppressorfunktion von HC-Pro von TEV auf P1 von WSMV und der unklaren Rolle von

HC-Pro aus WSMV war eine andere Lokalisierung denkbar.

Die cytoplasmatische Lokalisation legt nahe, dass P1 und HC-Pro nicht als Movement-Proteine wirken

Die hier erzielten Untersuchungen nach biolistischer Transformation zeigten eine klare cytoplasmatische Lokalisierung des P1:GFP- bzw. HC-Pro:GFP-Fusionsproteins in epidermalen und embryonalen Zellen, die sich nicht von der cytoplasmatischen Lokalisierung des GFP alleine unterschied (siehe Abschnitt 3.2, Abbildung 34 bis Abbildung 38). Eine Lokalisierung von P1:GFP und HC-Pro:GFP an Plasmodesmata konnte nicht beobachtet werden, so dass eine Wirkung von P1 oder HC-Pro auf die SEL der Plasmodesmata nicht wahrscheinlich erscheint.

Die beobachtete cytoplasmatische Lokalisierung von HC-Pro:GFP in Weizen deckt sich mit der bei GFP:HC-Pro aus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), einem anderen *Potyvirus*, beobachteten Lokalisierung in Protoplasten (Mlotshwa *et al.*, 2002b). In dieser Arbeit war allerdings HC-Pro an den C-Terminus von GFP fusioniert, was die korrekte Lokalisierung von HC-Pro beeinflussen könnte. Mlotshwa *et al.* hatten auch gezeigt, dass die Lokalisierung des Fusionsproteins bei Expression durch den viralen Vektor *Cowpea mosaic virus* (CPMV) durch die Gegenwart anderer viraler Proteine beeinflusst wurde, da das Protein dann an distinkten cytoplasmatischen Stellen lokalisiert war, an denen vermutlich die Replikation von CPMV stattfand. Allerdings zeigten die hier vorgestellten Untersuchungen eine Wirkung von P1 auch in Abwesenheit von HC-Pro (siehe Abschnitt 3.1, Tabelle 4 und Tabelle 5), so dass eine korrekte Lokalisierung des P1:GFP-Fusionsproteins selbst bei Abwesenheit von HC-Pro angenommen werden kann.

Die Eigenschaft eines Proteins als MP zeigt sich allerdings nicht nur anhand der Lokalisierung an Plasmodesmata, sondern auch in der Fähigkeit, selbst von Zelle zu Zelle zu wandern. Natürlich lässt sich einwenden, dass diese Fähigkeit bei einem im Vergleich zum nativen Protein weit größeren Fusionsprotein eingeschränkt sein könnte. Dem stehen allerdings die Untersuchungen von An *et al.* (2003) entgegen, die die Expression eines 37 kDa (37K) Proteins aus *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV), fusioniert an den C-Terminus von GFP in biolistisch transformierten Weizen- und Tabakblättern beobachteten. Auch hier konnte keine Lokalisierung an Plasmodesmata beobachtet werden, obwohl sich

bei der Versuchspflanze (nicht aber bei Tabak) mit dem *gfp:37K*-Konstrukt häufig Cluster von *gfp*-exprimierenden Zellen zeigten. Hingegen wurde nach Beschuss mit Konstrukten zur Expression von *gfp* alleine oder eines Fusionskonstrukts von *gfp* und dem Hüllprotein CP zumeist eine *gfp*-Expression nur in einzelnen Zellen beobachtet. An *et al.* schlossen daraus, dass 37K aus SBWMV sich als MP von Zelle zu Zelle bewegen konnte, was impliziert, dass die Fusion an GFP den Transport des MP durch Plasmodesmata nicht behinderte. Eine ähnliche Cluster-Bildung von *gfp*-exprimierenden Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit weder bei P1:GFP noch HC-Pro:GFP aus WSMV beobachtet werden.

Tang *et al.* (2003) hatten durch Untersuchungen mittels Weizenkeimextrakt gezeigt, dass die wesentlichen Komponenten des RNA *silencing* in Weizen vorhanden sind. Des weiteren ist bekannt, dass die Vorgänge des RNA *silencing* vor allem im Cytoplasma ablaufen, so dass eine Lokalisierung der mit diesem Mechanismus interferierenden Suppressoren im Cytoplasma sinnvoll erscheint. Angesichts der Resultate zur subzellulären Lokalisierung von P1:GFP und HC-Pro:GFP legt dies nahe, dass weder P1 noch HC-Pro als ‚movement‘ Proteine wirken und dass die in Abschnitt 3.1 gezeigte Verstärkung der *gfp*-Expression in Gegenwart von P1 bzw. P1/HC-Pro auf der Eigenschaft von P1 als Suppressor des RNA *silencing* beruht.

Mögliche Proteinaseaktivität von P1 und HC-Pro in Fusionsproteinen?

Wie bereits von Curtis und Grossniklaus (2003) gezeigt, behindern die *att* Rekombinationsstellen der Gateway®-Vektoren die korrekte Lokalisierung von GFP-Fusionsproteinen nicht. Gegen die Vermutung, dass die beobachtete cytoplasmatische *gfp*-Expression wirklich auf einer cytoplasmatischen Lokalisierung von P1 bzw. HC-Pro beruht, lassen sich jedoch zwei weitere Einwände vorbringen: Einerseits ist die Fähigkeit von P1 bzw. HC-Pro zur autokatalytischen Spaltung an den jeweiligen C-Termini von dem (viralen) Polyprotein bekannt. Falls P1 oder HC-Pro sich auch von GFP abspalten würden, könnte fälschlicherweise eine cytoplasmatische Lokalisierung des Fusionsproteins vermutet werden. Ausserdem wurde gezeigt, dass die Trennung von P1 und HC-Pro für die Infektiösität von Potyviren notwendig ist (Verchot und Carrington, 1995b). Gleichfalls zeigte sich, dass die autoproteolytische Spaltung von HC-Pro und dem nachfolgenden Protein P3 für Infektiösität der Potyviren und Tritimoviren notwendig ist (Kasschau und Carrington, 1995; Stenger *et al.*, 2006). Entsprechend könnte es möglich sein, dass ein

GFP-Fusionsprotein nicht voll funktionsfähig ist und infolgedessen nicht richtig subzellulär lokalisiert ist.

Dagegen lässt sich einwenden, dass der fehlende Effekt nicht-getrennter P1/HC-Pro-Produkte nur bei der Infizierung von Protoplasten bzw. Pflanzen beobachtet wurde (Verchot und Carrington, 1995b; Kasschau und Carrington, 1995; Stenger *et al.*, 2006). Da beide Proteine aber neben ihrer Rolle als Suppressor noch andere Funktionen haben, ist damit eine Wirkung der fehlenden Spaltung auf die Suppressorfunktion nicht zweifelsfrei belegt. Auch ist der Schluss nicht zwingend, dass eine Fusion von P1 bzw. HC-Pro mit GFP die Funktionalität des jeweiligen Suppressorproteins einschränken muss.

Die Frage, ob GFP durch proteolytische Aktivität von P1 bzw. HC-Pro abgespalten wird, ist schwerer zu beantworten, da bisher nicht bekannt ist, wie die Aminosäurereste der C-terminalen Spaltungsstelle von P1 bzw. HC-Pro verändert werden müssten, um eine autoproteolytische Spaltung zu verhindern. Bekannt ist jedoch, dass P1 aus TEV und WSMV in *cis*-Konfiguration als Serinprotease über die typische katalytische H-D-S Triade wirkt (Verchot *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 2002). HC-Pro hingegen zählt zu den papain-ähnlichen Thiolproteasen (Cysteinproteinasen) (Carrington *et al.*, 1989b; Oh und Carrington, 1989; Choi *et al.*, 2000a; Choi *et al.*, 2000b). Im Weiteren wird das anerkannte System zur Nummerierung der Aminosäurereste des Substrats verwendet: P₁; P₂; etc. bezeichnet fortlaufend Reste N-terminal der Schnittstelle; entsprechend bezeichnet P₁'; P₂'; etc. fortlaufend Reste C-terminal der Schnittstelle (Schechter und Berger, 1967).

Die Spaltungsstelle von P1 aus WSMV ist durch Tyrosin an der Stelle P1 und Glycin an der Stelle P₁' definiert (Choi *et al.*, 2002). In dem Fusionsprotein P1:GFP ist die YG-Sequenz des nativen P1/HC-Pro-Polyproteins durch eine YT-Sequenz ersetzt (Tyrosin-Threonin).

Die von HC-Pro aus WSMV prozessierte Spaltstelle HC-Pro ist durch Glycin an den Stellen P1 und P₁' definiert (Choi *et al.*, 2000a, b). Im Fusionsprotein HC-Pro:GFP findet man an dieser Stelle jedoch die Aminosäure-Sequenz Glycin-Histidin.

Die virale Proteinase NIa, die in *trans*-Konfiguration Spaltungsstellen im C-Terminus des Polyproteins von TEV oder WSMV prozessiert (Carrington und Dougherty, 1987a; Carrington und Dougherty, 1987b; Carrington and Dougherty, 1988; Dougherty *et al.*, 1989a; Dougherty and Parks, 1989) gehört zur Familie der Trypsin-ähnlichen

Serinproteinasen, wobei das nukleophile Serin des aktiven Zentrums in ein Cystein umgewandelt ist (Bazan and Fletterick, 1988; Gorbalenya *et al.*, 1989; Bazan and Fletterick, 1990; Ryan and Flint, 1997). Der Austausch des Cysteins der katalytischen Triade durch ein Serin hat eine niedrigere Aktivität der Proteinase NIa zur Folge (Dougherty *et al.*, 1989b).

Es ist bekannt, dass Modifikationen der durch die virale Proteinase NIa erkannten Spaltstelle, insbesondere des Aminosäurerests P₁' zu einer vollständigen Inhibierung der Spaltung führen (Dougherty *et al.*, 1989a; Dougherty und Parks, 1989; Bazan und Fletterick, 1990). In den P1:GFP bzw. HC-Pro:GFP-Fusionsproteinen wurde das kleine und unpolare Glycin an der Stelle P₁' durch die Aminosäurereste Threonin bzw. Histidin mit polaren Seitenketten ersetzt. Folglich ist eine Abspaltung des GFP äußerst unwahrscheinlich, so dass eine cytosolische Lokalisierung der vollständigen Fusionsproteine angenommen werden kann.

4.3 Konstitutive und induzierbare Expression viraler Suppressoren (stabile Transformation)

Nach langwierigen erfolglosen Versuchen, die Weizentransformation mittels der Hochleistungssorte ‚Combi‘ durchzuführen, wurde entschieden, für die Transformationsexperimente die Labor-Varietät ‚Bobwhite SH 9826‘ zu verwenden, von der generelle Transformationsraten von bis zu 70 % berichtet wurden (Pellegrineschi *et al.*, 2002). Damit könnte eine nennenswerte Zahl transgener Weizenpflanzen gewonnen werden. Die hohe Transformationseffizienz sollte es ermöglichen, die Hypothese zu prüfen, dass P1/HC-Pro, konstitutiv exprimiert, die Regeneration transgener Pflanzen hemmen bzw. das Wachstum transgener Pflanzen behindern könnte. Falls die Transformationsrate durch P1/HC-Pro nur gesenkt würde, die Produktion *p1/hc-pro*-transgener Pflanzen prinzipiell aber möglich wäre, böte ‚Bobwhite‘ die Möglichkeit, die Wirkungen von Suppressoren in transgenen Pflanzen zu untersuchen.

