

Funktionelle Analyse der
Helper-Component Proteinase (HC-Pro)
aus Zucchini Yellow Mosaic Virus

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Marc W. Füllgrabe
aus Büdingen

Frankfurt am Main 2010

(D 30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Frau Prof. Dr. Starzinski-Powitz

Gutachter: Herr PD Dr. Wassenegger und Herr Prof. Dr. Zimmermann

Datum der Disputation: 11. Juni 2010

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Übersicht der Entwicklung des RNA Silencing	2
1.2	RNA Silencing	4
1.2.1	Klassifizierung von kleinen RNA-Molekülen	4
1.2.2	siRNA-Bildung und Funktion	5
1.2.3	inverted repeat-PTGS (IR-PTGS)	7
1.2.4	sense-PTGS (S-PTGS)	8
1.2.5	miRNA-Mechanismus	9
1.2.6	ta-siRNA-Mechanismus	11
1.2.7	nat-siRNA-Mechanismus	11
1.2.8	RdDM-Mechanismus	12
1.3	Der pflanzliche Abwehrmechanismus und RNA Silencing Suppressor-Proteine	14
1.3.1	Der pflanzliche Abwehrmechanismus	14
1.3.2	RNA Silencing Suppressor-Proteine	14
1.4	Potyviren und die HC-Pro	19
1.4.1	Die Besonderheit der HC-Pro von ZYMV	21
1.5	Aufgabenstellung	22
2.	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Bakterienstämme	25
2.1.2	Pflanzenmaterial	25
2.1.3	Enzyme, Kits, Antikörper, Oligonukleotide	25
2.1.3.1	Enzyme	25
2.1.3.2	Kits	26
2.1.3.3	Antikörper	27
2.1.3.4	Oligonukleotide	27
2.1.4	Vektoren und Expressionsplasmide	29
2.1.5	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	29
2.1.5.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	29
2.1.5.2	Laborgeräte	30
2.1.6	Software	31

2.2	Methoden	31
2.2.1	Klonierungen und allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren	31
2.2.1.1	Präparation kompetenter E. coli-Zellen	31
2.2.1.2	Transformation von Bakterien	32
2.2.1.3	Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen	32
2.2.1.4	Selektion transformierter E. coli-Zellen	32
2.2.1.5	Isolierung von Plasmid-DNA nach alkalischer Methode	33
2.2.1.6	Präparative Plasmidisolierung	34
2.2.1.7	UV-Absorptionsmessungen von Nukleinsäuren	34
2.2.1.8	Restriktionsverdau von DNA	35
2.2.1.9	Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden mit dem Klenow-Fragment	35
2.2.1.10	Dephosphorylierung von linearen DNA-Fragmenten	36
2.2.1.11	Phenol-Chloroform-Extraktion	36
2.2.1.12	Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren	36
2.2.1.13	Agarose-Gelelektrophorese und Dokumentation	37
2.2.1.14	Extraktion von DNA aus einem Agarosegel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit	38
2.2.1.15	Ligation von linearen DNA-Fragmenten	38
2.2.1.16	5'-Endmarkierung von DNA	39
2.2.1.17	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.2.1.18	Zirkuläre Mutagenese und DpnI-Selektion der Mutanten	41
2.2.1.19	Reverse Transkription	42
2.2.1.20	Aufreinigung von PCR-Produkten	43
2.2.1.21	RNA-Extraktion aus Pflanzen	44
2.2.1.22	Nachweis von sRNA-Molekülen über Northern Blot-Analysen	45
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	46
2.2.2.1	Proteinextraktion aus Pflanzen	46
2.2.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford	46
2.2.2.3	Reinigung von HA-Fusionsproteinen	47
2.2.2.4	Gelfiltration des Arabidopsis-Gesamtproteinextrakts und Dialyse	47
2.2.2.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.2.2.6	Coomassie-Färbung	49
2.2.2.7	Silber-Färbung	49

2.2.2.8	Western Blot und Immunnachweis von Proteinen	50
2.2.2.9	Protein Identifizierung über Massenspektroskopie	50
2.2.2.10	Genexpression in <i>E. coli</i> – Herstellung von rekombinanten Proteinen	51
2.2.2.11	Proteinextraktion aus <i>E. coli</i>	52
2.2.2.12	Reinigung eines MBP-Fusionsproteins	52
2.2.2.13	Reinigung von His-Fusionsproteinen	52
2.2.2.14	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	53
2.2.3	Kultur und Transformation von Pflanzen	55
2.2.3.1	Präparation kompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	55
2.2.3.2	Transformation der kompetenten <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	55
2.2.3.3	Selektion transformierter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	56
2.2.3.4	Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA aus <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	56
2.2.3.5	Aussaat und Anzucht von <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen	56
2.2.3.6	Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen	57
2.2.3.7	Anzucht von <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen unter sterilen Bedingungen	57
2.2.4	Konstruktion der Expressionsvektoren	58
2.2.4.1	Herstellung des Vektors pET28b(+):HC-Pro	58
2.2.4.2	Herstellung des Vektors pMAL.c2X:HA-HC-Pro ^{FRNK}	58
2.2.4.3	Herstellung des Vektors pMAL.c2X:HA-HC-Pro ^{FINK}	59
2.2.4.4	Herstellung des Vektors pKB:biNLS-HC-Pro-GFP	59
2.2.4.5	Herstellung des Vektors pMAL.c2X:HA-HC-Pro-GFP	60
2.2.4.6	Mutagenese und HC-Pro Deletionskonstrukte in pMAL.c2X-Vektoren	61
2.2.4.7	Herstellung des Vektors pMAL.c2X:HA-HC-Pro mut C7-mGFP-His	62
2.2.4.8	Klonierung der cDNA des Lipid-Transfer Protein 1 (LP1) aus <i>A. thaliana</i> in den pET32a(+)-Expressionsvektor	63
2.2.4.9	Klonierung der cDNA des RmIC-Cupin Domänen Proteins (QP) aus <i>A. thaliana</i> in den pET32a(+)-Expressionsvektor	63

3.	Ergebnisse	65
3.1	Analyse der RNA Silencing Suppressor-Aktivität von ZYMV HC-Pro ^{FRNK} und HC-Pro ^{FINK}	65
3.2	Der Einfluss von HC-Pro auf die Veränderung der miRNA-Mengen in N. benthamiana-Pflanzen	67
3.3	Analyse der in vitro Bindekapazität von HC-Pro-Proteinen aus Pflanzen	70
3.4	Rekombinante Expression der HC-Pro-Proteine aus ZYMV in Bakterien	74
3.5	Analyse der in vitro Bindekapazität von rekombinanten HC-Pro-Proteinen aus Bakterien	77
3.6	Identifizierung eines Faktors aus Pflanzen zur Erhöhung der Bindungseffizienz der HC-Pro aus ZYMV	82
3.7	Untersuchung der autoproteolytischen Aktivität der HC-Pro aus ZYMV und Identifizierung der katalytischen Domäne	91
3.8	Bestimmung der kritischen Aminosäuren für die Spaltung der HC-Pro aus ZYMV durch eine bakterielle Protease	96
4.	Diskussion	101
4.1	ZYMV HC-Pro ^{FRNK} und HC-Pro ^{FINK} wirken als Suppressoren des RNA Silencing	101
4.2	Die HC-Pro-Proteine haben keinen Einfluss auf die Veränderung der miRNA-Mengen in N. benthamiana	102
4.3	Die Punktmutation in HC-Pro ^{FINK} führt zu einem vollständigen Verlust der in vitro Bindekapazität	104
4.4	Expression der ZYMV HC-Pro in Bakterien	106
4.5	Charakterisierung der sRNA-Bindekapazität der rekombinanten MBP-HA-HC-Pro-Proteine aus Bakterien	108
4.6	Identifizierung eines pflanzlichen Proteins zur Erhöhung der in vitro Bindekapazität von HC-Pro	111
4.7	Analyse der autoproteolytischen Aktivität der HC-Pro aus ZYMV	115
4.8	Spaltung der HC-Pro durch eine bakterielle Protease	117
5.	Zusammenfassung	119
6.	Literatur	121

7.	Anhang	133
7.1	Plasmidkarten	133
7.2	Abkürzungsverzeichnis	137
7.3	Abbildungsverzeichnis	144
7.4	Tabellenverzeichnis	147
8.	Danksagung	149
9.	Lebenslauf	151

1. Einleitung

Eine Infektion mit Pflanzenviren führt in den Wirtspflanzen zu Virus-typischen Symptomen, die von leichten Verfärbungen der Blätter bis hin zu starken Entwicklungsstörungen und zum Absterben der Pflanze reichen. Die Pflanzenviren verursachen weltweit große wirtschaftliche Schäden an Nutzpflanzen, daher sind molekularbiologische Studien von großem Interesse, um Wirt-Pathogen-Interaktionen zu verstehen und geeignete Mittel zur Bekämpfung der Pathogene zu entwickeln bzw. deren Ausbreitung zu verhindern.

Im Laufe der Evolution entwickelten Pflanzen einen natürlichen Abwehrmechanismus, um auf eine Virusinfektion reagieren zu können (Ding & Voinnet, 2007). Dieser als post-transcriptional gene silencing (PTGS) bezeichnete RNA Silencing-Mechanismus dient sowohl der Sequenz-spezifischen Abwehr gegenüber „fremden“ Nukleinsäuren, als auch zur Steuerung der Genexpression und der Entwicklung des Organismus (Ratcliff et al., 1997; Hamilton & Baulcombe, 1999; Sunkar & Zhu, 2004). Ein besonderer Fokus richtet sich auf eine Gruppe von nicht-kodierenden kleinen RNA (sRNA)-Molekülen, die eine charakteristische Länge von 20-24 nt besitzen und das gemeinsame Zwischenprodukt aller RNA Silencing-Mechanismen darstellen. Das Standardmodell des RNA Silencing-Mechanismus umfasst die Bildung von sRNA aus einer doppelsträngigen RNA (dsRNA) mit Hilfe eines Mitgliedes der Dicer-Familie. Die sRNA wird anschließend in einen RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC), der ein Argonaute (AGO)-Protein enthält, eingebaut und leitet diesen als Sequenz-spezifische Komponente zu einer komplementären Zielsequenz. Die Zielsequenz, in der Regel komplementäre messenger RNA (mRNA), wird anschließend entweder gespalten und/oder deren Translation inhibiert. Darüber hinaus kann die Aktivierung zusätzlicher sRNA-Biosynthesewegen beeinträchtigt werden, oder es kann die Rekrutierung von zusätzlichen Faktoren zur DNA-Methylierung erfolgen (Fagard et al., 2000; Mlotshwa et al., 2008).

Eine Weiterentwicklung der unterschiedlichen RNA Silencing-Mechanismen führte zur Ausweitung und Spezialisierung von sRNA-Molekülen, einschließlich der benötigten RISC. Die sRNA-Moleküle bilden das gemeinsame Zwischenprodukt aller RNA Silencing-Mechanismen, die in einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen in Eukaryoten involviert sind.

Im Laufe der Zeit erfolgte eine Anpassung der Pflanzenviren gegenüber dem Abwehrmechanismus der Wirtspflanze durch die Entwicklung von RNA Silencing Suppressor (RSS)-Proteinen. Diese sind häufig an der Symptomausbildung der Wirtspflanze beteiligt und interagieren mit einem oder mehreren Komponenten des pflanzlichen RNA Silencing-Mechanismus wodurch der Sequenz-spezifische Abbau des viralen Genoms bzw. der mRNA erheblich eingeschränkt wird (Burgyan, 2008; Diaz-Pendon & Ding, 2008; Alvarado & Scholthof, 2009).