Die Wahrscheinlichkeit, dass die Suppressoren in ‚Bobwhite‘ im Vergleich zu ‚Combi‘ keine Wirkung zeigten, wurde als gering erachtet, da *silencing* von Transgenen auch in Bobwhite bekannt ist. Es wäre zwar prinzipiell möglich, dass die hohe Transformationsrate auf eine verringerte *silencing* Aktivität von ‚Bobwhite‘ zurückgehen könnte und dass die

Fälle des beobachteten *silencing* nur auf die sogenannten Positionseffekte zurückzuführen sind; Allerdings sind die Gründe für die hohe Transformationseffizienz doch eher in der guten Leistung in der Gewebekultur und in der hohen Regenerationsrate zu suchen (Pellegrineschi *et al.*, 2002). Auch ist nicht bekannt, dass ‚Bobwhite‘ anfälliger gegen Viren wie WSMV ist, ein weiteres Indiz, dass die *silencing* Aktivität nicht reduziert ist.

4.3.1 Einfluss der Suppressoren auf die Transformationseffizienz

Ein Grund für den statistisch signifikant geringeren Prozentsatz an embryogenem Kallus in den Versuchen zur konstitutiven Expression von *hc-pro* (siehe Abschnitt 3.3.1, Tabelle 7) könnte sein, dass diese Experimente zufällig zu einem ungünstigen Zeitpunkt durchgeführt wurden und die Kallusqualität im Durchschnitt geringer war als bei den Transformationsversuchen mit den anderen Konstrukten. Es ist natürlich denkbar, dass HC-Pro -obwohl in dem transienten Assay keine Suppressor-Aktivität erkennbar war- mit einem Mechanismus interferiert, welcher in die Kallus-Bildung involviert ist. Dafür gibt es allerdings keine Hinweise.

Unerwartet war, dass die Transformationseffizienz auch bei Kontrollversuchen mit pAHC25 oder in Versuchen mit induzierbaren Genen sehr gering war (siehe Abschnitt 3.3.1, Tabelle 6 bis Tabelle 8). Generell war die Qualität des pflanzlichen Ausgangsmaterials nicht optimal, da während der Durchführung der Experimente keine optimalen Anzuchtbedingungen im Gewächshaus eingestellt werden konnten. Die aufgrund der Ergebnisse der transienten Expression angestellte Vermutung, dass P1/HC-Pro bzw. P1 alleine bei konstitutiver Expression die Regeneration transgener Pflanzen verhindern, bzw. die Transformationsrate senken, konnte anhand der Datenlage nicht bestätigt werden. Auch würde man erwarten, dass in den Transgenen mit Suppressoren, die in den Versuchen zur transienten Expression keine Wirkung auf die *gfp*-Expression zeigten, wie HC-Pro, das mutierte P1 oder mutierte P1/HC-Pro, transgene Pflanzen erzeugt werden können. Allerdings kann man nicht ausschließen, dass auch diese Suppressoren eine inhibierende Wirkung auf die Regeneration transgener Pflanzen haben. Da die Transformationseffizienz in den Kontrollen auch sehr gering war, lässt sich dies statistisch allerdings nicht belegen.

Die Versuche, in denen transgene Pflanzen gewonnen werden konnten, ergaben keine

einheitliche Tendenz. Die erzielten Pflanzen wurden aus 9 von insgesamt 207 Partikelbeschüssen gewonnen. Die transgenen Pflanzen zur induzierbaren Expression von *p1* stammen beispielsweise aus Beschüssen, die an 3 Tagen innerhalb eines Zeitraums von 2 Wochen durchgeführt wurden, während alle Transformationen, die außerhalb dieses Zeitraums durchgeführt wurden, unbeschadet des verwendeten Konstrukts, weitestgehend erfolglos waren. Die Erfahrung, dass transgene Weizenpflanzen trotz konstanter Bemühungen meist nur in einem begrenzten Zeitfenster gewonnen werden, ist bekannt, aber nicht erklärbar.

Bei den Versuchen zur Gewinnung von Pflanzen mit konstitutiv exprimierten Suppressoren wurde nur eine transgene Linie mit dem Konstrukt *p1/hc-pro* gewonnen (siehe Abschnitt 3.3.2, Tabelle 9). Diese zeigte einen unauffälligen Phänotyp, bei dem weder *gus* noch *bar* exprimiert wurden. Da in den meisten Fällen die Gesamtheit der Transgene dem *silencing* unterliegt, deutet dies darauf hin, dass *p1/hc-pro* ebenfalls nicht oder so schwach exprimiert wird, dass dies die Regeneration einer transgenen Pflanzen nicht behinderte.

Im Hinblick auf die Wirkung von P1/HC-Pro in transgenen Tabak- und *Arabidopsis*-Pflanzen ist es wahrscheinlicher, dass die Suppressoren des RNA *silencing* (P1/HC-Pro oder P1 aus WSMV) auch in Weizen so gravierende Effekte haben, dass transgene Pflanzen oder embryogene Kalli nicht entstehen können. Von einer weiteren Verfolgung der Strategie, die konstitutive Expression von *p1/hc-pro* zur Steigerung des Expression von Reportergenen zu nutzen, wurde daher abgesehen.

4.3.2 Induzierbare Expression von *p1* in transgenem Weizen

Aufgrund der Vermutung, dass die konstitutive Expression von *p1/hc-pro* bzw. *p1* zu Wachstums- oder Entwicklungsstörungen in transgenen Pflanzen führen könnte, bzw. die Regeneration transgener Pflanzen an sich verhindern könnte, sollte die induzierbare Expression eine Möglichkeit darstellen, um die Wirkung der Suppressoren in transgenen Weizenpflanzen zu untersuchen. Für die Wahl des induzierbaren Systems mussten folgende Kriterien gelten: Tauglichkeit für die Transformation durch Partikelbeschuss, eine niedrige Basalrate der Expression und eine möglichst starke und schnelle Expression nach Induktion des Systems. Für Weizen ist bisher noch kein induzierbares System etabliert worden (Padidam, 2003; Shewry und Jones, 2005), so dass man auf die Verwendung von Systemen, die für den Einsatz in zweikeimblättrigen Pflanzen optimiert wurden, angewiesen ist. Insbesondere chemisch regulierte Systeme bieten den Vorteil, dass durch Zugabe eines Induktors das An- und Abschalten der Expression gesteuert werden kann.

Leider erfüllen nur wenige der 14 bekannten chemisch induzierbaren Systeme die oben genannten Kriterien (Padidam 2003). Während beispielsweise sowohl das kupferinduzierbare, das Estradiol-induzierbare als auch das Methoxyfenozid-induzierbare System eine zuverlässige Regulation der Expression gewährleisten, kann das kupferinduzierbare System nicht verwendet werden, da es die Cotransformation von 3 Plasmiden erfordern würde, was den Einsatz für Partikelbeschuss erschwert (Mett *et al.*, 1993; Mett *et al.*, 1996). Das Methoxyfenozid-abhängige System wurde leider wegen rechtlicher Bedenken nicht freigegeben.

Letztendlich wurde das von Zuo *et al.* (2000) entwickelte Östrogen-Rezeptor-basierte Estradiol-induzierbare System gewählt, da es sowohl in den dikotyledonen Pflanzen Tabak und *Arabidopsis* als auch in Reis eine dichte Kontrolle und hohe Induktionsraten gewährleistet (Brand *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006). In *Arabidopsis* wurde eine um bis zu acht-fach stärkere Expression eines Reportergens gemessen im Vergleich zu einem Gen unter Kontrolle des starken konstitutiven CaMV-35S-Promotors (Zuo *et al.*, 2000). Von Nachteil ist lediglich die Verwendung des Hormons Estradiol, des wichtigsten weiblichen Östrogens, in 100- bis 100.000-fach höheren Konzentrationen im Vergleich zu den durchschnittlichen Estradiolspiegeln in Menschen (Römmler, 2004).

Der verwendete Vektor pMDC7 (siehe Abschnitt 2.3.3, Abbildung 9) beinhaltet neben den erforderlichen oben beschriebenen Transkriptionseinheiten auch Gateway®-Rekombinationsstellen zum leichteren Einbringen der gewünschten Sequenz. Die Funktionalität des Systems in Weizen wurde durch Partikelbeschuss von Embryonen mit dem Vektor pMDC7-GUS zur induzierten Expression des Reportergens *glucuronidase* getestet. Nur bei Embryonen, die auf Estradiol-haltigem Medium kultiviert wurden, konnten *gus*-exprimierende Zellen nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.3.3, Abbildung 42). Allerdings erlaubt ein transienter Assay gerade in Weizen nur einen eingeschränkten Rückschluss auf die Stärke der induzierten Expression in stabil transgenen Pflanzen.

Der Vektor pMDC7 ist für die Agrobakterien-vermittelte Transformation optimiert und ist daher mit über 10 kb an sich schon relativ groß zur Verwendung in biolistischer Transformation. Da durch transiente Expression der Suppressoren in Weizen die Suppressionswirkung auf P1 eingegrenzt werden konnte, wurde für die stabile Transformation von Weizen nur ein Vektor zur induzierbaren Expression von *p1*, nicht aber von *p1/hc-pro* verwendet, um die Gesamtgröße des Vektors möglichst klein zu halten.

4.3.2.1 Retardierte Keimung nach Induktion der Expression von *p1*

Estradiol scheint sowohl in monokotyledonen als auch dikotyledonen Pflanzen systemisch transportiert zu werden, wobei die Estradiol-induzierte Expression in Geweben, die direkt mit dem Induktor in Kontakt gebracht wurden am stärksten ist (Zuo *et al.*, 2000; Brand *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; eigene Beobachtung). Brand *et al.* (2006) zeigte zwar in *Arabidopsis*, dass die Wirkung von Estradiol auf den Bereich der Blätter begrenzt ist, die direkt mit diesem in Kontakt gebracht wurden. In den Weizenembryonen scheint Estradiol aber auch in Gewebeschichten zu diffundieren, die nicht direkt damit in Kontakt kamen (siehe Abschnitt 3.3.3, Abbildung 42).

Die in Abschnitt 3.3.3.1 gezeigte verzögert einsetzende und insgesamt retardierte Keimung wurde in allen transgenen Linien beobachtet, wobei berücksichtigt werden muss, dass die verwendeten Linien hemizygot waren, d.h. dass ein Prozentsatz von etwa 25 % das Transgen nicht enthalten sollte; bei Verwendung homozygoter Linien könnte der Effekt

vergleichsweise noch stärker sein. Allerdings ist es auch möglich, dass der Transkriptionsfaktor XVE in einzelnen Embryonen auch derselben Linie unterschiedlich stark exprimiert wird und auf diese Weise eine unterschiedlich starke Induktion der Expression von *p1* zustande kommt.

Die beobachtete Annäherung der Keimungsraten der transgenen Linien und Kontrollen ist vermutlich auf den Abbau von Estradiol, welches licht- und luftsensitiv ist, zurückzuführen.