1.1 Übersicht der Entwicklung des RNA Silencing

Bereits im Jahre 1989 zeigte die Gruppe um Matzke in Versuchen mit Tabakpflanzen, dass das gleichzeitige Einbringen von zwei T-DNA Vektoren, die für unterschiedliche Selektionsmarker kodierten, zu einer Inaktivierung der Gene auf der jeweils anderen T-DNA führte. Beide T-DNA Vektoren besaßen umfangreiche homologe Sequenzen, die auch den Promoter der Nopalin-Synthase umfassten. Sie fanden heraus, dass der Grad der Methylierung des Promoters und die Genexpression einer T-DNA durch das Vorhandensein der homologen T-DNA im Genom beeinflusst wurde (Matzke et al., 1989).

Eine weitere Entdeckung wurde 1990 in Petunien gemacht: Durch die Überexpression der Chalconsynthase (CHS), ein Schlüsselenzym der Anthocyan-Biosynthese, sollte deren Blütenfärbung verstärkt werden. Überraschenderweise besaßen die veränderten Pflanzen anstelle der erwarteten intensiveren Blütenfärbung nicht-pigmentierte oder nur teilweise pigmentierte Blüten. Dieses Phänomen wurde als Cosuppression beschrieben, da sowohl die Expression des Transgens als auch die des endogenen Gens vermindert wurde. In den nicht-pigmentierten Bereichen der Blüten wurde eine stark verminderte mRNA-Konzentration der CHS nachgewiesen (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990).

Weiterführende Entdeckungen machte man im Jahre 1992 im Bereich der Viren-Resistenz, wobei man das Phänomen der pathogen-derived resistance (PDR) nutzte, um resistente Pflanzen herzustellen. In verschiedenen Systemen zeigte man, dass die von Viren stammenden Proteine nicht, wie zunächst angenommen, für die Resistenz benötigt wurden, sondern vielmehr deren RNAs dafür ausreichend waren (de Haan et al., 1992; Lindbo & Dougherty, 1992; van der Vlugt et al., 1992).

Ein Jahr später machte die Gruppe um Lindbo weitere Beobachtungen des Phänomens der Cosuppression in transgenen Tabakpflanzen, die die coat protein (CP) kodierende Sequenz des tobacco etch virus (TEV) als Transgen enthielten. Diese Pflanzen wiesen eine Resistenz

gegenüber dem Virus auf; die TEV-Sequenzen wurden weiterhin transkribiert, aber die korrespondierenden mRNA-Mengen waren vermindert. Lindbo stellte ein erstes Modell des RNA Silencing auf (Abb. 1.1), das den RNA-Abbau im Zytoplasma beschrieb, der auf posttranskriptioneller Ebene erfolgte. Es wurde postuliert, dass die Bildung von komplementärer RNA eine pflanzlich

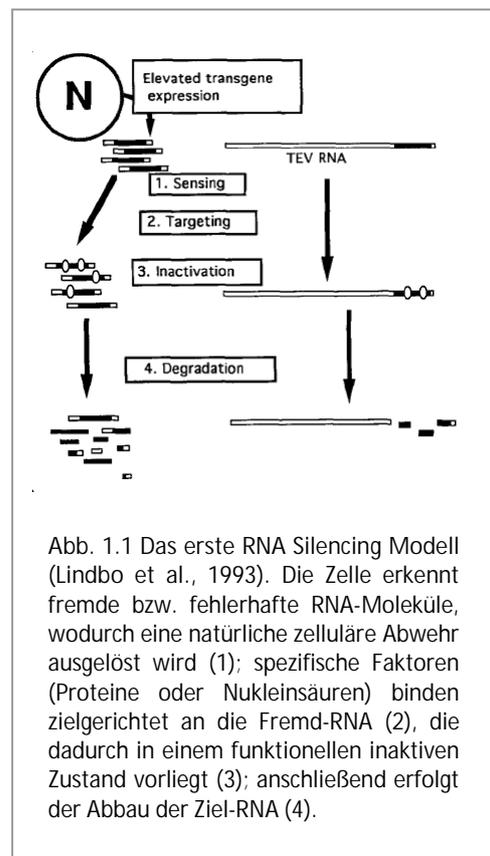


Abb. 1.1 Das erste RNA Silencing Modell (Lindbo et al., 1993). Die Zelle erkennt fremde bzw. fehlerhafte RNA-Moleküle, wodurch eine natürliche zelluläre Abwehr ausgelöst wird (1); spezifische Faktoren (Proteine oder Nukleinsäuren) binden zielgerichtet an die Fremd-RNA (2), die dadurch in einem funktionellen inaktiven Zustand vorliegt (3); anschließend erfolgt der Abbau der Ziel-RNA (4).

kodierte RNA-abhängige RNA-Polymerase (RDR) erfordert, wodurch die RNA des Virus erkannt, gebunden und anschließend abgebaut wird (Lindbo et al., 1993).

Durch Untersuchungen von transgenen Pflanzen, die die Sequenz des bakteriellen (beta)-Glucuronidase (GUS)-Gens enthielten, konnte im Jahre 1996 die Gruppe um English zeigen, dass das Einbringen von potato virus X (PVX)-Derivaten, die ebenfalls GUS-Sequenzen enthielten, eine Ausbreitung der Viren verhindert. Dieses Phänomen des Sequenz-spezifischen Abwehrmechanismus gegenüber Viren wurde später unter der Bezeichnung PTGS bekannt (English et al., 1996).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Pflanze nach einer Virusinfektion nicht nur eine Resistenz gegenüber dem ursprünglichen Virus, sondern auch gegenüber nahen verwandten Viren aufwies. Dieses Phänomen der cross-protection wurde durch Virus-spezifische RNA ausgelöst und beruhte auf dem gleichen Mechanismus wie das PTGS (Ratcliff et al., 1997).

Erst im Jahre 1998 zeigten Waterhouse und seine Mitarbeiter, dass dsRNA-Moleküle der Auslöser des RNA Silencing sind. Hierzu wurden transgene Tabakpflanzen, die entweder sense- oder antisense-Sequenzen des potato virus Y (PVY) enthielten, miteinander gekreuzt. Man erzielte Nachkommen, die vor einer Virusinfektion geschützt waren. Transgene Tabakpflanzen, die nur die sense- oder antisense-Sequenzen des PVY enthielten, wiesen in deutlich weniger Fällen einen Schutz gegenüber dem Virus auf (Waterhouse et al., 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression einer Haarnadel-RNA, die von einem Transgen mit gegenläufigen Sequenzwiederholungen stammte, einen effizienteren Auslöser des RNA Silencing darstellte, als die sense- bzw. antisense-Transgene (Smith et al., 2000).

Auch im Bereich der tierischen Forschung des RNA interference (RNAi) konnte man im gleichen Jahr zeigen, dass dsRNA einen besseren Auslöser darstellt als sense- bzw. antisense-RNA. Fire und seiner Arbeitsgruppe gelang es durch das Einbringen von geringen Mengen an dsRNA-Molekülen in *Caenorhabditis elegans* den Mechanismus des RNAi auszulösen (Fire et al., 1998). Andrew Fire und Craig Mello erhielten im Jahre 2006 für diese Arbeiten den Nobelpreis für Medizin.

Nach der Entdeckung von dsRNA-Molekülen als Auslöser des RNA Silencing sowohl in Nematoden (Fire et al., 1998), in Pflanzen (Waterhouse et al., 1998), in Protozoen (Ngo et al., 1998) als auch in Insekten (Kennerdell & Carthew, 1998), machten Hamilton und Baulcombe im darauf folgenden Jahr eine weitere bemerkenswerte Entdeckung. Sie zeigten, dass sRNA-Moleküle aktiv am PTGS-Prozess in Pflanzen beteiligt sind. Hierzu wurden die sRNAs in unterschiedlichen Systemen des PTGS und des virus-induced gene silencing (VIGS) analysiert. In allen Systemen konnten Sequenz-spezifische 21-25 nt sRNA-Moleküle nachgewiesen werden, deren Menge mit dem Grad des ausgelösten RNA Silencing im Zusammenhang stand (Hamilton & Baulcombe, 1999).

1.2 RNA Silencing

Das RNA Silencing stellt einen weit verbreiteten Mechanismus der Genregulation in Eukaryoten dar und fasst die Erscheinungen des PTGS in Pflanzen, des RNAi in Tieren und des Quelling in Pilzen und Algen unter einem gemeinsamen Begriff zusammen (Hamilton et al., 2002). Dieser Mechanismus dient neben der Kontrolle von mobilen Elementen wie Transposons und Transgenen, auch zur Steuerung der Entwicklung des Organismus mittels micro RNA (miRNA)-Molekülen (siehe Abschnitt 1.2.5) sowie der natürlichen Verteidigung gegen Viren.

1.2.1 Klassifizierung von kleinen RNA-Molekülen

Im Laufe der Jahre entdeckte man eine Vielzahl an sRNA-Klassen, die unterschiedliche Funktionen besitzen. Es gibt zwei Hauptklassen von kleinen RNA-Molekülen – die short-interfering RNAs (siRNAs) und die micro RNAs (miRNAs), welche sich in der Biosynthese, aber nicht in der Wirkungsweise unterscheiden.

Die siRNAs entstehen aus langen dsRNA-Molekülen, die überwiegend bei der Replikation von Viren, aber auch durch Transposons, Retroelemente, endogene Sequenzwiederholungen oder durch Transgene in der Zelle vorkommen.

Die dsRNA wird durch Enzyme des RNaseIII-Typs mit der Bezeichnung Dicer (DCR) bzw. für Pflanzen Dicer-like (DCL) in besagte kurze RNA-Moleküle von überwiegend 21 nt (tierische Systeme) und 21-25 nt (Pflanzen) Länge gespalten. Ein Strang der siRNAs wird anschließend in den RISC eingebaut und leitet diesen zu komplementären RNAs, um dort als Sequenz-spezifische Komponente deren Spaltung bzw. im Falle von mRNA die Blockierung der Translation herbeizuführen. Die Bildung eines RISC wurde ursprünglich in *Drosophila melanogaster*-Zellen entdeckt (Hammond et al., 2000).

Die miRNAs zählen zur Klasse der endogenen ~ 20-25 nt sRNAs und regulieren eine Vielzahl von Wachstums- und Entwicklungsprozessen in Eukaryoten. Diese werden von MIRNA-Genen kodiert, deren Transkription die Aktivität der RNA-Polymerase II erfordert. Die miRNA-Vorläufer werden durch das Enzym DCL1 in reife miRNA-Moleküle überführt. Einer der beiden miRNA-Stränge wird in den RISC eingelagert und führt, ähnlich wie bei den siRNAs, durch komplementäre Basenpaarung zur Spaltung der Ziel-RNA oder zur Blockierung deren Translation (Bartel, 2004; Du & Zamore, 2005).

Neben diesen beiden Hauptklassen von sRNAs gibt es noch weitere sRNA-Spezies (Tab. 1.1): die spezifischen trans-acting siRNAs (ta-siRNAs), die aus den TAS-Genen hervorgehen (Vazquez et al., 2004); die natural-antisense siRNAs (nat-siRNAs), ausgehend von Bereichen mit bidirektionalen Transkripten von sich überlappenden Genabschnitten (Borsani et al., 2005; Katiyar-Agarwal et al., 2006) und die 24 nt siRNAs, die im RNA-directed DNA methylation (RdDM)-Mechanismus involviert sind (Chan et al., 2005). In den nachfolgenden Abschnitten sollen die einzelnen Mechanismen und deren Komponenten genauer beschrieben werden.