Die Expression von *p1/hc-pro* führt in transgenen *Arabidopsis*- und Tabak-Pflanzen zu Entwicklungsstörungen und Kümmerwuchs, da durch P1/HC-Pro die miRNA-vermittelte Regulation von Transkriptionsfaktoren gestört wird (Mallory *et al.*, 2002; Kasschau *et al.*, 2003). Wir vermuten, dass aus diesem Grund auch die Regeneration transgener Weizenpflanzen durch P1/HC-Pro bzw. P1 alleine gestört wird. Es ist möglich, dass der Keimvorgang transgener Pflanzen in Analogie dazu durch P1 alleine retardiert ist, da P1 mit der Steuerung von keimungsspezifischen Prozessen durch Transkriptionsfaktoren interferiert.

4.3.2.2 Wirkung von P1 auf die Aktivität des Reportergens *gus* nach Induktion der Expression von *p1*

Die mithin wichtigste Frage der vorliegenden Arbeit war, ob der Suppressor P1 nach der Induktion eine erhöhte Expression des Reportergens *gus* bewirken könnte. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Aktivität des Enzyms Glucuronidase mit der Menge an Transkript korreliert (Anandalakshmi *et al.*, 1998).

Insbesondere in den beiden Linien 21602 und 21604 konnte eine deutliche, um den Faktor zwei gesteigerte Aktivität des Reportergens *gus* beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.3.3.2, Tabelle 12). Eine unspezifische Reaktion kann ausgeschlossen werden, da andere Linien bei gleicher Behandlung keine deutlich erhöhte *gus*-Expression zeigten und auch Linien 21602 und 21604 bei nur einmaliger Behandlung mit einer niedrigen Konzentration an Estradiol keine erhöhte Aktivität zeigten. Zu beachten ist, dass eine GUS-Aktivität der Linien, die zuvor keine Aktivität des Reportergens zeigten, d.h. in denen *gus* vermutlich bereits dem transkriptionalen *gene silencing* unterworfen war, durch Estradiol-Behandlung nicht reaktiviert werden konnte. Dies bestätigt die Erkenntnis, dass P1 als viraler

Suppressor nur gegen das posttranskriptionale *silencing* wirkt, und somit das transkriptionale *silencing* nicht aufheben kann.

Erstaunlich ist der Umstand, dass in den Linien, die ohnehin bereits die stärkste GUS-Aktivität zeigten, die größte Steigerung der GUS-Aktivität beobachtet werden konnte. Dies könnte damit zusammenhängen, dass diese Pflanzen auch eine höhere Expression des Transkriptionsfaktors XVE zeigen und damit eine stärkere Antwort auf die Estradiol-Behandlung zeigen.

Eine erhöhte *gus*-Expression nach Induktion der Expression von *p1* konnte auch in Schwesterpflanzen der Linien 21602 und 21604 gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.3.3.2, Tabelle 13). Überraschend war hier, dass die Grundaktivität von GUS in den Pflanzen derselben Linie stark unterschiedlich war, während sie sich zwischen den Pflanzen der beiden Linien, anders als ursprünglich angenommen, nicht signifikant unterschied. Es ist möglich, dass die beiden Linien auf denselben Transformationsvorgang zurückgehen, da sie aus demselben Beschussexperiment hervorgegangen sind und daher die Expression des Reportergens *gus* vergleichbar ist. Die im Vergleich zur ersten Versuchsreihe relativ geringe Steigerung der *gus*-Expression beruht vermutlich auf der nur einmal durchgeführten Estradiol-Behandlung mit einer 100 μ M Estradiol-Lösung. In der ersten Versuchsreihe wurden die Pflanzen dagegen mit einer 20 μ M Estradiol-Lösung und 24 Stunden später nochmals mit einer 100 μ M Lösung behandelt. In Weizen ist eine verlängerte oder zweite Estradiol-Behandlung notwendig, um eine starke Induktion der Expression von *p1* zu bewirken. Im Vergleich zu *Arabidopsis*- oder Tabakblättern sind Weizenblätter äußerst robust, was eine Penetration von Estradiol erschwert. Eine Aussage über die Stärke der *gus*-Expression nach Induktion von *p1* im Vergleich zur *gus*-Expression bei konstitutiver Expression von *p1* in Weizen konnte nicht getroffen werden, da keine solchen Pflanzen erzeugt werden konnten.

4.3.3 P1 als Suppressor des RNA silencing

Aus der Keimhemmung und der Erhöhung der Aktivität des Reportergens *gus* nach Estradiol-Behandlung der *p1*-transgenen Pflanzen lassen sich mehrere Schlüsse ziehen.

Zum einen zeigt der Vergleich mit den Kontrollen, dass diese Wirkungen nicht auf unspezifische, gewebekulturbedingte Reaktionen zurückzuführen sind, sondern auf die Expression von *p1*. Dies impliziert, dass mit P1 aus WSMV ein neuer Suppressor des RNA silencing gefunden wurde, der auch ohne HC-Pro als Suppressor wirkt und dies nicht nur in der Varietät ‚Combi‘, sondern auch in ‚Bobwhite‘. Damit ist die Verwendung des Suppressors nicht nur auf die Varietät ‚Combi‘ beschränkt, so dass P1 aus WSMV in einer Vielzahl von Weizensorten zur Steigerung der Expression von Reportergenen oder anderen gewünschten Genen eingesetzt werden könnte.

Des Weiteren wurde damit in Weizen erstmals ein funktionelles chemisch-induzierbares System gezeigt. Allerdings scheint die beobachtete Keimhemmung nach Induktion der Expression von *p1* darauf hinzudeuten, dass auch die Expression von *p1* alleine schädliche Wirkungen auf das Pflanzenwachstum bzw. die pflanzliche Entwicklung haben kann. Damit scheint die hemmende Wirkung von P1 direkt mit den Suppressoreigenschaften verknüpft zu sein und eine Trennung dieser Eigenschaften durch getrennte Expression von *p1* und *hc-pro* allein, wie schon aufgrund der Ergebnisse zur transienten Expression der Suppressoren vermutet, nicht möglich.

Die Verwendung eines induzierbaren Systems zur Expression von *p1* aus WSMV scheint auch angesichts der Schwierigkeiten, *p1* bzw. *p1/hc-pro*-konstitutiv exprimierende transgene Pflanzen zu erhalten, vorteilhaft. Im Bezug auf den Einwand, dass die Expression viraler Suppressoren Pflanzen anfälliger für Virusinfektionen machen würde, gibt es unterschiedliche Ergebnisse. So zeigten Tabakpflanzen, die *p1/hc-pro* bzw. *hc-pro* aus Potyviren exprimierten, eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber heterologen Viren, wie dem *Potexvirus X* oder dem *Potyvirus Y* (Vance, 1991; Vance *et al.*, 1995; Mlotshwa *et al.*, 2002a), was dem klassischen Synergismus-Modell bei Koinfektion entspricht. Auf der anderen Seite scheint die Expression von *hc-pro* in transgenen Tabakpflanzen eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Tabakmosaikvirus (TMV), dem *Tomato black ring nepovirus* (TBRV) und dem Oomyceten *Peronospora tabacina* auszulösen. Während also die

Suppression des RNA *silencing* eine verminderte Abwehr gegenüber viralen Infektionen bedingt, wird die Salicylsäure(SA)-abhängige Pathogenabwehr eventuell über eine SA-induzierte RDRP stimuliert (Pruss *et al.*, 2004).

In jedem Fall scheint die konstitutive Expression von *hc-pro* eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber viralen Pathogenen nach sich zu ziehen. Dem könnte durch eine induzierte Expression des Suppressors in einem begrenzten Zeitfenster oder zu einem Zeitpunkt der pflanzlichen Entwicklung, zu dem Viren keinen all zu großen Schaden hervorrufen können, entgegengewirkt werden. Der Schaden durch Virenbefall könnte so minimiert werden, während gleichzeitig die Expression eines gewünschten Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt erhöht werden könnte. Für eine kommerzielle Anwendung müsste natürlich das estradiol-induzierbare System ersetzt werden, beispielsweise durch das Methoxyfenozid-induzierbare System. Ob bei Expression von *p1* aus WSMV in transgenen Pflanzen ebenfalls das Risiko verstärkter viraler Infektionen besteht, ist nicht bekannt. Da WSMV allerdings bei Koinfektionen synergistisch wirkt (Scheets, 1998) und HC-Pro keine spezifische Funktion zu haben scheint (Stenger *et al.*, 2005), könnte dies vermutet werden.

Auch im Bezug auf die Frage, ob P1/HC-Pro eine erhöhte Transposoninstabilität bewirken könnten, besteht Unklarheit. Das Weizengenom besteht zu 90% aus repetitiven Sequenzen, ein Großteil davon (70 % des Genoms) sind transponierbare Elemente (Bhalla, 2006). Es wird im Allgemeinen angenommen, dass der Mechanismus des RNA *silencing* auch der Kontrolle von transponierbaren Elementen dient; diese Annahme wird durch die Entdeckung unterstützt, dass Mutationen von RNAi in *Drosophila* Transposons aktivieren können (Buchon und Vaury, 2006). Auch Llave *et al.* (2002) schlagen nach der Entdeckung von siRNA, die vermutlich von transposalen Sequenzen abgeleitet ist, vor, dass Transposons ein mögliches Ziel des RNA *silencing*-Mechanismus in Pflanzen sind. Ein Beweis, dass virale Suppressoren tatsächlich zu einer Aktivierung von transponierbaren Elementen in Pflanzen führen, ist bislang noch nicht gelungen. Falls dies der Fall wäre, müssten die Folgen der Expression von *p1* in transgenen Weizenpflanzen mit Hinblick auf die Kontrolle von Transposons untersucht werden.

Auf welchem Mechanismus beruht die Suppressoraktivität von P1?

Erst vor kurzem wurde bekannt, dass viele der bekannten viralen Suppressoren durch Bindung von dsRNA mit dem RNA *silencing* interferieren (Merai *et al.*, 2006; Lakatos *et al.*, 2006). Dies erklärt gleichzeitig die Wirkung der Suppressoren in heterologen Systemen (Dunoyer *et al.*, 2004; Lakatos *et al.*, 2004; Reavy *et al.*, 2004; Merai *et al.*, 2006) wie auch die Entwicklungsstörungen durch Störung des miRNA-Metabolismus (Kasschau *et al.*, 2003). Angesichts der anscheinend universellen Eigenschaft als Suppressor des RNA *silencing* hätte natürlich auch HC-Pro aus TEV in der vorliegenden Arbeit verwendet werden können. Der Einsatz eines Suppressors aus einem Virus, das Weizen nicht als Wirtspflanze befällt, schien aber angesichts der bis vor kurzem ungeklärten Wirkungsweise von HC-Pro nicht ratsam. Es wäre zu erwarten, dass man in den Experimenten zur konstitutiven Expression ein ähnliches Ergebnis wie durch Expression von *p1/hc-pro* bzw. *p1* aus WSMV erzielt hätte, nämlich eine Verstärkung der *gfp*-Expression. Da P1 aber als Suppressor des RNA *silencing* in Weizen eine verstärkte *gfp*-Expression bewirkte, wurde der Ansatz, HC-Pro aus TEV zu verwenden, nicht weiter verfolgt.

Ein den nicht-homologen, viralen Suppressoren gemeinsames Motiv bezüglich der Bindung von dsRNA oder siRNA ist nicht bekannt. Insofern könnte P1 aus WSMV, ähnlich wie HC-Pro aus TEV, durch Bindung von dsRNA als Suppressor wirken, aber auch über einen anderen Mechanismus wie der Zerstörung von Komponenten des Mechanismus (Pazhouhandeh *et al.*, 2006), direkte Inhibierung von Dicer (Qu *et al.*, 2003) oder Bindung reifer kleiner RNA nach Entwindung des Duplex (Chellappan *et al.*, 2005). Alternativ könnte P1 aus WSMV wie HC-Pro aus TEV natürlich auch durch Interaktion mit zellulären Komponenten wirken (Anandalakshmi *et al.*, 2000).

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass P1/HC-Pro aus WSMV als Suppressoren des RNA *silencing* in Weizen wirken können. Ferner wurde die Suppressoraktivität dieses Systems auf P1 eingeschränkt. Die Gewinnung *p1/hc-pro*- bzw. *p1*-konstitutiv exprimierender, transgener Weizenflanzen erscheint äußerst schwierig, so dass es ratsam erscheint, die gewählte erfolgreiche Strategie zur induzierbaren Expression von *p1* weiterzuverfolgen.

Die Expression von *p1* führte im besten Fall zu einer Steigerung der Aktivität von Glucuronidase um den Faktor 2. Dies erscheint weit entfernt von der berichteten 40-fach höheren Glucuronidase-Aktivität bei Expression von *p1/hc-pro* aus TEV in Tabak (Mallory *et al.*, 2002). Allerdings wurde dort *gus* im Rahmen eines sogenannten „Amplicon“-Systems unter Verwendung von Genen des *Potexvirus X* exprimiert, was einen Einfluss auf den Effekt von P1/HC-Pro auf die GUS-Aktivität haben könnte. Zum anderen stand die Expression von *p1/hc-pro* in diesem System unter Kontrolle des starken, konstitutiv wirkenden CaMV-35S Promotors, der eine weitaus höhere Expression in dikotyledonen Pflanzen erlaubt als der stärkste bekannte Promotor in Weizen.

Da das Östrogen-Rezeptor-basierte Estradiol-induzierbare System nicht für den Einsatz in monokotyledonen Pflanzen optimiert ist, ist es denkbar, dass *p1* nach Induktion nicht in einer vergleichbaren Stärke exprimiert wurde wie beispielsweise das Reportergen *gfp* in *Arabidopsis* (Zuo *et al.*, 2000). Zudem ist nicht bekannt, wie stark der konstitutive Promotor G10-90 in stabil transformiertem Weizen im Vergleich zu anderen Promotoren ist. Rückschlüsse von einer hohen Aktivität in Tabak auf eine hohe Aktivität auch in Weizen lassen sich nicht ziehen, wie das Beispiel des CaMV-35S-Promotors lehrt. Eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors XVE, beispielsweise durch Austausch des G10-90 Promotors durch den Ubiquitin-Promotor aus Mais (Christensen und Quail, 1996), stellt den Angelpunkt für die Verbesserung der Estradiol-induzierbaren Expression in Weizen dar.

Dieses Projekt war in einem hohen Maße von der erfolgreichen Durchführung der biolistischen Weizentransformation abhängig. Abgesehen von der hemmenden Wirkung der Suppressoren auf die Regeneration von Pflanzen wurde klar, dass der Einfluss vieler der Faktoren auf den Erfolg der Methode noch immer unklar ist und nicht quantifiziert werden kann, was insbesondere den Zustand der Donorpflanzen vor Entnahme des embryogenen Gewebes betrifft. Dies zeigt umsomehr, dass weitere intensive Forschung zur Aufklärung dieser Parameter und weiteren Verbesserung von Weizentransformation und Weizenzüchtung notwendig ist.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass der neue virale Suppressor P1 aus WSMV im Rahmen eines induzierbaren Systems zur Steigerung der Expression des

Reportergens *gus* eingesetzt werden kann. Zur genaueren Untersuchung der Wirkung von P1 in transgenen Pflanzen sollte allerdings das induzierbare System für den Einsatz in monokotyledonen Pflanzen bzw. für eine kommerzielle Anwendung optimiert werden.

5 Zusammenfassung

Die Expression von Transgenen in Weizen ist oft schwach und instabil. Dies wird auf die Fähigkeit des Weizens zurückgeführt, die Expression eingebrachter Gene durch RNA *silencing* vermindern zu können. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Expression von Transgenen und möglicherweise auch die Transformationseffizienz (d.h. Anzahl transgener Pflanzen pro verwendetem Explantat) in Weizen durch Suppressoren des RNA *silencing* aus pflanzlichen Viren erhöht werden kann. Einer der bekanntesten Suppressoren ist P1/HC-Pro (*protein1/helper-component-proteinase*) aus Potyviren (Fam. *Potyviridae*), dessen Wirkung in Tabak und *Arabidopsis thaliana* beschrieben wurde. P1/HC-Pro ist als amino-terminaler Teil des viralen Polyproteins definiert, der durch autokatalytische Spaltung in die reifen Proteine P1 und HC-Pro prozessiert wird. Die Expression von *p1/hc-pro* in Tabak bewirkt eine erhöhte Expression des Reportergens *glucuronidase (gus)*, gleichzeitig allerdings auch Kümmerwuchs und Entwicklungsstörungen der transgenen Pflanzen. Analog zu dem verwendeten P1/HC-Pro des jeweiligen pathogenen Virus, nämlich *Tobacco etch virus* in Tabak und *Turnip mosaic virus* in *A. thaliana*, sollte untersucht werden, ob das ähnliche P1/HC-Pro aus dem Weizenstrichelmosaikvirus (WSMV, einem *Tritimovirus* ebenfalls aus der Familie *Potyviridae*) als Suppressor des RNA *silencing* in Weizen wirkt.

Zu diesem Zweck wurden Weizenembryonen mit *p1/hc-pro* aus WSMV sowie gleichzeitig mit dem Reportergen *green fluorescent protein (gfp)*, beide unter Kontrolle des konstitutiven Ubiquitin-Promotors, transformiert und die Wirkung von P1/HC-Pro auf die *gfp*-Expression verfolgt. In Gegenwart von P1/HC-Pro konnte im Vergleich zur Kontrolle (d.h. nur mit *gfp* transformierten Embryonen) eine statistisch sehr signifikante, um den Faktor zwei erhöhte *gfp*-Expression beobachtet werden. Überraschenderweise wurde eine gleichermaßen erhöhte *gfp*-Expression auch in Gegenwart von P1 alleine beobachtet, nicht jedoch in Gegenwart von HC-Pro alleine. Dies ist erstaunlich, da HC-Pro aus Potyviren inzwischen als Effektor der Suppression des RNA *silencing* beschrieben wurde, während dem potyviralen P1 vermutlich nur eine unterstützende Funktion zukommen soll. Andererseits deckt sich unsere Beobachtung mit der Vermutung anderer Gruppen, dass nicht HC-Pro, sondern ein anderes Protein aus WSMV als Suppressor agiert. Wir identifizieren P1 aus WSMV als mutmaßlichen Suppressor des RNA *silencing* in Weizen.

P1 interferiert vermutlich mit den vorwiegend im Cytoplasma vorliegenden Komponenten des RNA *silencing*. Diese Ansicht wird durch die gefundene cytoplasmatische Lokalisierung eines P1:GFP-Fusionsproteins nach biolistischer Transformation epidermalen Gewebes aus Weizen unterstützt. Des weiteren scheint P1 aus WSMV nicht als *movement* Protein (MP) zu wirken, da weder eine Lokalisierung an Plasmodesmata noch ein verstärkter Transport des Fusionsproteins über erweiterte Plasmodesmata von einer transformierten Zelle in Nachbarzellen beobachtet werden konnte.

Nicht nur die Suppressorfunktion an sich scheint sich von HC-Pro aus Potyviren auf P1 aus WSMV verlagert zu haben, auch einzelne Motive von P1 scheinen eine andere Funktion erhalten zu haben. Eine Insertionsmutation des konservierten FIVRG-Motivs in P1 aus TEV bewirkt in *p1/hc-pro*-transgenen Tabakpflanzen beispielsweise einen attenuierten Phänotyp, ohne die Aktivität des Suppressors P1/HC-Pro bezüglich der erhöhten Expression des Reportergens *gus* zu beeinträchtigen. Die Zerstörung des homologen FIVMG-Motivs durch eine Insertionsmutation in P1 aus WSMV führte zu einem vollständigen Verlust der Suppressoraktivität, unabhängig davon, ob *p1* alleine oder als Teil des Polyproteins P1/HC-Pro exprimiert wurde. Eine vermutete Funktion des Motivs bei der durch P1 vermittelten Spaltung des Polyproteins P1/HC-Pro ist somit unwahrscheinlich. Das FIVMG-Motiv hat vermutlich entweder eine direkte Wirkung auf die Suppressoraktivität von P1 aus WSMV oder stabilisiert die dreidimensionale Struktur einer darin involvierten Domäne.

Aufgrund der schädlichen Wirkung viraler Suppressoren wie P1/HC-Pro auf die pflanzliche Entwicklung war es trotz großer Bemühungen auch an dem weltweit in der stabilen Transformation von Weizen führenden Institut, dem International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) in Mexiko, nicht möglich, konstitutiv *p1/hc-pro*- oder *p1*-exprimierende Weizenpflanzen zu erhalten. Es konnten jedoch elf transgene Weizenlinien zur Estradiol-induzierbaren Expression von *p1* erhalten werden.

Die beobachtete, verzögert einsetzende und gehemmte Keimung von Embryonen aus *p1*-transgenen Pflanzen nach Estradiol-Induktion unterstützt die Vermutung, dass der Suppressor P1 eine schädliche Wirkung auf das Wachstum der Weizenpflanzen hat. Dies könnte bei konstitutiver Expression eine Regeneration transgener Pflanzen verhindern. Des

Weiteren konnte eine um bis zu dem Faktor zwei erhöhte Expression des Reportergens *gus* nach Estradiol-Induktion der Expression von *p1* beobachtet werden.

Die anhand transient und stabil transformierter Pflanzen gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die Vermutung, dass P1 aus WSMV als Suppressor des RNA *silencing* in Weizen wirkt und dass das Zusammenwirken mit HC-Pro für die Aktivität des Suppressors nicht notwendig ist. Die Strategie, konstitutiv exprimierte Suppressoren zur Steigerung der Expression von Transgenen zu nutzen, scheint aufgrund schädlicher Wirkungen auf die pflanzliche Entwicklung nicht erfolgversprechend. Stattdessen könnte man an eine zeitlich begrenzte Expression im Rahmen eines induzierbaren Systems denken.

Der Suppressor P1 könnte in neuen, kommerziellen Weizenkultivaren verwendet werden und dort eine hohe Expression von Transgenen zur Erhöhung der Stresstoleranz (insbesondere Trockenheits- und Salztoleranz), Pilzresistenz, Herbizidresistenz oder zur Verbesserung der Kornqualität gewährleisten.

Hauptpunkte dieser Arbeit sind der Nachweis von P1 aus WSMV als neuer Suppressor des RNA *silencing* in Weizen und die Etablierung eines funktionellen, chemisch-induzierbaren Systems für Weizen.