Klasse	Organismus	Länge (nt)	Proteine	Herkunft	Funktion
miRNA	Pflanzen, Algen, Tiere, Protisten	20-25	Drosha (in Tieren) und DCR/DCL	Spaltung der Sekundärstruktur von PolIII-Transkripten (pri-miRNA)	PTGS und transcriptional gene silencing (TGS)
exogene siRNA	Pflanzen, Tiere, Pilze, Protisten	21 & 24 ~ 21	DCR/DCL	Spaltung von dsRNA oder RNA-Sekundärstrukturen von viraler oder exogener dsRNA, Transgene	PTGS; Virenabwehr; TGS; Bildung und Erhaltung von Heterochromatin
endogene siRNA	Pflanzen, Algen, Tiere, Pilze, Protisten	21 & 24 ~ 21	DCR/DCL	bidirektionale Transkripte, antisense-Pseudogen-Transkripte, RNA-Sekundärstrukturen, Transposons	PTGS; TGS; Bildung und Erhaltung von Heterochromatin
ta-siRNA	Pflanzen	21	DCL4	miRNA-gespaltene RNAs aus TAS-Transkripten	PTGS
nat-siRNA	Pflanzen	22 24 21	DCL1 DCL2 DCL1 & DCL2	Spaltung von sense-/antisense-Transkripten produzierten dsRNA	posttranskriptionelle Regulation von Genen zur Pathogenabwehr und Stressantwort

Tab. 1.1 Übersicht der kleinen RNA-Moleküle.

1.2.2 siRNA-Bildung und Funktion

siRNAs entstehen aus dsRNA, welche überwiegend bei der Replikation von Viren, aber auch durch Transposons, Retroelemente, endogenen Sequenzwiederholungen oder Transgene in der Zelle vorkommen. Durch in vitro Experimente mit *Drosophila* Embryo-Extrakten konnte man zeigen, dass die Typ-III-Ribonukleasen DCRs für die Erzeugung der siRNAs aus dsRNA-Molekülen notwendig sind (Bernstein et al., 2001). DCR-Proteine stellen große ~ 200 kDa Proteine dar, die eine DExD und –C ATPase/Helikase Domäne, eine domain of unknown function 283 (DUF283), eine PAZ Domäne, zwei katalytische RNaseIII-Domänen und eine dsRNA-Bindedomäne (dsRBD) besitzen (Schauer et al., 2002; Finnegan et al., 2003; Xie et al., 2004; Macrae et al., 2006; Margis et al., 2006). Die Genome von *Schizosaccharomyces pombe*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Caenorhabditis elegans* und von Vertebraten kodieren für jeweils ein DCR-Protein, im Gegensatz dazu sind in *Drosophila melanogaster*, *Tetrahymena thermophila* und *Neurospora crassa* zwei DCRs vorhanden. Dem DCR1-Protein von *C. reinhardtii* fehlt die PAZ-Domäne und die dsRBD; in *T. thermophila* ist ausserdem die DUF283-Domäne nicht vorhanden (Cerutti & Casas-Mollano, 2006). Die Besonderheit von pflanzlichen DCR-Proteinen ist, dass alle sieben Domänen in einem DCL-Protein vereint sind. Durch die Aktivität von DCRs/DCLs werden aus langen dsRNA-Molekülen siRNA-Moleküle mit typischen Strukturen gebildet, die eine spezifische Länge von 21-24 nt besitzen und zusätzlich durch zwei ungepaarte Basenüberhänge am 3'-Ende ausgezeichnet sind. Darüber hinaus besitzen die siRNA-Moleküle ein 5' Monophosphat und eine 3' OH-Gruppe (Elbashir et al., 2001; Khvorova et al., 2003).

Das Arabidopsis-Genom kodiert für vier DCL-Proteine (DCL1-4), bei denen DCL1, DCL3 und DCL4 eine doppelte dsRBD aufweisen (Margis et al., 2006). In Organismen die nur ein DCR-Protein besitzen

(*C. elegans*; DCR-1) können durch Interaktionen mit spezifischen dsRNA-Bindeproteinen bzw. Kofaktoren (z.B. R2D2 in *D. melanogaster*) mehrere sRNA-Spezies produziert werden (Duchaine et al., 2006).

In *Arabidopsis* sind drei DCLs für die Bildung von siRNA-Molekülen aus endogenen oder exogenen Vorläufermolekülen vorhanden. Mittels DCL3 werden hauptsächlich 24 nt siRNAs gebildet, die aus Retroelementen hervorgehen. In *dcl3*-Mutanten kann die Aktivität von DCL3 durch DCL2 und DCL4 teilweise übernommen werden, wodurch aber nur 21-22 und keine 24 nt siRNA-Moleküle produziert werden (Gascioli et al., 2005; Kasschau et al., 2007). DCL3 ist nicht in der Produktion von miRNAs und ta-siRNA involviert und wird für die Bildung von Virus-spezifischen siRNAs nicht benötigt (Xie et al., 2004).

Die vollständige Funktion von DCL2 wurde bisher nicht aufgeklärt; DCL2 wird jedoch für die Produktion von 22 nt siRNAs benötigt, kann bei der Biosynthese von 24 nt siRNAs eine Rolle spielen und ist bei der Bildung von nat-siRNAs sowie bei der Abwehr gegen den turnip crinkle virus (TCV) involviert (Xie et al., 2004; Borsani et al., 2005).

DCL4 wird sowohl zur Bildung von 21 nt ta-siRNAs (Gascioli et al., 2005) als auch zur Bildung einiger viraler siRNAs (v-siRNA) benötigt, die den RISC programmieren und damit die Virenabwehr der Pflanze aktivieren (Dunoyer et al., 2005).

Bestimmte RSS von Pflanzenviren sind in der Lage, die DCL-Aktivität zu blockieren. Dies ist bei dem CP von TCV der Fall, welches DCL4 blockiert und zur verstärkten Bildung von DCL2-spezifischen 22 nt siRNAs führt. Dieses Beispiel zeigt, dass die Blockierung von einem DCL-Protein durch die Aktivität von anderen Mitgliedern der DCL-Familie kompensiert werden kann (Deleris et al., 2006).

Nach der Freisetzung der sRNA-Moleküle mit Hilfe eines DCL-Proteins werden diese chemisch modifiziert. Die Methyltransferase hua enhancer 1 (HEN1) katalysiert die Methylierung freier OH-Enden und schützt so die sRNAs vor der Uridylierung und deren Abbau (Yu et al., 2005).

Ein Strang der siRNA- bzw. miRNA-Moleküle (guide-Strang bzw. miR-Strang) wird anschließend in den RISC eingebaut. Dieser besitzt unterschiedliche katalytische Funktionen, zu denen die Spaltung der entsprechenden mRNA oder die Blockierung der Translation zählen. Der RISC ist ein Multiproteinkomplex mit unterschiedlichen Komponenten, zu denen auch die AGO-Proteine gehören, die essentiell für die „Slicer“-Aktivität sind. Allerdings konnte in Pflanzen bisher nur ein Komplex bestehend aus einer sRNA und einem AGO-Protein nachgewiesen werden.

Die Klassifizierung der AGO-Proteine erfolgt in drei Gruppen: 1) AGO-Proteine mit Ähnlichkeiten zu AGO1 aus *Arabidopsis*; 2) P-element induced wimpy testis (PIWI)-artige Proteine mit Homologie zu PIWI aus *D. melanogaster* und 3) die Gruppe der *C. elegans*-spezifischen AGO-Proteine (Yigit et al., 2006). Man findet AGO-Proteine in Bakterien, Archaeen und in Eukaryoten, wobei die Anzahl der AGO-Gene innerhalb der Arten sehr stark variiert. Während in *S. pombe* nur ein AGO-Protein

vorkommt, findet man in *C. elegans* 26 AGO-Gene. Im Vergleich dazu besitzen *D. melanogaster* fünf, der Mensch acht und *Arabidopsis* zehn AGO-Proteine. Der Name der AGO-Proteine leitet sich von ago1-Mutanten aus *Arabidopsis* ab, die einen starken Phänotyp aufweisen und dessen Erscheinung der eines Tintenfischs ähnelt (Bohmert et al., 1998).

Alle zehn AGO-Proteine in *Arabidopsis* besitzen ein Arg-Arg-Arg-His-Motiv, welches für die Slicer-Aktivität erforderlich ist. Sowohl für AGO1 als auch für AGO4 wurde diese Aktivität nachgewiesen (Baumberger & Baulcombe, 2005). Das AGO1-Protein nimmt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Pflanze und bei der miRNA-Biosynthese ein und ist eine Komponente des RISC. Der starke Phänotyp der ago1-Mutanten in *Arabidopsis* ist im Gegensatz zu den dcl1, hen1, hyl1 und hst-Mutanten nicht auf eine Veränderung der miRNA-Mengen in den Pflanzen zurückzuführen. Die miRNAs werden weiterhin gebildet, aber durch das Fehlen von AGO1 kann kein aktiver Effektor-Komplex gebildet werden, dadurch wird die Spaltung der mRNA verhindert und führt zu deren Anhäufung (Mallory & Vaucheret, 2006).

AGO1 bevorzugt hauptsächlich sRNA-Moleküle als Substrat, die ein 5'-Uridin besitzen; dies trifft auf fast alle miRNAs zu und macht somit AGO1 zu dem wichtigsten AGO-Protein im miRNA-Mechanismus (Takeda et al., 2008). Die Expression von AGO1 wird über eine negative Rückkopplungsschleife mittels der miR168 reguliert (Vaucheret et al., 2004).

AGO4 nimmt eine wichtige Rolle im TGS ein und ist zusammen mit 24 nt siRNAs, RNA-Polymerase IV und V (PolIV und PolV), RDR2 und DCL3 im Zellkern zu finden (Li et al., 2006). Im Gegensatz zu AGO1 bindet AGO4 vorwiegend siRNAs mit einem 5'-Adenosin (Mi et al., 2008).

Neben den vier DCL- und den zehn AGO-Proteinen in Pflanzen existieren zusätzlich zwei weitere Genfamilien im *Arabidopsis* Genom, die für das RNA Silencing unentbehrlich sind. Die RDR-Genfamilie umfasst sechs Mitglieder (Wassenegger & Krczal, 2006) sowie die dsRBD-Genfamilie, welche fünf Mitglieder in *Arabidopsis* aufweist.

In den folgenden Abschnitten soll auf die parallel vorhandenen Gen Silencing-Mechanismen eingegangen werden, die als miRNA-, trans-acting siRNA- (ta-siRNA), natural-antisense siRNA- (nat-siRNA) und RdDM-Mechanismus klassifiziert werden.

1.2.3 inverted repeat-PTGS (IR-PTGS)

Das gleichzeitige Einbringen von sense- und antisense-Transgenen bzw. eines Transgens mit einer gegenläufigen Sequenzwiederholung (IR-Transgen) kann die Expression bestimmter Gene blockieren. Die Verwendung eines IR-Transgens führt zur direkten Produktion von langen dsRNA-Molekülen. Für diesen Prozess wird keine RDR benötigt (Waterhouse et al., 1998; Chuang & Meyerowitz, 2000).

In dem Mechanismus des IR-PTGS sind zwei Klassen von siRNA-Molekülen involviert: 21 nt siRNAs, die die Spaltung von komplementären mRNAs verursachen und 24 nt siRNAs zur Modifikation des

Chromatins (Hamilton et al., 2002; Zilberman et al., 2003) (Abb. 1.2). Man geht davon aus, dass beim IR-PTGS unterschiedliche DCL-Proteine und Ribonukleoprotein-Komplexe aktiv sind, wobei DCL4 eine bedeutende Rolle bei der Produktion von 21 nt siRNAs einnimmt (Dunoyer et al., 2005).

1.2.4 sense-PTGS (S-PTGS)

Die wichtigste Funktion des S-PTGS ist die Abwehr gegenüber Viren. Studien zeigen, dass es zu einer Anhäufung von Virus-spezifischen 21 nt siRNAs in infizierten Zellen kommt und Pflanzen mit eingeschränkter RDR6-Aktivität eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Viren aufweisen können (Szittyta et al., 2002; Muangsan et al., 2004).

Der Mechanismus des S-PTGS benötigt die Aktivität der pflanzlichen RDR6 (Abb. 1.2). Diese erkennt fehlerhafte mRNA-Moleküle (aberrant RNA, abRNA), etwa von Transgenen abstammende, die beispielsweise keine 5'-Kappe oder keinen Poly(A)-Schwanz besitzen und nutzt diese als Vorlage zur Bildung von dsRNA. Diese aktiviert das S-PTGS und führt zum Abbau der transgenen mRNAs (Gazzani et al., 2004) (Abb. 1.2).

In diesem Mechanismus werden neben DCL4, das die dsRNAs in 21 nt siRNA überführt und der RDR6 weitere Komponenten benötigt: das suppressor of gene silencing 3 (SGS3)-Protein, das zusammen mit der RDR6 im Zytoplasma lokalisiert ist und die abRNA vor dem Abbau durch die exoribonuclease 4 (XRN4) schützt (Kumakura et al., 2009); des Weiteren die Exonuklease werner syndrome-like exonuclease (WEX), eine 3'-5'-Exonuklease mit unbekannter Funktion (Glazov et al., 2003); die sRNA-spezifische Methyltransferase HEN1 zur Methylierung von sRNAs und damit zu deren Schutz vor der Uridylierung bzw. Abbau (Li et al., 2005) und eine RNA-Helikase silencing defective 3 (SDE3) zur Aufhebung von RNA-Sekundärstrukturen der abRNAs (Dalmay et al., 2001).

Eine wichtige Funktion in diesem Mechanismus besitzt auch AGO1. In hypomorphen ago1-Mutanten kommt es zur Störung des PTGS (Morel et al., 2002).

Die RDR6 und weitere Komponenten des S-PTGS spielen auch bei der Transitivität bzw. bei dem Erhaltungsschritt des PTGS eine entscheidende Rolle (Abb. 1.2). Unter dem Begriff Transitivität versteht man die Produktion von sekundären siRNAs. Die gebildeten sekundären siRNAs sind gegen Sequenzbereiche des Transkripts gerichtet, die außerhalb der Zielsequenz von den primären siRNAs liegen. In Pflanzen erfolgt dieser Übergang von primären zu sekundären siRNAs sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung ausgehend von der ursprünglichen Sequenz (Moissiard et al., 2007).

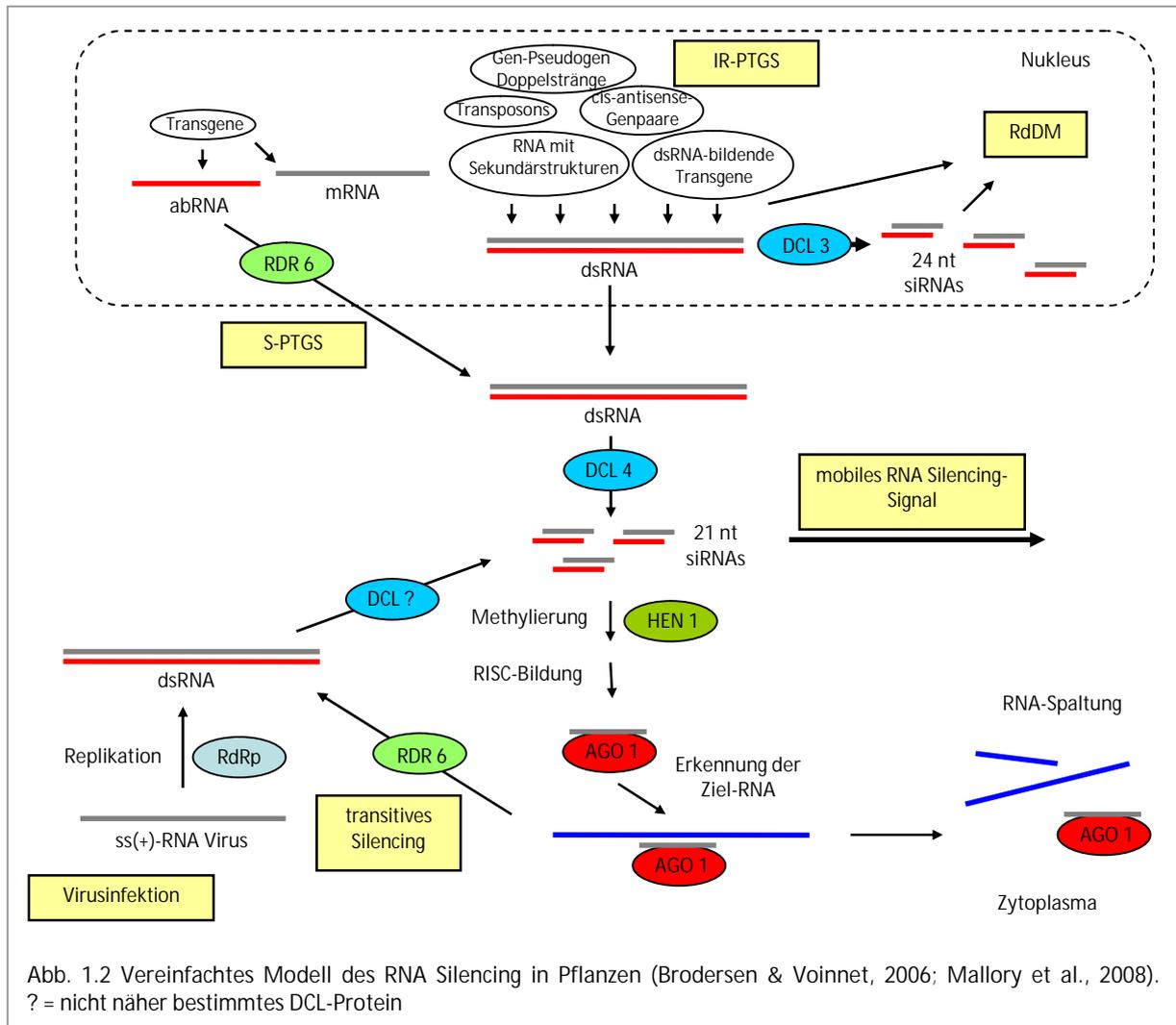


Abb. 1.2 Vereinfachtes Modell des RNA Silencing in Pflanzen (Brodersen & Voinnet, 2006; Mallory et al., 2008). ? = nicht näher bestimmtes DCL-Protein

1.2.5 miRNA-Mechanismus

Die erste miRNA lin-4 wurde 1993 in *C. elegans* entdeckt (Lee et al., 2003). Zu den biologischen Funktionen der miRNAs zählt u. a. die Regulation der Entwicklung von komplexen Organismen. Dies erfordert die räumliche und zeitliche Kontrolle der Genexpression und einen schnellen Wechsel der molekularen Abläufe während den verschiedenen Entwicklungsstadien des Organismus. Zusätzlich zur Steuerung der Entwicklungsprozesse über die Expression von Transkriptionsfaktoren werden durch den miRNA-Mechanismus (Abb. 1.3 A) die Aufgaben der Stressantwort und der Selbstregulation der Expression von DCL1 und AGO1 in Pflanzen übernommen (Jones-Rhoades et al., 2006). Die Regulation von DCL1 erfolgt dabei über die miR162 und die miR838 (Xie et al., 2003; Vaucheret et al., 2004), die Regulation von AGO1 mit Hilfe der miR168. Eine Mutation der miR168-Bindungsstelle verursacht eine Anhäufung von AGO1 mRNAs und einen starken Phänotyp (Vaucheret et al., 2004; Vaucheret, 2006). Durch die Spaltung der entsprechenden mRNAs von DCL1 und AGO1 wird eine normale pflanzliche Entwicklung gewährleistet.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den miRNA- und siRNA-Molekülen besteht in deren

Biosynthesewegen. Während siRNAs aus langen dsRNA-Molekülen von überwiegend exogener Quelle gebildet werden, stammen miRNAs von einzelsträngigen RNA-Molekülen, die eine Haarnadelschleife mit Basenfehlpaarungen als Sekundärstruktur ausbilden. Die miRNAs sind innerhalb verwandter Organismen stark konserviert und regulieren im Gegensatz zu den siRNAs nicht die Gene, von denen sie stammen. Dies wird u. a. durch Basenfehlpaarungen im miRNA/miRNA*-Doppelstrang verhindert.

Die für miRNAs kodierenden MIR-Gene befinden sich im Genom entweder in nicht-kodierenden Bereichen oder in Introns, deren Transkription durch die RNA-Polymerase II erfolgt. Die dabei entstehenden Primärtranskripte (pri-miRNAs) bilden unvollständig komplementäre Haarnadelschleifen aus, die in Arabidopsis durch DCL1 mit Hilfe der RNA-Bindeproteine *dawdle* (DDL) und *hyponastic leaves 1* (HYL1) sowie das Zinkfinger-Protein *serrate* (SE) in kürzere pre-miRNAs (80-190 nt) gespalten werden. In einem zweiten Prozessierungsschritt, der durch DCL1 und HYL1 erfolgt, wird ein „reifer“ miRNA/miRNA*-Doppelstrang aus der pre-miRNA gebildet. Die Reifung der miRNAs erfolgt im Zellkern (Reinhart et al., 2002; Papp et al., 2003; Kurihara & Watanabe, 2004; Vazquez et al., 2004; Xie et al., 2004; Yu et al., 2008).

Dieser Prozessierungsschritt unterscheidet sich stark von dem in Säugetieren, da dort die Freisetzung des miRNA/miRNA*-Doppelstranges in zwei Schritten durch unterschiedliche Proteine erfolgt. Drosha spaltet zunächst mit Hilfe des Kofaktors *DiGeorge syndrome chromosomal region 8* (DGCR8)/Pasha die pri-miRNAs und setzt somit die pre-miRNAs frei. Diese werden in das Zytoplasma exportiert und dort von Dicer erneut gespalten, woraus der reife miRNA/miRNA*-Doppelstrang hervorgeht (Lee et al., 2003).