6 Conclusion

Expression of transgenes in wheat is often weak and unstable. This is attributed to the capability of wheat to decrease the expression of introduced genes via RNA silencing. This study is devoted to investigating whether suppressors of RNA silencing from plant viruses may increase the expression of transgenes and, optionally, the transformation efficiency (i.e. number of transgenic plants per used explant) in wheat. P1/HC-Pro (protein1/helper-component proteinase) of potyviruses (family *Potyviridae*) is one of the best known suppressors, the effect of which has been described in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. P1/HC-Pro is defined as the amino-terminal part of the viral polyprotein, which is processed by autocatalytical cleavage into the mature proteins P1 and HC-Pro. Expression of *p1/hc-pro* in tobacco leads, at the same time, both to an increased expression of the reporter gene *glucuronidase (gus)* and to reduced growth and developmental defects in transgenic plants. In an analogous approach to the use of P1/HC-Pro of the respective pathogenic virus, namely *Tobacco etch virus* in tobacco and *Turnip mosaic virus* in *A. thaliana*, the intention was to find out whether the similar P1/HC-Pro of *Wheat streak mosaic virus* (WSMV, a *Tritimovirus* of the same family *Potyviridae*) acts as a suppressor of RNA silencing in wheat.

For this purpose, we transformed wheat embryos with *p1/hc-pro* from WSMV and, simultaneously, with the reporter gene *green fluorescent protein (gfp)*, both under control of the constitutive Ubiquitin promoter, and observed the effect of P1/HC-Pro on *gfp*-expression. We observed a statistically highly significant, two-fold increase in *gfp*-expression as compared to the control (i.e. embryos transformed only with *gfp*) when P1/HC-Pro was present. Surprisingly, we observed a similar increase in *gfp*-expression when only P1 was present, but not when only HC-Pro was present. On the one hand this is an astonishing finding, since HC-Pro of potyviruses has been described in the meantime as effector of suppression of RNA silencing, while potyviral P1 has merely a supportive function. On the other hand, our observation coincides with the presumption of other groups that another protein of WSMV, different from HC-Pro, acts as suppressor. We identify P1 from WSMV as putative suppressor of RNA silencing in wheat.

P1 probably interferes with the predominantly cytoplasmic components of RNA silencing. This assumption is supported by the cytoplasmic localisation of a P1:GFP-fusion protein, which was found after biolistic transformation of epidermal wheat tissue. Furthermore, P1 from WSMV appears not to act as movement protein (MP), since we could identify neither a localisation at plasmodesmata nor an increased transport of the fusion protein through widened plasmodesmata from a transformed cell into neighbouring cells.

Not only the suppressor function as such appears to have moved from HC-Pro of potyviruses to P1 of WSMV, but also single motifs appear to have changed their function. An insertional mutation of the conserved FIVRG motif in P1 from TEV leads, for example, to an attenuated phenotype in *p1/hc-pro*-transgenic tobacco plants, while, at the same time, the activity of the suppressor P1/HC-Pro is not diminished with respect to the increased expression of the reporter gene *gus*. The destruction of the homologous FIVMG motif by an insertional mutation in P1 from WSMV led to a complete loss of suppressor activity, independently of sole expression of *p1* or expression as a part of the polyprotein P1/HC-Pro. A presumed function of the motif on the P1-mediated cleavage of the polyprotein P1/HC-Pro therefore appears unlikely. More probably, the FIVMG motif either has a direct effect on the suppressor activity of P1 from WSMV or stabilises the three-dimensional structure of a domain which is involved therein.

Because of detrimental effects of viral suppressors, such as P1/HC-Pro, on plantal growth, it was not possible to obtain transgenic wheat plants which constitutively express *p1* or *p1/hc-pro*, even though great efforts were undertaken at the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Mexico, the leading institute in wheat transformation world-wide. However, we were able to obtain eleven transgenic wheat lines for estradiol-inducible expression of *p1*.

The delayed and hampered germination of embryos from *p1*-transgenic plants that we observed after estradiol-induction supports our assumption that the suppressor P1 has a detrimental effect on the growth of wheat plants. Thus, constitutive expression could prevent a regeneration of transgenic plants. Furthermore, we observed an increase in the expression of the reporter gene *gus* by as much as two-fold after estradiol induction of the expression of *p1*.

The findings obtained with transiently and stably transformed plants support the presumption that P1 from WSMV acts as suppressor of RNA silencing in wheat and that the cooperation with HC-Pro is not necessary for the activity of the suppressor. In view of detrimental effects on plant development, the strategy of using constitutively expressed suppressors for increasing the expression of transgenes does not appear to be promising. Instead, a temporally limited expression within the scope of an inducible system should work better.

The suppressor P1 could drive a high expression of transgenes in order to increase stress tolerance (in particular drought tolerance and salt tolerance), fungus resistance, herbicide resistance or ameliorate grain quality in novel, commercial wheat cultivars.

The main object of this thesis is the identification of P1 from WSMV as a novel suppressor of RNA silencing in wheat and, simultaneously, the establishing of a functional, chemically inducible system in wheat.

7 Glossar

Cosuppression

Dieser Ausdruck wird verwendet, um das wechselseitige *silencing* von Transgenen und homologen endogenen Genen in Pflanzen, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila* zu beschreiben. Cosuppression tritt auf der posttranskriptionalen Ebene auf, wenn die kodierenden Sequenzen homolog sind.

Gene silencing

Gene silencing umfasst transkriptionales und posttranskriptionales *gene silencing*, RNAi, *quelling* und Cosuppression, also alle Phänomene, die eine „Stilllegung“ eines (Trans-) Gens bewirken. Ins Deutsche läßt sich *gene silencing* schwer übertragen, am nächsten käme dem englischen Original „Gen-Stilllegung“ oder „Gen-Abschaltung“. Inzwischen hat sich allerdings auch im deutschen die Verwendung des Anglizismus *gene silencing* eingebürgert.

PTGS (posttranskriptionales *gene silencing*)

PTGS ist eine Form des *RNA silencing* bei Pflanzen. Posttranskriptionales *gene silencing* korreliert mit niedrigen Mengen an reifer mRNA, denn das *silencing* des Gens wird durch den Abbau der entsprechenden mRNA bewirkt. Ungespleißte Vorläufer-mRNA liegt in gleichen Mengen vor wie in Kontrollen, die PTGS nicht unterworfen sind.

Quelling

Quelling („Unterdrückung“) ist eine Art des *RNA silencing*, das durch *sense* Transgene in dem Pilz *Neurospora crassa* induziert wird.

RNAi (*RNA interference*)

RNA-Interferenz ist eine Form des *RNA silencing*, die durch Injektion doppelsträngiger RNA in Tieren oder durch Expression doppelsträngiger RNA über Transgene mit *inverted repeats* (gegenläufigen DNA-Sequenzen) in Pflanzen und Tieren induziert wird. In Pflanzen wird allerdings der Ausdruck IR-PTGS verwendet.

RNA silencing

PTGS, RNAi und *quelling* unterliegen einem gemeinsamen Mechanismus, für den sich der Begriff RNA *silencing* etabliert hat.

TGS (transkriptionales *gene silencing*)

Transkriptionales *gene silencing* bewirkt eine verminderte Expression eines (Trans-)Gens durch verringerte Transkription. Sowohl die Mengen an ungespleißter Vorläufer-mRNA als auch an reifer mRNA sind reduziert.

8 Anhang

Ergänzende Daten zu 3.3.3.1 (retardierte Keimung)

Tabelle 14. Keimungsrate [%] präparierter Embryonen 5 verschiedener transgener Linien (*Triticum aestivum* L. var. ‚Bobwhite SH9826‘) zur induzierbaren Expression von *p1* und Keimungsrate der Kontrolle (nichttransformierte Weizen derselben Varietät) bei Kultivierung auf Estradiol-haltigem MS-Medium (20 μ M Estradiol).

Tage nach Präparation der Embryonen	22070	22087	22088	22138	22198	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	8,9	0	6,7
4	35,0	7,1	28,6	12,5	11,1	73,3	17,0	60,0
5	40,0	14,3	50,0	37,5	22,2	84,4	39,0	93,3
6	50,0	14,3	57,1	37,5	22,2	95,6	84,8	100,0
7	80,0	14,3	64,3	50,0	66,6	95,6	93,2	100,0
10	95,0	100,0	64,3	87,5	77,8	95,2	100,0	100,0

9 Bibliographie

- Agrios G.N.** (2001) *Plant Pathology*, 4th edition, Academic Press.
- An H.B., Melcher U., Doss P., Payton M., Guenzi A.C. und Verchot-Lubicz J.** (2003) Evidence that the 37 kda protein of soil-borne wheat mosaic virus is a virus movement protein. *Journal of General Virology* 84, 3153-3163.
- Anandalakshmi R., Pruss G.J., Ge X., Marathe R., Mallory A.C., Smith T.H. und Vance V.B.** (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13079-13084.
- Anandalakshmi R., Marathe R., Ge X., Herr Jr. J.M., Mau C., Mallory A.C., Pruss G.J., Bowman L. und Vance V.B.** (2000) A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 290, 142-144.
- Anders R.** (2005) Untersuchungen zu P1 und HC-Pro, zwei viralen Suppressoren des posttranskriptionalen *gene silencing* in Weizen. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth.
- Baumberger N. und Baulcombe D.C.** (2005) *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11928-11933.
- Bazan J.F. und Fletterick R.J.** (1988) Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: Structural and functional implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 7872-7876.
- Bazan J.F. und Fletterick R.J.** (1990) Structural and catalytic models of trypsin-like viral proteases. *Seminars in Virology* 1, 311-322.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M. und Hannon G.J.** (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Bhalla P.L.** (2006) Genetic engineering of wheat – current challenges and opportunities. *Trends in Biotechnology* 24(7), 305-311.
- Bhalla P.L., Ottenhof H.H. und Singh, M.B.** (2006) Wheat transformation - an update of recent progress. *Euphytica* 149, 353-366.
- van Bel A.J.E.** (2003) The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell Environment* 26, 125-149.
- Benfey P.N., Ren L. und Chua N.H.** (1990) Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO Journal* 9, 1677-1684.