DCL1 ist ein hochgradig spezialisiertes Protein, das vorwiegend für die miRNA-Bildung in Pflanzen benötigt wird, aber nicht an der Produktion von anderen sRNA-Spezies beteiligt ist. Die Bedeutsamkeit von DCL1 im miRNA-Mechanismus wird anhand von Arabidopsis-Mutanten deutlich. In *dcl1*-Mutanten kommt es zu einem starken Phänotyp und zu Entwicklungsstörungen, diese korrelieren mit einer verminderten Anzahl an reifen miRNAs; *hyl1*-Mutanten verursachen dagegen nur schwache Phänotypen und haben eine geringe Auswirkung auf die Bildung von reifen miRNAs (Mallory & Vaucheret, 2006). Auch *dcl2/dcl3/dcl4*-Dreifachmutanten zeigen, dass DCL1 das vorherrschende Protein im miRNA-Mechanismus ist und keine weiteren DCL-Proteine benötigt werden (Henderson et al., 2006).

Nach der Spaltung durch DCL1 erfolgt eine Methylierung des miRNA-Doppelstranges durch HEN1, das wie für siRNAs bereits beschrieben eine Methylgruppe auf die 2-Nukleotid 3'-Überhänge des freigesetzten miRNA-Doppelstranges überträgt. In Pflanzen werden sowohl miRNAs als auch siRNAs durch HEN1 methyliert und dadurch vor der Polyuridylierung und Abbau geschützt (Li et al., 2005; Yang et al., 2006). Entsprechende homologe Proteine wurden auch in Maus und Drosophila

(mHEN1 und Pimet) identifiziert, die für die Methylierung der in den Keimzellen vorkommenden Piwi-interacting RNAs (piRNAs) benötigt werden (Kirino & Mourelatos, 2007; Saito et al., 2007).

Der miRNA/miRNA*-Doppelstrang wird mit Hilfe des Drosophila Exportin-5 Orthologs hasty (HST) durch die Kernporen in der Kernmembran in das Zytoplasma exportiert. Im Zytoplasma wird der miR-Strang des miRNA-Doppelstranges auf ein AGO1-Protein geladen und dirigiert diesen zu komplementären Bereichen von RNA-Molekülen, um die Transkripte Sequenz-spezifisch zu spalten (slicing Aktivität) oder deren Translation zu verhindern. Der verbleibende instabile miR*-Strang ist nicht durch ein AGO-Protein geschützt und wird abgebaut. Im Gegensatz zu den Pflanzen ist die Blockierung der Translation der dominierende Mechanismus in Tieren und Insekten (Mallory & Vaucheret, 2006).

1.2.6 ta-siRNA-Mechanismus

Eine weitere Art die pflanzliche Entwicklung zu beeinflussen erfordert zwei Gruppen von miRNAs (miR173 und miR390) zur Steuerung des ta-siRNA-Mechanismus (Abb. 1.3 B). Hierbei binden diese miRNA-Moleküle an lange einzelsträngige ta-siRNA-Vorläufer, die aus der Transkription von TAS-Genen hervorgehen und spalten diese an einer Sequenz-spezifischen Stelle. In Arabidopsis sind vier TAS-Genfamilien bekannt (TAS1-TAS4). Die TAS-Transkripte kodieren im Gegensatz zu anderen miRNA-Zielsequenzen nicht für Proteine. TAS1 und TAS2 RNAs bilden die Zielsequenzen für die miR173-, TAS3 für die miR390- und TAS4 für miR828-vermittelte Spaltung (Peragine et al., 2004; Vazquez et al., 2004; Allen et al., 2005; Yoshikawa et al., 2005; Axtell et al., 2006; Fahlgren et al., 2006; Rajagopalan et al., 2006; Montgomery et al., 2008). Die Spaltung dieser Transkripte erfolgt durch die „Slicer“-Aktivität von AGO1 oder AGO7. Die dabei entstehenden RNA-Moleküle dienen als Vorlage für die dsRNA-Synthese durch die RDR6 und SGS3. Ausgehend von der dsRNA werden im Anschluss, durch die Aktivität von DCL4, 21 nt ta-siRNAs produziert (Peragine et al., 2004; Vazquez et al., 2004). Die ta-siRNAs binden zielgerichtet an mRNA-Transkripte, um diese zu spalten (Howell et al., 2007). Mutationen von RDR6, SGS3, SDE5, DCL4, DRB4 und AGO7 in Arabidopsis führen zu einer Störung des ta-siRNA-Mechanismus, die mit einer Verminderung der ta-siRNA Menge einhergeht.

1.2.7 nat-siRNA-Mechanismus

Die nat-siRNAs werden aus zwei konvergenten und teilweise überlagernden Transkripten produziert (Abb. 1.3 C), die von einem Genpaar auf entgegengesetzten DNA-Strängen (sog. cis-antisense-Gene) stammen. Ein Beispiel ist das SRO5-Transkript, das teilweise mit dem P5CDH Gen in antisense-Orientierung überlagert. Der dabei entstehende dsRNA-Bereich wird von DCL2 als Substrat erkannt und in eine 24 nt lange nat-siRNA gespalten. Die bisher charakterisierten nat-siRNAs werden

bei abiotischem oder biotischem Stress gebildet und binden zielgerichtet an eines der cis-antisense-Genpaare, das zu deren Spaltung durch ein bislang unbekanntes AGO-Protein führt (Borsani et al., 2005; Katiyar-Agarwal et al., 2006). Zusätzlich zu DCL2 werden für die nat-siRNA vermittelte Spaltung und zur Bildung von sekundären 21 nt siRNAs die RDR6, der SGS3, DCL1 und HEN1 benötigt.

1.2.8 RdDM-Mechanismus

Der RdDM-Mechanismus erfordert neben den konservierten DNA Methyltransferasen und den Komponenten des RNA Silencing – DCL3 und AGO4, die Aktivität der beiden mit der RNA Polymerase II-verwandten Pflanzen-spezifischen RNA Polymerasen PolIV und PolV sowie die DRD1- und defective in meristem silencing 3 (DMS3)-Proteine (Abb. 1.3 D). Die beiden RNA Polymerasen PolIV und PolV unterscheiden sich in deren großen Untereinheit (NRPD1 bzw. NRPE1) und besitzen verschiedene Funktionen im RdDM-Mechanismus. Die Pol IV wird für die Bildung und Vermehrung der siRNAs als Auslöser des RdDM benötigt, die Pol V ermöglicht dagegen die de novo Methylierung der siRNA-Zielsequenzen (Pikaard et al., 2008; Matzke et al., 2009).

Nach der Bildung von dsRNA-Molekülen, die von überlappenden Transkripten bzw. der Transkription von gegenläufigen Sequenzwiederholungen durch die Aktivität der Pol II stammen, werden diese durch DCL3 in 24 nt siRNA überführt und durch HEN1 methyliert. Ein Strang wird auf AGO4 geladen und über eine Interaktion von AGO4 mit der großen Untereinheit NRPE1 der PolV erfolgt durch die Rekrutierung von DRM2, DRD1 und DMS3 die de novo DNA-Methylierung. Zur Bildung neuer siRNAs erfolgt die Transkription der methylierten DNA durch die PolIV, dabei wird eine abRNA gebildet, die durch die RDR2 in eine dsRNA überführt wird. Die dsRNA wird anschließend über DCL3 in 24 nt siRNAs gespalten, welche über HEN1 methyliert werden und wiederum die DNA-Methylierung über AGO4 und PolV vermitteln (Matzke et al., 2009).

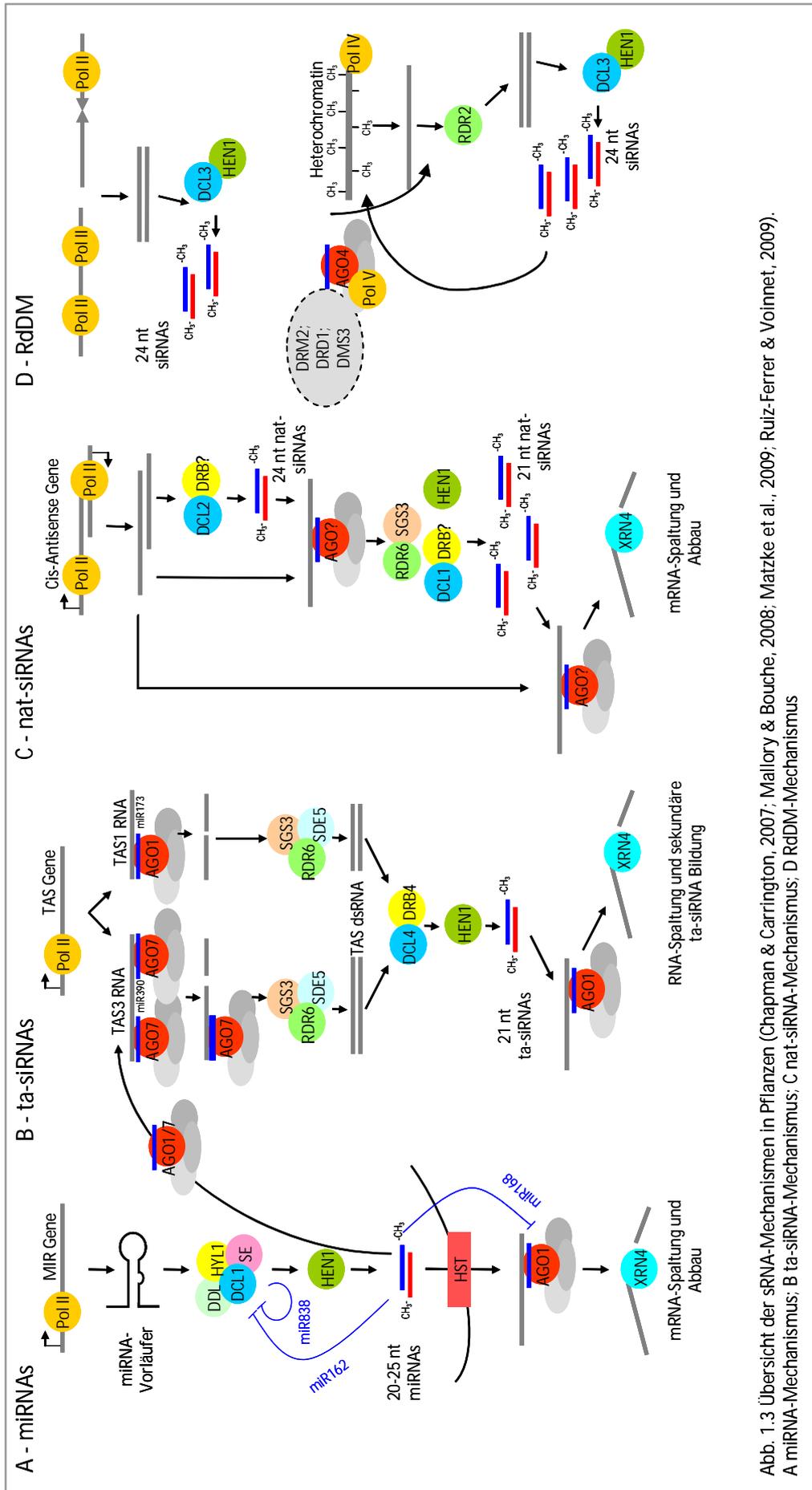


Abb. 1.3 Übersicht der siRNA-Mechanismen in Pflanzen (Chapman & Carrington, 2007; Mallory & Bouche, 2008; Matzke et al., 2009; Ruiz-Ferrer & Voynet, 2009). A miRNA-Mechanismus; B ta-siRNA-Mechanismus; C nat-siRNA-Mechanismus; D RdDM-Mechanismus

1.3 Der pflanzliche Abwehrmechanismus und RNA Silencing Suppressor-Proteine

1.3.1 Der pflanzliche Abwehrmechanismus

Die wichtigste Funktion des RNA Silencing ist die Abwehr gegenüber Viren und stellt einen Schlüsselmechanismus zur Erkennung und Inaktivierung eindringender Nukleinsäure-Moleküle in Pflanzen dar. Eine entscheidende Rolle bei der Virenabwehr spielt dsRNA, die als Zwischenprodukt bei der Replikation von Viren gebildet wird (Abb. 1.2). Diese wird vom pflanzlichen Abwehrmechanismus erkannt und ist der Auslöser des RNA Silencing. Ein Dicer-Protein erkennt dsRNA und bildet Virus-spezifische siRNA-Moleküle, die zu einem Sequenz-spezifischen Abbau des Virus-Genoms führen (Hamilton & Baulcombe, 1999). Je nach Herkunft unterscheidet man dabei drei Klassen von viralen siRNA-Molekülen:

a) primäre siRNAs werden aus dsRNA-Molekülen gebildet, die während der Replikation des viralen Genoms entstehen; b) sekundäre siRNAs stammen von dsRNA-Molekülen, die aus aberranten Derivaten des viralen einzelsträngigen RNA (ssRNA)-Genoms über die pflanzliche RDR gebildet werden (Gazzani et al., 2004); c) strukturelle siRNAs, die direkt aus komplex strukturierten Regionen des viralen Genoms entstehen (Mlotshwa et al., 2008).

Die siRNA-Moleküle werden anschließend entwunden und in einen RISC eingelagert, um den Sequenz-spezifischen Abbau Viren-spezifischer RNA-Moleküle zu vermitteln.

In Pflanzen kann sich das RNA Silencing über RNA-Signale in andere Zellen bzw. Pflanzenteile ausdehnen und verhindert dadurch die Ausbreitung der Viren. Die Verbreitung des Silencing-Signals über kürzere Strecken erfolgt über die Plasmodesmata und beschränkt sich auf 10-15 Zellen. Dabei werden die durch DCL4 gebildeten 21 nt siRNAs sowie AGO1 benötigt. Die Ausbreitung des Silencing-Signals in weiter entfernte Pflanzenteile erfolgt dagegen über das Phloem. Die Signalmoleküle dafür wurden bisher nicht identifiziert; es gibt aber Hinweise darauf, dass siRNAs oder längere dsRNA-Vorläufer dabei involviert sind (Himber et al., 2003; Voinnet, 2005; Dunoyer & Voinnet, 2008; Kalantidis et al., 2008)

1.3.2 RNA Silencing Suppressor Proteine

Das RNA Silencing ist unentbehrlich bei der Abwehr von Viren in Pflanzen (Voinnet, 2001), Insekten (Li et al., 2002) und anderen Eukaryoten (Gitlin & Andino, 2003). Um dem Wirts-spezifischen Abwehrmechanismus entgegenzuwirken, entwickelten pflanzliche Viren im Laufe der Evolution RSS-Proteine, die in der Lage sind mit unterschiedlichen Komponenten des pflanzlichen RNA Silencing-Mechanismus in Wechselwirkung zu treten, um diesen zu blockieren (Voinnet et al., 1999; Li & Ding, 2001; Levy et al., 2008). Die Entdeckung des ersten RSS erfolgte bereits im Jahre 1998 – die helper-component proteinase (HC-Pro) des TEV. Das Protein ist in der Lage das PTGS und das VIGS zu blockieren. Dies zeigte zum einen, dass das RNA Silencing ein natürlicher

Abwehrmechanismus von Pflanzen gegen Viren darstellt und lieferte zum anderen erste Hinweise auf die Mechanismen, mit denen Viren die pflanzliche Abwehr umgehen können (Anandalakshmi et al., 1998).

Zur Identifizierung eines potenziellen RSS bedient man sich hauptsächlich zweier Methoden:

1) Die Koinfiltration von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen, die das grün-fluoreszierende Protein (GFP) als Transgen enthalten [16c Linie; (Ruiz et al., 1998)], mit *Agrobacterium*-Stämmen, die den GFP-Expressionsvektor (35S-GFP) und einen RSS-Expressionsvektor enthalten. Die Infiltration des 35S-GFP Vektors alleine führt zu einer vorübergehenden Verstärkung der GFP-Aktivität, die nach 3-5 Tagen zum Transgen-induzierten zellulären und systemischen Silencing übergeht. Die Verminderung des Reporter Signals führt zu einer Reduzierung der mRNA-Konzentration und zur Anhäufung von GFP-spezifischen siRNAs in den infiltrierten Blattbereichen. Erfolgt jedoch die Infiltration zusammen mit einem RSS-exprimierenden Genkonstrukt, wird das Transgen-induzierte RNA Silencing blockiert und die Reporter Gen-Expression bleibt erhalten oder wird verstärkt (Voinnet et al., 2000).

2) Bei einer weiteren Methode erfolgt das Einbringen des RSS-Expressionsvektors nach dem bereits erfolgten RNA Silencing des Transgens hierbei analysiert man die Umkehr oder die Aufhebung des bereits etablierten RNA Silencing durch den RSS. Die HC-Pro ist in der Lage das RNA Silencing vollständig aufzuheben, das p19-Protein (RSS von Tombusviren) dagegen nicht (Voinnet et al., 1999). Ein möglicher Grund hierfür ist, dass beide RSS unterschiedliche Suppressor-Mechanismen besitzen. Das p19-Protein verhindert die Einlagerung der siRNAs in den RISC, indem es diese bindet und dadurch inaktiviert. HC-Pro dagegen bindet nicht nur siRNA und miRNAs, sondern interagiert vermutlich direkt mit dem RISC und blockiert diesen, was zur Unterdrückung des RNA Silencing führt (Silhavy & Burgyan, 2004).

Gegenwärtig sind mehr als ein Dutzend RSS, sowohl von (+)-ssRNA-, (-)-ssRNA- und einzelsträngigen DNA (ssDNA)-Viren bekannt. Die unterschiedlichen RSS besitzen untereinander keine großen Sequenzhomologien, was auf eine unabhängige Entwicklung dieser Proteine innerhalb der einzelnen Taxa hindeutet. Darüber hinaus interagieren diese mit einem oder mehreren Komponenten des RNA Silencing-Mechanismus. Die erste direkte Interaktion zwischen einem RSS und einer Wirtskomponente wurde bereits im Jahre 2000 durch Anandalakshmi nachgewiesen, bei der die potyvirale HC-Pro mit dem regulator of gene silencing calmodulin-like protein (rgsCaM) interagiert und dessen Wirkung verstärkt (Anandalakshmi et al., 2000).

Die RSS lassen sich heute entsprechend ihrer Aktivität in fünf Gruppen unterteilen (Alvarado & Scholthof, 2009). Die Fähigkeit zur RNA-Bindung ist bei einer Vielzahl von RSS vorhanden und wird meist durch weitere Funktionen ergänzt (Tab. 1.2). Zu der Gruppe der RSS, die die Spaltung von dsRNA-Molekülen durch DCL blockieren und damit auch die Bildung von siRNAs verhindern, zählen

das p38-Hüllprotein von TCV, das 2b-Protein von cucumber mosaic virus (CMV) und das P6-Protein von cauliflower mosaic virus (CaMV). Das p38-Protein beeinflusst dabei die Aktivität von DCL2 und DCL4 (Qu et al., 2003) sowie das 2b-Protein die Aktivität von DCL2, DCL3 und DCL4 (Diaz-Pendon et al., 2007). Das P6-Protein interagiert dagegen mit DRB4 und verhindert dadurch die Bildung von DCL4-spezifischen siRNAs (Haas et al., 2008).

Das V2-Protein aus tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) bildet die zweite Gruppe der RSS und verhindert die Bildung zusätzlicher siRNA-Moleküle durch eine direkte Interaktion mit dem SGS3-Protein, wodurch die Aktivität der RDR6 blockiert wird (Glick et al., 2008).

Die dritte Gruppe der RSS zeichnet sich durch eine Stabilisierung der siRNA-Moleküle aus. Die Bindung von siRNAs durch RSS kann den RNA Silencing-Mechanismus auf zwei Arten blockieren: Zum einen wird die Bildung eines RISC verhindert, dadurch wird der Sequenz-spezifische Abbau der mRNA blockiert; zum anderen werden der zur Erhaltung und der Ausbreitung des Silencing-Signals benötigten RDR die als Primer dienenden primären siRNAs entzogen, was folglich die Bildung von sekundären siRNAs verhindert (Llave et al., 2000; Mallory et al., 2001; Dunoyer et al., 2004). Zu der Gruppe gehören das p19-Protein der Tombusviren, die HC-Pro der Potyviren, das p21-Protein von beet yellows virus (BYV) und das NS3-Protein von rice hoja blanca virus (RHBV). Das p19-Protein von cymbidium ringspot virus CymRSV ist ein sehr starker und effizienter RSS, es blockiert sowohl das transgen-induzierte PTGS als auch das VIGS und wird vom Virus für die systemische Infektion benötigt (Silhavy et al., 2002). In vitro Bindungsstudien mit Drosophila-Zell-extrakten zeigen, dass das Protein längenspezifisch 21 bp RNA-Doppelstränge mit 2 nt 3'-Überhängen, welche charakteristisch für pflanzliche siRNAs sind, bindet. 21 nt ssRNAs oder längere dsRNAs werden dagegen nur schwach gebunden. Während einer CymRSV-Infektion nimmt die Menge an freien siRNAs durch die Bildung von p19-siRNA-Komplexen ab. Dadurch stehen keine siRNAs für die Programmierung des aktiven RISC zur Verfügung (Lakatos et al., 2004). Des Weiteren blockiert p19 die Bildung und Ausbreitung des lokalen Silencing-Signals, beeinflusst jedoch nicht die Ausbreitung des Signals in andere Pflanzenteile (Voinnet, 2001). Die Aufklärung der Kristallstruktur der p19-Proteine zeigt, dass diese Dimere formen und charakteristische 21 bp RNA-Doppelstränge mit 3'-Nukleotiden erkennen (Vargason et al., 2003). Andere Mitglieder dieser Gruppe beeinflussen dagegen die Stabilität der siRNAs, indem die HEN1-vermittelte Methylierung verhindert wird. Dieser Mechanismus konnte bisher für das p21-Protein von BYV, das p19-Protein, die P1/HC-Pro von turnip mosaic virus (TuMV) und der Replikase (p126) nachgewiesen werden.

Die Bildung des RISC bzw. dessen Aktivität wird von der vierten Gruppe der RSS beeinflusst. Zu dieser Gruppe zählt das p0-Protein von beet western yellow virus (BWYV), das sowohl mit Komponenten der SKP1-Cullin-F box (SCF)-Familie interagiert, als auch AGO1 bindet und dessen Abbau herbeiführt (Bortolamiol et al., 2007). Ein weiterer Vertreter – das 2b-Protein von CMV, blockiert neben DCL auch

die AGO1-Aktivität durch die Interaktion mit den PAZ-, PIWI und ND-Domänen (Zhang et al., 2006). Neben den Gruppen der RSS mit spezifischen Interaktionen gibt es eine weitere Gruppe, in die man die RSS mit bislang ungeklärter Funktion einordnet. Zu dieser Gruppe werden Vertreter der Pecluviren, der Hordeiviren und der Tobraviren gezählt (Dunoyer et al., 2002; Bragg et al., 2004; Ghazala et al., 2008). Auch die RSS von DNA-Viren besitzen ergänzende Mechanismen zur Umgehung des pflanzlichen Abwehrmechanismus. Das L2-Protein der Curtoviren blockiert eine Adenosinkinase, welche zur Bildung des Methylgruppendonor S-Adenosyl-Methionin (SAM) benötigt wird und verhindert dadurch die RNA-dirigierte DNA-Methylierung von viraler DNA (Wang & Metzloff, 2005; Raja et al., 2008).