- van Blokland R., van der Geest N., Mol J.N.M. und Kooter J.M.** (1994) Transgene-mediated suppression of chalcon synthase expression in *Petunia hybrida* results in increase in RNA turnover. *Plant Journal* 6(6), 861-877.
- Bonnet E., van der Peer Y. und Rouzé P.** (2006): The small RNA world of plants. *New Phytologist* 171, 451-468.
- Borsani O., Zhu J. Verslues P.E., Sunkar R. und Zhu J.K.** (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 123, 1279-1291.
- Boutet S., Vazquez F., Liu J., Beclin C., Fagard M., Gratias A., Morel J. B., Crete P., Chen X. M. und Vaucheret H.** (2003) *Arabidopsis* HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Current Biology* 13(10), 843-848.
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brand L., Hörler M., Nüesch E., Vassalli S., Barrell P., Yang W., Jefferson R.A., Grossniklaus U. und Curtis M.D.** (2006) A versatile and reliable two-component system for tissue-specific gene induction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 141, 1194-1204.
- Brigneti G., Voinnet O., Li W.-X., Ji L.-H., Ding S.-W. und Baulcombe D.C.** (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Embo Journal* 17, 6739-6746.
- Britten R.J. und Davidson E.H.** (1969) Gene regulation for higher cells: a theory. *Science* 165, 349-357.
- Buchon N. und Vaury C.** (2006) RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. *Heredity* 96, 195-202.
- Candresse T., Le Gall O., Maisonneuve B., German-Retana S. und Redondo E.** (2002) The use of Green Fluorescent Protein-tagged recombinant viruses to test lettuce mosaic virus resistance in lettuce. *Phytopathology* 92, 169-176.
- Carrington C.J. und Dougherty W.G.** (1987a) Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *Journal of Virology* 61, 2540-2548.
- Carrington C.J. und Dougherty W.G.** (1987b) Processing of the tobacco etch virus 49K protease requires autoproteolysis. *Virology* 160, 355-362.
- Carrington C.J. und Dougherty W.G.** (1988) A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 3391-3395.
- Carrington C.J., Freed D.D. und Sanders T.C.** (1989a) Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and *in vitro*. *Journal of Virology* 63, 4459-4463.
- Carrington C.J., Cary S.M., Parks T.D. und Dougherty W.G.** (1989b) A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *Embo Journal* 8, 365-370.
- Carrington J.C., Jensen P.E. und Schaad, M.C.** (1998) Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant Journal* 14, 393-400.
- Chellapan P., Vanitharani R., Fauquet C.M.** (2005) MicroRNA-binding viral protein interferes with *Arabidopsis* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10381-10386.
- Chen P.Y. und Meister G.** (2005) microRNA-guided posttranscriptional gene regulation. *Biological Chemistry* 386, 1205-1218.
- Choi I.R., Stenger D.C., Morris T.J. und French R.** (2000a) A plant virus vector for systemic expression of foreign genes in cereals. *Plant Journal* 23 (4) 547-555.
- Choi I.-R., Stenger D.C. und French R.** (2000b) Multiple interactions among proteins encoded by the mite-transmitted wheat streak mosaic tritimovirus. *Virology* 267, 185-198.
- Choi I.-R., Horken K.M., Stenger D.C. und French R.** (2002) Mapping of the P1 proteinase cleavage site in the polyprotein of wheat streak mosaic virus (genus *Tritimovirus*). *Journal of General Virology* 83, 443-450.
- Christensen A.H. und Quail P.H.** (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* 5, 213-218.
- Chuang C.F. und Meyerowitz E.M.** (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(9), 4985-4990.
- Citovsky V. und Zambryski P.** (1991) How do plant virus nucleic acids move through intercellular connections? *Bioessays* 13, 373-379.
- Cogoni C., Irelan J.T., Schumacher M., Schmidhauser T.J., Selker E.U. und Macino G.** (1996) Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO Journal* 15, 3153-3163.
- Crawford K.M. und Zambryski P.C.** (2000) Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Current Biology* 10(17),

1032-1040.

Cronin S., Verchot J., Haldeman-Cahill R., Schaad M.C. und Carrington J.C. (1995) Long-distance movement factor: A transport function of the potyvirus helper component-proteinase. *Plant Cell* 7, 549-559.

Bread wheat – improvement and production. FAO Plant Production and Protection Series No. 30. Food and Agricultural Organisation of the United Nations. Rome, 2002. Hrsg. B.C. Curtis. ISBN 9251048096.

www.fao.org/docrep/006/Y4011E/y4011e02.htm#TopOfPage

Curtis B.C. in: Bread wheat – improvement and production. FAO Plant Production and Protection Series No. 30. Food and Agricultural Organisation of the United Nations. Rome, 2002. Hrsg. Curtis B.C. ISBN 9251048096.

Curtis M.D. und Grossniklaus U. (2003) A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes *in planta*. *Plant Physiology* 133(2), 462-469.

Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Angell S. und Baulcombe D.C. (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101(5), 543-553.

Dalmay T., Horsefield R., Braunstein T.H. und Baulcombe D.C. (2001) SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* 20, 2069-2078.

Dalrymple M.A., McGeoch D.J., Davison A.J. und Preston C.M. (1985) DNA sequence of the herpes simplex virus type 1 gene whose product is responsible for transcriptional activation of immediate early promoters. *Nucleic Acids Research* 13, 7865-7879.

Deom C.M., Lapidot M. und Beachy R.N. (1992) Plant virus movement proteins. *Cell* 69, 221-224.

Ding B. (1998) Intercellular protein trafficking through plasmodesmata. *Plant Molecular Biology* 38, 279-310.

Dong X., van Wezel R., Stanley J. und Hong Y. (2003) Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *Journal of Virology* 77, 7026-7033.

Dougherty W.G., Cary S.M. und Parks T.D. (1989a) Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: A model. *Virology* 171, 356-364.

Dougherty W.G., Parks T.D., Cary S.M., Bazan J.F. und Fletterick R.J. (1989b) Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49 kDa proteinase. *Virology* 172, 302-310.

- Dougherty W.G. und Parks T.D.** (1989) Molecular genetic and biochemical evidence for the involvement of the heptapeptide cleavage sequence in determining the reaction profile at two tobacco etch virus cleavage sites in cell-free assays. *Virology* 172, 145-155.
- Dunoyer P., Lecellier C.H., Parizotto E.A., Himber C. und Voinnet O.** (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathway with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, 1235-1250.
- Dunoyer P. und Voinnet O.** (2005) The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 415-423.
- Elbashir S.M., Lendeckel W. und Tuschl T.** (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development* 15, 188-200.
- Escobar N.M., Haupt S., Thow G., Boevink P., Chapman S. und Oparka K.** (2003) High-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. *Plant Cell* 15(7), 1507-1523.
- FAO Statistical Yearbook 2004.** www.fao.org/statistics/yearbook
- Filipowicz W., Jaskiewicz L., Kolb F.A. und Pillai R.S.** (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology* 15, 331-341.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. und Mello, C.C.** (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- French R.C. und Stenger D.C.** (2002). Wheat streak mosaic virus (descriptions of plant viruses no. 48, revised). Description of Plant Viruses. A.A.B. descriptions of plant viruses, No. 393.
- Gan, S. und Amasino, R.M.** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270 (5244), 1986-1988.
- Gascioli V., Mallory A.C., Bartel D.P. und Vaucheret H.** (2005) Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Current Biology* 15, 1494-1500.
- Gazzani S., Lawrenson T., Woodward C., Headon D. und Sablowski R.** (2004) A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* 306, 1046-1048.
- Gelvin S.B.** (1998) The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinion Biotechnology* 9, 227-232.
- German-Retana S., Candresse T., Alias E., Delbos R.P. und Le Gall O.** (2000) Effects of green fluorescent protein or beta-Glucuronidase tagging on the accumulation and

- pathogenicity of a resistance-breaking lettuce mosaic virus isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 316-324.
- Gilbertson R.L. und Lucas W.J.** (1996) How do viruses traffic on the 'vascular highway'? *Trends in Plant Sciences* 1, 260-268.
- Gill B.S. und Friebe, B.** in: Bread wheat – improvement and production. FAO Plant Production and Protection Series No. 30. Food and Agricultural Organisation of the United Nations. Rome, 2002. Hrsg. Curtis B.C. ISBN 9251048096.
- Gillespie T., Boevink P., Haupt S., Roberts A.G., Toth R., Valentine T., Chapman S. und Oparka K.J.** (2002) Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus. *Plant Cell* 14, 1207-1222.
- Glazov E., Phillips K., Budziszewski G.J., Schöb H., Meins F. und Levin J.Z.** (2003) A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 35, 342-349.
- Goodwin P.B.** (1983) Molecular size limit for movement in the symplast of the *Elodea* leaf. *Planta* 157, 124-130.
- Gorbalenya A.E., Koonin E.V., Donchenko A.P. und Blinov V.M.** (1989) Coronavirus genome: Prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Research* 12, 4847-4861.
- Greene G.L., Gilna P., Waterfield M., Baker A., Hort Y. und Shine J.** (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150-1154.
- Guo H.S. und Ding S.W.** (2002) A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *Embo Journal* 21(3), 398-407.
- Guo S. und Kemphues K.J.** (1995) par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611-620.
- Hamilton A.J. und Baulcombe D.C.** (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hamilton A., Voinnet O., Chappell L. und Baulcombe D.** (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo Journal* 21 (17), 4671-4679.
- Hammond S.M, Bernstein E., Beach D. und Hannon G.J.** (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Hammond S.M.** (2005) Dicing and slicing - the core machinery of the RNA interference

- pathway. *Febs Letters* 579, 5822-5829.
- Hannon, G.J.** (2002) RNA interference. *Nature* 418, 244-251.
- Henry M. und Plumb R.T.** in: Bread wheat – improvement and production. FAO Plant Production and Protection Series No. 30. Food and Agricultural Organisation of the United Nations. Rome, 2002. Hrsg. Curtis B.C. ISBN 9251048096.
- Herr A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T. und Baulcombe, D.C.** (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308: 118-120.
- Hoisington D., Bohorova N., Fennell S., Khairallah M., Pellegrineschi A. und Ribaut, J.M.** in: Bread wheat – improvement and production. FAO Plant Production and Protection Series No. 30. Food and Agricultural Organisation of the United Nations. Rome, 2002. Hrsg. Curtis B.C. ISBN 9251048096.
- Huber M., Hahn R. und Hess D.** (2002) High transformation frequencies obtained from a commercial wheat (*Triticum aestivum* L. cv. ‘Combi’) by microbombardment of immature embryos followed by GFP screening combined with PPT selection. *Molecular Breeding* 10, 19-30.
- Ingram H.M., Livesey N.L., Power J.B. und Davey M.R.** (2001) Genetic transformation of wheat: progress during the 1990s into the millenium. *Acta Physiologiae Plantarum* 23 (2), 221-239.
- Ishige F., Takaichi M., Foster R., Chua N.H. und Oeda K.** (1999) A G-box motif (gccacgtgcc) tetramer confers high-level constitutive expression in dicot and monocot plants. *Plant Journal* 18(4), 443-448.
- Iyer L.M., Kumpatla S.P., Chandrasekharan M.B. und Hall T.C.** (2000) Transgene silencing in monocots. *Plant Molecular Biology* 43, 323-346.
- Jacob F. und Monod J.** (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* 3, 318-356.
- Jezewska** (2000) *Phytopathologica-Polonica* 20, 77.
- Kanno T., Huettel B., Mette M.F., Aufsatz W., Jaligot E., Daxinger L., Kreil D.P., Matzke M. und Matzke A.J.** (2005) Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics* 37, 761-765.
- Karimi M., Inze D. und Depicker A.** (2002) Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7(5), 193-195.
- Kasschau K.D. und Carrington J.C.** (1995) Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. *Virology* 209, 268-273.
- Kasschau K.D., Cronin S. und Carrington J.C.** (1997) Genome amplification and long-

- distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228, 251-262.
- Kasschau K.D. und Carrington J.C.** (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95, 461-470.
- Kasschau K.D., Xie Z.X., Allen E., Llave C., Chapman E.J., Krizan K.A. und Carrington J.C.** (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell* 4(2), 205-217.
- Kertbundit S., Greve H.D., Deboeck F., Montagu M.V. und Hernalsteens J.P.** (1991) In vivo random b-glucuronidase gene fusions in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5212-5216.
- Ketting R., Haverkamp T.H., van Luenen H.G. und 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.
- Kim V.N.** (2004) MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends in Cell biology* 14(4), 156-159.
- Klein P.G., Klein R.R., Rodriguez-Cerezo E., Hunt A.G. und Shaw J.G.** (1994) Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204, 759-769.
- van der Krol A.R., Mur L.A., Beld M., Mol J.N. und Stuitje A.R.** (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291-299.
- Kurihara Y. und Watanabe Y.** (2004) *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12753-12758.
- Lakatos L., Szittyá G., Silhavy D. und Burgyan J.** (2004) Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombus-viruses. *EMBO Journal* 23, 876-884.
- Lakatos L., Csorba T., Pantaleo V., Chapman E.J., Carrington J.C., Liu Y.P., Dolja V.V., Calvino L.F., Lopez-Moya J.J. und Burgyan J.** (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *Embo Journal*, 25, 2768-2780.
- Lechtenberg B., Schubert D., Forsbach A., Gils M. und Schmidt R.** (2003) Neither inverted repeat T-DNA configurations nor arrangements of tandemly repeated transgenes are sufficient to trigger transgene silencing. *Plant Journal* 34, 507-517.
- Lee R.C., Feinbaum R.L. und Ambros V.** (1993). The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4*

- encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75, 843-854.
- Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K.H., Lee S., Baek S.H. und Kim V.N.** (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal* 23, 4051-4060.
- Li H.W., Li W.X. und Ding S.W.** (2002) Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296, 1319-1321.
- Li J., Yang Z., Yu B., Liu J. und Chen X.** (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Current Biology* 15, 1501-1507.
- Lippman Z. und Martienssen R.** (2004) The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431, 364-370.
- Llave C., Kasschau K.D. und Carrington J.C.** (2000) Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(24), 13401-13406.
- Llave C., Kasschau K.D., Rector M.A. und Carrington J.C.** (2002) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14, 1605-1619.
- Llave C.** (2004) MicroRNAs: more than a role in plant development? *Molecular Plant Pathology* 5, 361-366.
- Lu C., Tej S.S., Luo S., Haudenschild D.C., Meyer B.C. und Green P.J.** (2005a) Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science* 309, 1567-1569.
- Lu R., Maduro M., Li F., Li H.W., Broitman-Maduro G., Li W.X. und Ding S.W.** (2005b) Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 436, 1040-1043.
- Lucas W.J., Ding B. und van der Schoot C.** (1993) Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytologist* 125, 435-476.
- Lucas W.J., Bouche-Pillon S., Jackson D.P., Nguyen L., Baker L., Ding B. und Hake S.** (1995) Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its messenger RNA through plasmodesmata. *Science* 270, 1980-1983.
- Lucas W.J., Yoo B.C. und Kragler F.** (2001) RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 849-857.
- Lucas W.J.** (2006) Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344, 169-184.
- Lucy A.P., Guo H.S., Li W.X. und Ding S.W.** (2000) Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *Embo Journal* 19(7), 1672-1680.

- Mallory A.C., Ely L., Smith T.H., Marathe R., Anandalakshmi R., Fagard M., Vaucheret H., Pruss G., Bowman L. und Vance V.B.** (2001) Hc-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 13, 571-583.
- Mallory A.C., Parks G., Endres M.W., Baulcombe D., Bowman L.H., Pruss G.J., Vance V.B.** (2002) The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants. *Nature Biotechnology* 20, 622-625.
- McKinney** (1937) *USDA Circular Number 442* (Washington D.C.), 23 pp.
- Merai Z., Kerenyi Z., Kertesz S., Magna M., Lakatos L. und Silhavy D.** (2006) Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology* 80, 5747-5756.
- Mett V.L., Lochhead L.P. und Reynolds P.H.S.** (1993) Copper-controllable gene-expression system for whole plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(10), 4567-4571.
- Mett V.L., Podivinsky E., Tennant A.M., Lochhead L.P., Jones W.T., Reynolds P.H.S.** (1996) A system for tissue-specific copper-controllable gene expression in transgenic plants: nodule-specific antisense of aspartate aminotransferase-p-2. *Transgenic Research* 5, 105-113.
- Mette M.F., van der Winden J., Matzke M. und Matzke A.J.** (2002) Short RNAs can identify new candidate transposable element families in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 130, 6-9.
- Metzlaff M., O'Dell M., Cluster P.D. und Flavell R.B.** (1997) RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia. *Cell* 88, 845-854.
- Mlotshwa S., Verver J., Sithole-Niang I., Prins M., Van Kammen A. und Wellink J.** (2002a) Transgenic plants expressing HC-Pro show enhanced virus sensitivity while silencing of the transgene results in resistance. *Virus Genes* 25(1), 45-57.
- Mlotshwa S., Verver J., Sithole-Niang I., Gopinath K., Carette J., van Kammen A.B. und Wellink J.** (2002b) Subcellular location of the helper component-proteinase of cowpea aphid-borne mosaic virus. *Virus Genes* 25, 207-216.
- Molnar A., Csorba T., Lakatos L., Varallyay E., Christophe Lacomme C. und Burgyan J.** (2005) Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *Journal of Virology* 79, 7812-7818.
- Morel J. B., Godon C., Mourrain P., Beclin C., Boutet S., Feuerbach F., Proux F. und Vaucheret H.** (2002) Fertile hypomorphic *ARGONAUTE (ago1)* mutants impaired in

- post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* 14(3), 629-639.
- Mourrain P., Beclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.B., Jouette D., Lacombe A.M., Nikic S., Picault N., Remoue K., Sanial M., Vo T. A. und Vaucheret H.** (2000) *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101(5), 533-542.
- Muangsan N., Beclin C., Vaucheret H. und Robertson D.** (2004) Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. *Plant Journal* 38, 1004-1014.
- Murashige T. und Skoog F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Nagy F., Odell J.T., Morelli G. und Chua N.H.** (1985) Properties of expression of the 35S promoter from CaMV in transgenic tobacco plants. In: Biotechnology in plant science - relevance to agriculture in the eighties. Zaitlin M., Day P., Holländer A. (eds.), New York.
- Napoli C., Lemieux R.A. und Jorgensen R.A.** (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2 (4), 279-290.
- Oh C.S. und Carrington J.C.** (1989) Identification of essential residues in potyvirus proteinase Hc-Pro by site-directed mutagenesis. *Virology* 173, 692-699.
- Onodera Y., Haag J.R., Ream T., Nunes P.C., Pontes O. und Pikaard C.S.** (2005) Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* 120, 613-622.
- Oparka K.J., Boevink P. und Santa Cruz S.** (1996) Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. *Trends in Plant Sciences* 1, 412-418.
- Oparka K.J. und Santa Cruz S.** (2000) The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 323-347.
- Oparka K.J.** (2004) Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends in Plant Sciences* 9, 33-41.
- Padidam M.** (2003) Chemically regulated gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6(2), 169-177.
- Pang, S.Z., Deboer, D.L., Wan, Y., Ye, G., Layton, J.G., Neher, M.K., Armstrong, C.L., Fry, J.E., Hinchee, M.A.W., Fromm, M.E.** (1996) An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol.* 112 (3), 893-900.
- Park W., Li J., Song R., Messing J. und Chen X.** (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer

- homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 12, 1484-1495.
- Parizotto E.A., Dunoyer P., Rahm N., Himber C. und Voinnet O.** (2004) *In vivo* investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes and Development* 18, 2237-2242.
- Pazhouhandeh M., Dieterle M., Marrocco K., Lechner E., Berry B., Brault V., Hemmer O., Kretsch T., Richards K.E., Genschik P. und Ziegler-Graff V.** (2006) F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1994-1999.
- Pellegrineschi A., Noguera L. M., Skovmand B., Brito R. M., Velazquez L., Salgado M. M., Hernandez R., Warburton M. und Hoisington D.** (2002) Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants. *Genome* 45(2), 421-430.
- Pellegrineschi A., Reynolds M., Pacheco M., Brito R.M., Almeraya R., Yamaguchi-Shinozaki K. und Hoisington D.** (2004) Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. *Genome* 47, 493-500.
- Peragine A., Yoshikawa M., Wu G., Albrecht H.L. und Poethig R.S.** (2004) SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of transacting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 18, 2368-2379.
- Pirone T.P. und Blanc S.** (1996) Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 34, 227-247.
- Plasterk R.H.A.** (2002) RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 296, 1263-1265.
- Pontier D., Yahubyan G., Vega D., Bulski A., Saez-Vasquez J., Hakimi M.A., Lerbs-Mache S., Colot V. und Lagrange T.** (2005) Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 19, 2030-2040.
- Pruss G., Ge X., Shi X.M., Carrington J.C. und Vance V.B.** (1997) Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9(6), 859-868.
- Pruss G.J., Lawrence C.B., Bass T., Qingshun Q.L., Bowman L.H. und Vance V.** (2004)

- The potyviral suppressor of RNA silencing confers enhanced resistance to multiple pathogens. *Virology* 320, 107-120.
- Qi Y., Denli A.M. und Hannon G.J.** (2005) Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Molecular Cell* 19, 421-428.
- Qu F. und Morris T.J.** (2002) Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Molecular Plant Microbe Interactions* 15, 193-202.
- Qu F., Ren T. und Morris T.J.** (2003) The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *Journal of Virology* 77, 511-522.
- Qu F. und Morris T.J.** (2005) Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *Febs Letters* 579, 5958-5964.
- Rabenstein F., Seifers D.L., Schubert J., French R. und Stenger D.C.** (2002) Phylogenetic relationships, strain diversity and biogeography of tritroviruses. *Journal of General Virology* 83, 895-906.
- Reavy B., Dawson S., Canto T. und MacFarlane S.A.** (2004) Heterologous expression of plant virus genes that suppress post-transcriptional gene silencing results in suppression of RNA interference in *Drosophila* cells. *BMC Biotechnology* 4
- Reinhart B.J., Weinstein E.G., Rhoades M.W., Bartel B. und Bartel D.P.** (2002) MicroRNAs in plants. *Genes and Development* 16, 1616-1626.
- Revers F., Le Gall O., Candresse T. und Maule A.J.** (1999) New Advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(5), 367-376.
- Rojas M.R., Zerbini F.M., Allison R.F., Gilbertson R.L. und Lucas W.J.** (1997) Capsid protein and helper component proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* 237, 283-295.
- Römmler A.** (2004) Estrogene für den Mann? *ÄP UrologieNephrologie* 3, 30-32.
- Roth B.M., Pruss G.J., und Vance V.B.** (2004) Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research* 102(1), 97-108.
- Ryan M.D. und Flint M.** (1997) Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *Journal of General Virology* 78, 699-723.
- Sahrawat A. K., Becker D., Lutticke S. und Lorz H.** (2003) Genetic improvement of wheat via alien gene transfer, an assessment. *Plant Science* 165(5), 1147-1168.
- Salomon S.** (2005) Untersuchung der Wirkungsweise der viralen Suppressoren des

- posttranskriptionalen *gene silencing* P1 und HC-Pro in Weizen. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth.
- Sambrook J. und Russell D.W.** (2001) Molecular cloning – a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, USA.
- Sanchez-Sanchez H., Henry M., Cardenas-Soriano E. und Alvizo-Villasana H.F.** (2001) Identification of *Wheat streak mosaic virus* and its vector *Aceria tosichella* in Mexico. *Plant Disease* 85, 13-17.
- Sanford J.C., Klein T.M., Wolf E.D. und Allen N.** (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Journal of Particulate Science and Technology* 5, 27-37.
- Schaaf, A.** (2001) Versuche zur Agrobakterien-vermittelten Transformation von *Triticum aestivum* L. mit *gfp* als Markergen. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth.
- Schaaf J., Walter M.H. und Hess D.** (1995) Primary metabolism in plant defense - regulation of a bean malic enzyme gene promoter in transgenic tobacco by developmental and environmental cues. *Plant Physiology* 108, 949-960.
- Schechter I. und Berger A.** (1967) On the size of the active site in proteases. I. papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 27, 157-162.
- Scheets K.** (1998) Maize chlorotic mottle machlovirus and wheat streak mosaic rymovirus concentrations increase in the synergistic disease corn lethal necrosis. *Virology* 242 (1), 28-38.
- Schwartz M., Chen J., Janda M., Sullivan M., de Boon J. und Ahlquist P.** (2002) A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Molecular Cell* 9, 505-514.
- Schwarz D., Hutvágner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P.** (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- Sentner U.** (2003) Untersuchungen zur Wirkung viraler Suppressoren des posttranskriptionalen *gene silencing* in Weizen. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth.
- Shewry P.R. und Jones H.D.** (2005) Transgenic wheat: where do we stand after the first 12 years? *Annals of Applied Biology* 147, 1-14.
- Shi X.M., Miller H., Verchot J., Carrington J.C. und Vance V.B.** (1997) Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. *Virology* 231 (1), 35-42.