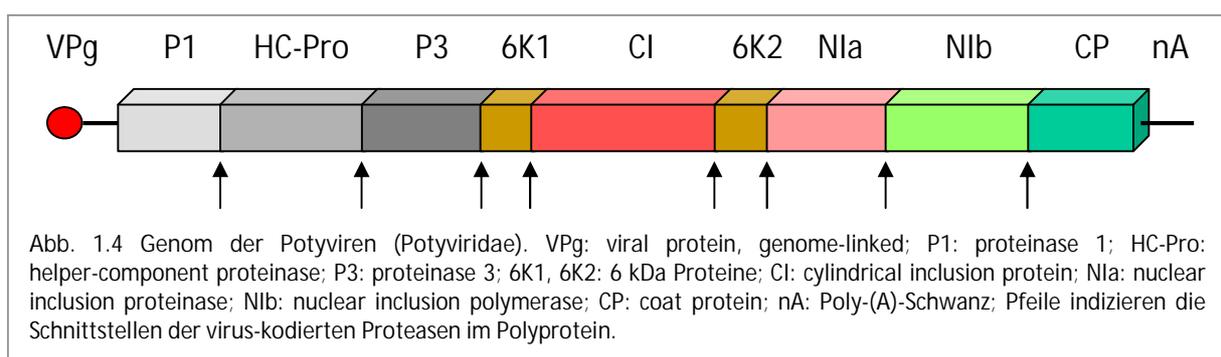
Genus	Virus	Suppressor	RNA-Bindung	Mechanismus	Literatur
(+) RNA-Viren					
Aureusvirus	PoLV	p14	+		(Merai et al., 2005)
Carmovirus	TCV	CP (p38)	+	blockiert DCL4	(Qu et al., 2003; Thomas et al., 2003; Deleris et al., 2006; Merai et al., 2006)
Closterovirus	BYV	p21	+	verhindert HEN1 Methylierung	(Reed et al., 2003; Chapman et al., 2004)
Crinivirus	SPCSV	RNAse3/p22	+	sRNA-Abbau	(Kreuze et al., 2005; Cuellar et al., 2009)
Cucumovirus	CMV	2b	+	Interaktion mit AGO1	(Brigneti et al., 1998; Zhang et al., 2006)
Hordeivirus	BaYMV	γb	+		(Yelina et al., 2002; Merai et al., 2006)
Ipomovirus	CVYV	p1b	+		(Valli et al., 2008)
Poleovirus	BMV	p0	unbekannt	AGO1-Abbau	(Pfeffer et al., 2002; Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007)
Potexvirus	PVX	p25	+		(Voinnet et al., 2000)
Potyvirus	TEV	HC-Pro	+	Interaktion mit rgs-CaM	(Anandalakshmi et al., 2000; Merai et al., 2006)
	PVY	HC-Pro	+		(Brigneti et al., 1998)
	TuMV	P1/HC-Pro	unbekannt	verhindert HEN1 Methylierung	(Kasschau et al., 2003)
	ZYMV	HC-Pro	+		(Shiboleth et al., 2007)
Sobemovirus	RYMV	p1	+		(Voinnet et al., 1999)
Tenuivirus	RSV	NS3	+		(Xiong et al., 2009)
	RHBV	NS3	+		(Hemmes et al., 2007)
Tobamovirus	cr-TMV	p122	+		(Csorba et al., 2007)
	TMV	p126	unbekannt	verhindert HEN1 Methylierung	(Vogler et al., 2007)
	TMV	p130	unbekannt		(Kubota et al., 2003)
Tombusvirus	TBSV	p19	+		(Voinnet et al., 1999; Lakatos et al., 2004)
	CymRSV	p19	+		(Silhavy et al., 2002)
Trichovirus	ACLSV	p50	+	blockiert Signalausbreitung	(Yaegashi et al., 2008)
DNA-Viren					
Begomovirus	TGMV	AL2	-	Inaktivierung der Adenosinkinase	(Wang & Metzloff, 2005)
	TYLCV	V2	+	blockiert SGS3	(Glick et al., 2008; Fukunaga & Doudna, 2009)
	ACMV	AC4	+(ssRNA)		(Chellappan et al., 2005)
Curtovirus	BCTV	L2	unbekannt	Inaktivierung der Adenosinkinase	(Wang & Metzloff, 2005; Raja et al., 2008)

Tab. 1.2 Übersicht der RSS Proteine von Pflanzenviren und deren Interaktion mit dem pflanzlichen Abwehrmechanismus.

1.4 Potyviren und die HC-Pro

Die Gattung Potyvirus (Familie Potyviridae) besitzt ca. 180 Mitglieder und gehört damit zu der größten Gruppe der Pflanzenviren. Der Name leitet sich von dem Vertreter PVY ab. Die Gruppe der Potyviren verursacht große Schäden an Feldfrüchten (z.B. Tomate, Zucchini, Kürbis, Gurke, Mais, Kartoffel) und Zierpflanzen und ist eine der wirtschaftlich bedeutendsten Gruppen von Pathogenen (Ward & Shukla, 1991). Die potyviralen Virionen sind flexible Viruspartikel mit einer Länge von 680-900 nm und einem Durchmesser von 11-15 nm. Die Virushülle setzt sich aus ~ 2000 Kopien des CP zusammen, die durch symmetrische Anordnung das einzelsträngige (+)-RNA-Genom verpacken. Das RNA-Genom besitzt eine Länge von ca. 10 kb und verfügt an dessen 5'-Ende über ein genome-linked viral protein (VPg) und am 3'-Ende einen Poly-A Schwanz. Die Translation erfolgt direkt von der genomischen RNA und resultiert in einem ~350 kDa großen Polyprotein, aus welchem ko- bzw. post-translational durch die Virus-kodierten Proteasen acht bis neun reife Proteine hervorgehen (Riechmann et al., 1995; Langenberg & Zhang, 1997) (Abb. 1.4).

Das P1-Protein und die HC-Pro spalten sich autokatalytisch an ihrem C-Terminus, was zur Freisetzung der reifen P1, HC-Pro und P3-Proteine führt (Carrington et al., 1989a; Verchot et al., 1991). Die übrigen Proteine werden durch die nuclear inclusion proteinase (NIa) über eine trans-proteolytische bzw. autoproteolytische Aktivität aus dem Polyprotein freigesetzt. Eine weitere Funktion des P1-Proteins ist die Verstärkung der Amplifikation des viralen Genoms (Verchot & Carrington, 1995). Die genaue Funktion des P1-Proteins bei der Infektion von Potyviren ist unbekannt; man geht jedoch davon aus, dass diese die Funktion von HC-Pro als RSS verstärkt (Kasschau & Carrington, 1998; Rajamaki et al., 2005; Valli et al., 2006).



Die HC-Pro ist ein multifunktionelles Protein, das eine Vielzahl von Aufgaben im Lebenszyklus der Potyviren übernimmt. Dazu zählen die Funktionen als Helferkomponente bei der Übertragung durch Blattläuse (Thornbury et al., 1985); die Protease-Aktivität, durch die sich die HC-Pro in cis, an deren eigenen C-Terminus, vom Polyprotein abspaltet (Oh & Carrington, 1989); die Ausbreitung und Replikation des Virus (Cronin et al., 1995; Kasschau & Carrington, 1995); die Bindung von RNA durch

zwei einzelsträngige RNA-Bindedomänen (Urcuqui-Inchima et al., 2000); die Bindung an das CP des Virus (Blanc et al., 1997); der synergistischen Infektion von Viren (Shi et al., 1997; Wang et al., 2002) und die Funktion als RSS (Anandalakshmi et al., 1998; Brigneti et al., 1998; Kasschau & Carrington, 1998).

Die HC-Pro interagiert mit unterschiedlichen Proteinen aus Pflanzen, dazu zählen: das rgsCaM-Protein aus *Nicotiana tabacum* (Anandalakshmi et al., 2000); die RING-Finger Proteine HIP1 und HIP2 aus Kartoffel (Guo et al., 2003); drei Untereinheiten des 20S-Proteosoms aus *Arabidopsis* (Ballut et al., 2005; Jin et al., 2007b), der Faktor NtMinD, welcher für die Chloroplasten-Teilung in *N. tabacum* notwendig ist (Jin et al., 2007a) und mit regulator of the ATPase of the vacuolar membrane (RAV2) einem Transkriptionsfaktor aus *Arabidopsis* durch den die endogene Silencing Suppressor-Proteine FRY1 und CML38 reguliert werden (Endres et al., 2010).

Auf Grund der Funktionen gliedert man die HC-Pro schematisch in drei Bereiche: der N-terminale Bereich, der für die Verbreitung der Viren notwendig ist; die C-terminale Region mit der Protease-Aktivität und eine zentrale Domäne, welche die übrigen Aufgaben übernimmt. Manche Funktionen überlappen jedoch oder sind auf unterschiedliche Bereiche des Proteins verteilt. Die HC-Pro bildet Dimere bzw. Multimere und ist vermutlich in dieser Form aktiv (Thornbury et al., 1985; Wang & Pirone, 1999).

An der Verbreitung des Virus sind zwei innerhalb der Potyviren konservierte Regionen des Proteins beteiligt; das KITC-Motiv, das sich im N-terminalen Bereich befindet und das PTK-Motiv im C-terminalen Bereich des Proteins, welches das DAG-Motiv des CP bindet (Blanc et al., 1997; Blanc et al., 1998; Peng et al., 1998). Mit Hilfe von Deletionsmutanten wurde gezeigt, dass die ersten ~ 100 AS des HC-Pro nur am Ausbreitungsprozess der Viren beteiligt sind und nicht für die Virusinfektion benötigt werden (Dolja et al., 1993).

Eine weitere wichtige Funktion ist die Protease-Aktivität im C-terminalen Bereich des Proteins. Das katalytische Zentrum der HC-Pro von TEV bilden die konservierten AS Cys-344 und His-417 (Oh & Carrington, 1989). Die Spaltung im Polyprotein erfolgt zwischen der HC-Pro und dem P3-Protein an den Aminosäuren Gly-763 und Gly-764. Die Aktivität der HC-Pro aus TEV ist von vier konservierten Aminosäuren abhängig, welche die Spaltungsstelle umgeben (Carrington & Herndon, 1992).

Die zentrale Domäne (AS 100-300) der HC-Pro umfasst das konservierte IGN-Motiv, das für die Vervielfältigung des viralen Genoms benötigt wird; das CC/SC-Motiv, welches für die systemische Ausbreitung in der Pflanze erforderlich ist (Cronin et al., 1995; Kasschau et al., 1997) und zwei RNA-Bindedomänen (A und B), die sich über die gesamte zentrale Region verteilen und bevorzugt ssRNA-Moleküle binden (Maia & Bernardi, 1996; Urcuqui-Inchima et al., 2000).