- Silhavy D., Molnar A., Lucioli A., Szittyá G., Hornyik C., Tavazza M. und Burgyan J.** (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21-to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO Journal* 21(12), 3070-3080.
- Slykhuis J.T.** (1967) Virus diseases of cereals. *Review of Applied Mycology* 46, 401-429.
- Spencer T.M., Gordon-Kamm W.J., Daines R.J., Start W.G. und Lemaux P.G.** (1990) Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. *Theoretical and Applied Genetics* 79, 625-631.
- Stam M.; de Bruin, R., Kenter S., van der Hoorn R.A.L., van Blokland R., Mol, J.N.M. und Kooter J.M.** (1997) Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *Plant Journal* 12, 63-82.
- Stenger D.C. und French R.** (2004) Functional replacement of wheat streak mosaic virus hc-pro with the corresponding cistron from a diverse array of viruses in the family potyviridae. *Virology* 323, 257-267.
- Stenger D.C., French R. und Gildow F.E.** (2005) Complete deletion of wheat streak mosaic virus HC-Pro: a null mutant is viable for systemic infection. *Journal of Virology* 79, 12077-12080.
- Stenger D.C., Hein G.L. und French R.** (2006) Nested deletion analysis of wheat streak mosaic virus HC-Pro: mapping of domains affecting polyprotein processing and eriophyid mite transmission. *Virology* 350, 465-474.
- Susi P., Hohkuri M., Wahlroos T., Kilby N.J.** (2004) Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Molecular Biology* 54, 157-174.
- Szittyá G., Molnar A., Silhavy D., Hornyik C. und Burgyan J.** (2002) Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted by trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell* 14, 359-372.
- Takeda A., Sugiyama K., Nagano H., Mori M., Kaido M., Mise K., Tsuda S. und Okuno T.** (2002) Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS Letters* 532, 75-79.
- Tang G.L., Reinhart B.J., Bartel D.P. und Zamore P.D.** (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes and Development* 17(1), 49-63.
- Thomas C.L., Leh V., Lederer C. und Maule A.J.** (2003) Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 306, 33-41.
- Tucker E.B.** (1982) Translocation in the staminal hairs of *Setcreasea purpurea* L. A study of cell ultrastructure and cell-to-cell passage of molecular probes. *Protoplasma* 113, 193-

201.

- Valli A., Martín-Hernández A.M., López-Moya, J.J. und García J.A.** (2006) RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of cucumber vein yellowing ipomovirus, a member of the family *Potyviridae* that lacks the cysteine protease HCPro. *Journal of Virology* 80(20), 10055-10063.
- Vance V.B.** (1991) Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. *Virology* 182, 486-494.
- Vance V.B., Berger P.H., Carrington J.C., Hunt A.G. und Shi X.M.** (1995) 5' proximal potyviral sequences mediate potato virusX/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 206, 583-590.
- Vasil V., Castillo A.M., Fromm M.E. und Vasil I.K.** (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* 10, 667-674.
- Vasil I.K.** (2007) Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports* 26(8), 1133-1154.
- Vaughn MW. und Martienssen R.A.** (2005) Finding the right template: RNA pol IV, a plant-specific RNA polymerase. *Molecular Cell* 17: 754-765.
- Vazquez F., Vaucheret H., Rajagopalan R., Lepers C., Gascioli V., Mallory A.C., Hilbert J.L., Bartel D.P. und Crété P.** (2004) Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Molecular Cell* 16, 69-79.
- Verchot J.M., Koonin E.V. und Carrington J.C.** (1991) The 35-kDa protein from the N-Terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185, 527-535.
- Verchot J., Herndon K.L. und Carrington J.C.** (1992) Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology* 190, 298-306.
- Verchot J. und Carrington J.C.** (1995a) Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions *in trans* as an accessory factor for genome amplification. *Journal of Virology* 69(6), 3668-3674.
- Verchot J. und Carrington J.C.** (1995b) Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by 2nd-site modifications. *Journal of Virology* 69(3), 1582-1590.
- Voinnet O., Pinto Y.M. und Baulcombe D.C.** (1999) Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (24), 14147-14152.
- Voinnet O., Lederer C. und Baulcombe D.C.** (2000) A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103, 157-167.
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P. und Baulcombe D.** (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal* 33, 949-956.
- Voinnet O.** (2005) Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* 6, 206-220.
- Waterhouse P.M., Graham H.W. und Wang M.B.** (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(23), 13959-13964.
- van Wezel R., Dong X., Liu H., Tien P., Stanley J. und Hong Y.** (2002) Mutation of three cysteine residues in Tomato yellow leaf curl virus-China C2 protein causes dysfunction in pathogenesis and posttranscriptional gene silencing suppression. *Molecular Plant Microbe Interactions* 15, 203-208.
- Wienholds E., Kloosterman W.P., Miska E., Alvarez-Saavedra E., Berezikov E., de Bruijn E., Horvitz H.R., Kauppinen S. und Plasterk R.H.** (2005) MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 309, 310-311.
- Wu-Scharf D., Jeong B., Zhang C. und Cerutti H.** (2000) Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* 290, 1159-1162.
- Xie Z., Allen E., Wilken A. und Carrington J.C.** (2005) DICER-LIKE4 functions in transacting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 12984-12989.
- Xu H.W., Ji X.M., He Z.H., Shi W.P., Zhu G.H., Niu J.K., Li B.S. und Peng X.X.** (2006) Oxalate accumulation and regulation is independent of glycolate oxidase in rice leaves. *Journal of Experimental Botany* 57, 1899-1908.
- Yoder J.I. und Goldsbrough A.P.** (1994) Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Bio/Technology* 12, 263-267.
- Yoshikawa M., Peragine A., Park M.Y. und Poethig R.S.** (2005) A pathway for the biogenesis of transacting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 19, 2164-2175.
- Yu D., Fan B., MacFarlane S.A. und Chen Z.** (2003) Analysis of the involvement of an

inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 206-216.

Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A. und Bartel D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.

Zamore P.D. (2002) Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* 296, 1265-1269.

Zeller F.J. und Friebe B. (1991) Evolution und Züchtung des Saatweizens (*Triticum aestivum* L.). *Biologie in unserer Zeit* 21(3), 248-254.

Zuo J., Niu Q.W. und Chua N.H. (2000) Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant Journal* 24(2), 265-273.

Danksagung

Die Arbeit wurde von April 2003 bis Januar 2008 am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth durchgeführt. Ich bedanke mich insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. em. Erwin Beck für sein Interesse und seine Unterstützung beim Fortgang der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Sebastian Fettig für die Überlassung des Themas. Seine Ideen und stete Diskussionsbereitschaft sowie die konstruktive Arbeitsatmosphäre haben erheblich zur erfolgreichen Durchführung der Doktorarbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Stephan Clemens danke ich für seine Unterstützung insbesondere während des Umbaus des Lehrstuhls, während dessen er immer ein offenes Ohr für anliegende Probleme hatte und deren schnelle Lösung unterstützte.

Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Alessandro Pellegrineschi für seine Hilfsbereitschaft, Anregungen und nicht zuletzt Gastfreundschaft während meines Forschungsaufenthalts am International Maize and Wheat Improvement Center, El Batan, Mexico, bedanken. Rosa Maria Brito (B.sc.) danke ich für das bereitwillige zur Verfügungstellen ihrer tiefgehenden Erfahrungen zur Transformation und Gewebekultur von Weizen.

Des Weiteren danke ich Deepak Pant (M.sc.) und Daniel Eduardo Souza-Canada (M.sc.) für zahlreiche anregende Diskussionen zur Weizentransformation. Besonderen Dank schulde ich Prof. Dr. Christiane Reinbothe, Université Joseph Fourier et CNRS, Grenoble, Frankreich, für ihre kritische und ausführliche Beratung und praktische Unterstützung in vielen Bereichen meiner Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Susanne Salomon (Dipl. biochem.) für die Ausführung der Experimente zur transienten Wirkung konstitutiv exprimierter Suppressoren und die Überlassung ihrer Daten. Ebenso danke ich Ralf Anders (Dipl. biochem.) für die Konstruktion des P1:GFP-Fusionsproteins und des HC-Pro:GFP-Fusionsprotein und nachfolgender Lokalisierungsexperimente des P1:GFP-Fusionsproteins.

Pia Schuster danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Screens der transgenen Pflanzen und anderer molekularbiologischer Laborarbeiten. Niko

Vogt (Dipl. biol.) danke ich für seine Mithilfe als studentische Hilfskraft bei der Konstruktion von Vektoren zur konstitutiven Expression der getrennten Suppressoren P1 und HC-Pro.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Ewald Komor, Dr. Alfons Weig, Dr. Katja Hartig, Dr. Daniel Eisenbarth, Dr. Shih-Long Yan, Dr. Tran Dang Khoa und Susanne Bauer für den wissenschaftlichen Gedankenaustausch bei heiteren und interessanten mittäglichen Tischgesprächen.

Herrn Prof. Dr. Christian Lehner danke ich für Möglichkeit, das GFP-Scope sowie das konfokale Mikroskop zu nutzen.

Prof. Nam Chua, Rockefeller University, New York, USA, danke ich für die Überlassung des Vektors pMDC7 und Dr. Mark Curtis, ETH Zürich, für die Überlassung von transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen zur Estradiol-induzierbaren *glucuronidase*-Expression. Bei beiden möchte ich mich für die hilfreichen Ratschläge bezüglich der Estradiol-Induktion bedanken.

Dr. Matthias Huber, Lehrstuhl für Biotechnologie und Pflanzenphysiologie, Universität Hohenheim, danke ich für Bereitstellung der Plasmide pGFPBAR und pUBINOS.

Kay Scheets, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Oklahoma State University, Stillwater, USA, danke ich für die Zusendung der cDNA der P1/HC-Pro-Sequenzen.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, 16. Januar 2008