Zur wichtigsten Aufgabe der HC-Pro zählt jedoch die RSS-Aktivität (Li & Ding, 2001; Voinnet, 2001). Neben der direkten Bindung von siRNAs durch HC-Pro (Lakatos et al., 2006) gibt es Hinweise darauf,

dass HC-Pro auch mit weiteren Komponenten des RNA Silencing Mechanismus interagiert. Eine Studie mit HC-Pro von TEV zeigt, dass diese in der Lage ist, die Methylierung von sRNAs am 3'-Ende zu blockieren und deutet auf eine mögliche Interaktion mit HEN1 hin (Lozsa et al., 2008).

Die Symptomentwicklung in infizierten Pflanzen weist dagegen auf eine Interaktion von HC-Pro mit dem endogenen miRNA-Mechanismus hin, der die pflanzlichen Entwicklungsprozesse steuert (Mallory et al., 2002; Kasschau et al., 2003; Palatnik et al., 2003). Durch die Überexpression von miRNAs oder durch die Bildung von miRNA-resistenten Zielsequenzen ist es möglich, den direkten Effekt der miRNAs auf die pflanzliche Entwicklung darzustellen – diese Pflanzen weisen starke Phänotypen auf, da die Regulation durch die miRNAs blockiert ist (Jones-Rhoades et al., 2006).

Eine Überexpression von P1/HC-Pro aus TEV in Arabidopsis führt ebenfalls zur Ausbildung eines starken Phänotypes, der mit dem Grad der Expression des Transgens korreliert. In diesen Pflanzen ist die miRNA-vermittelte Regulation der Zielsequenzen vermindert (Kasschau et al., 2003). In Arabidopsis Pflanzen mit Mutationen der Kernkomponenten des miRNA-Mechanismus (DCL1, HYL1, HEN1, HST und AGO1) kommt es zu starken pleiotropen Effekten in der Entwicklung, die mit denen der HC-Pro transgenen Pflanzen vergleichbar sind. Die miRNA-Menge ist in den *dcl1*-, *hyl1*-, *hen1*- und *hst*-Nullmutanten stark vermindert. In den *ago1*-Mutanten kommt es zu einer Anhäufung der miRNA-Zielsequenzen (Mallory & Vaucheret, 2006).

Aktuelle Studien zeigen, dass neben der Störung des miRNA-Mechanismus durch die HC-Pro auch die Interaktion zwischen der HC-Pro und dem Transkriptionsfaktor RAV2 einen Einfluss auf die morphologischen Anomalien besitzt (Endres et al., 2010).

Die HC-Pro besitzt ebenfalls einen Einfluss auf die Menge von miRNAs und siRNAs. Das Vorhandensein des P1/HC-Pro von TuMV als Transgen in Arabidopsis führt zu einer Erhöhung der miRNA-Menge (miRNA- und miRNA*-Strang) und der entsprechenden Zielsequenzen (Kasschau et al., 2003; Chapman et al., 2004; Dunoyer et al., 2004). Man geht davon aus, dass HC-Pro die siRNAs und miRNAs als doppelsträngige Moleküle bindet und diese inaktiviert, d. h. dass diese nicht mehr in den RISC eingebaut werden können und der Abbau des miRNA*-Strangs dadurch verhindert wird.

1.4.1 Die Besonderheit der HC-Pro von ZYMV

Die HC-Pro von zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) umfasst 456 AS und ist im Vergleich zu anderen ZYMV-Stämmen und Potyviren zu 93 % homolog (Gal-On et al., 1991, 1992; Granier et al., 1993; Huet et al., 1994). Die zentrale Domäne der HC-Pro besitzt unterschiedliche stark konservierte Regionen innerhalb der Familie der Potyviren, dazu zählt auch die FRNK-Box (AS 179-182). Dieses Motiv stellt die Abgrenzung einer gegen den Trypsinverdau-resistenten Region innerhalb der RNA-Bindedomäne A dar (Plisson et al., 2003).

Bei der Untersuchung von zwei im Freiland vorkommenden ZYMV-Stämmen, bei denen ein Stamm starke Symptome (NAT-Stamm) und ein weiterer schwächere Symptome (WK-Stamm) verursachte, konnte man einen Unterschied von drei Aminosäuren feststellen (Huet et al., 1994). Eine Punktmutation von Arg-180 zu Ile-180 in der HC-Pro von ZYMV (WK-Stamm) bewirkt eine drastische Abschwächung der Symptome in Blättern von Kürbispflanzen, die jedoch keine Auswirkung auf den Virustiter oder die RSS-Aktivität des Proteins hat (Gal-On, 2000) (Abb. 1.5).

Diese Besonderheit einer Entkopplung der Symptomentwicklung von der RSS-Aktivität

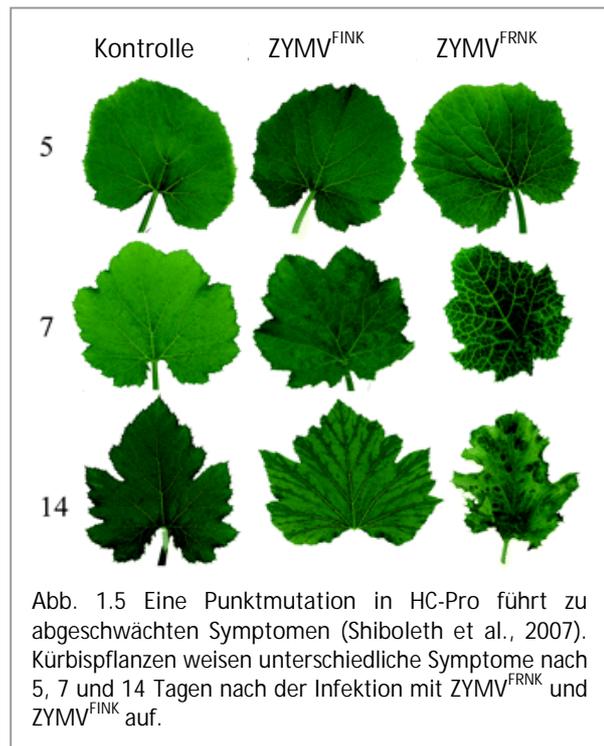
konnte dagegen nicht bei anderen Vertretern der Potyviren nachgewiesen werden. Im Vergleich zu ZYMV führt diese Punktmutation in TEV, TuMV und in PVY neben einer Verminderung der Symptome auch zum Verlust der RSS-Aktivität und verhindert die Infektion der Wirtspflanzen durch die Viren.

Des Weiteren konnte man eine bis zu 20-fach stärkere Anhäufung der miRNA*-Menge in den ZYMV^{FRNK}-infizierten Kürbispflanzen im Vergleich zu den ZYMV^{FINK}-infizierten Pflanzen nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass die Mutante eine geringere Bindekapazität von sRNA-Molekülen besitzt. Ergänzende Gelshift-Analysen zeigen, dass die aus *Agrobacterium*-infiltrierten *N. benthamiana*-Pflanzen isolierte HC-Pro^{FINK} eine verminderte Affinität zu synthetischen siRNA-Doppelsträngen und eine stark verminderte Affinität zu miRNA-Doppelsträngen besitzt. (Shiboleth et al., 2007).

Versuche mit transgenen Arabidopsis Pflanzen zeigen, dass die konservierten Aminosäuren Arg-180, Phe-205 und Glu-396 der HC-Pro aus ZYMV für die Blockierung des miRNA- und ta-siRNA-Mechanismus und VIGS notwendig sind, aber keinen Einfluss auf die Blockierung des S-PTGS besitzen (Wu et al., 2010).

1.5 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den molekularen Mechanismus der HC-Pro als RSS aufzudecken. Hierbei soll die Besonderheit der HC-Pro-Mutante (HC-Pro^{FINK}) von ZYMV genutzt werden, die Entwicklung der Symptome in den Wirtspflanzen von der RSS-Aktivität zu entkoppeln.



Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- 1) Ist die Silencing Suppressor-Aktivität der HC-Pro Mutanten weiterhin vorhanden und inwiefern wirkt sich diese auf die siRNA-Mengen in den Blattbereichen aus? Wie verändern sich die miRNA-Mengen in den infiltrierten Blattbereichen unter dem Einfluss von HC-Pro?
- 2) Wie stark ist die Bindekapazität der HC-Pro^{FINK} von sRNA-Molekülen? Die Bindekapazität von HC-Pro^{FINK} soll im Vergleich zu HC-Pro^{FRNK} analysiert werden. Ist die HC-Pro^{FINK} weiterhin in der Lage sRNA-Moleküle zu binden, besitzt diese nur noch die Möglichkeit siRNAs zu binden oder führt die Mutation zum vollständigen Verlust der sRNA-Bindung? Welches Minimalmotiv der HC-Pro wird für die RNA-Bindung benötigt?
- 3) Welche pflanzlichen Faktoren verstärken die sRNA-Bindung in vitro?
- 4) Ist die autoproteolytische Aktivität vergleichbar mit HC-Pro-Proteinen aus anderen Potyviren? Wo befindet sich das katalytische Zentrum und welche Aminosäuren sind essentiell?
- 5) In welchem Bereich der HC-Pro erfolgt die Spaltung durch bakterielle bzw. pflanzliche Proteasen? Hierbei sollen die kritischen Aminosäuren identifiziert und durch einen Austausch bzw. Deletion weiter analysiert werden.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Art, Gattung	Bezeichnung	Genotyp	Firma
A. tumefaciens	ATHV		
A. tumefaciens	GV3101	pMP90RK Gm ^r , Km ^r , Rif ^r (Koncz & Schell, 1986)	
E. coli	ArcticExpress (DE3)	F ⁻ ompT hsdS (rB – mB –) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gentr]	Stratagene (Waldbronn)
E. coli	BL21 (DE3)	F ⁻ ompT hsdS (rB – mB –) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte	Stratagene (Waldbronn)
E. coli	BL21 (DE3) codon plus	F ⁻ ompT hsdS (rB – mB –) dcm+ Tetr gal endA Hte [argU ileY leuW Camr]	Stratagene (Waldbronn)
E. coli	INVα	F' F'endA1recA1 hsdR17 (rk-, mk +) supE44thi-1 gyrA96 relA1Δ80lacZΔ (lacZYA-argF) U169	Invitrogen (Karlsruhe)

Tab 2.1 Übersicht der verwendeten Bakterienstämme, deren Genotyp und Bezugsquellen.

2.1.2 Pflanzenmaterial

Gattung, Art
Nicotiana benthamiana
Nicotiana tabacum L. cv. Petit Havana SR1
Arabidopsis thaliana (Linie Col-0)
Cucurbita pepo L. (Elite F1)

Tab 2.2 Übersicht und Beschreibung der verwendeten Pflanzen.

2.1.3 Enzyme, Kits, Antikörper, Oligonukleotide

2.1.3.1 Enzyme

Nukleinsäure-modifizierende Enzyme

Enzym	Klasse	Puffer	Firma
Antarctic Phosphatase (5 U/μl)	Phosphatase	1 x AP-Puffer (50 mM Bis-Tris-Propan-Cl, pH 6,0; 1 mM MgCl ₂ ; 0,1 mM ZnCl ₂)	NEB (Frankfurt)
DNase I (2 U/μl)	Endonuklease	1 x DNaseI-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 7,6; 2,5 mM MgCl ₂ ; 0,5 mM CaCl ₂)	NEB (Frankfurt)
FastAP™ Alkalische Phosphatase (1 U/μl)	Phosphatase	10 x FastAP-Puffer (100 mM Tris-Cl, pH 8,0; 50 mM MgCl ₂ ; 1 M KCl; 0,2 % Triton X-100; 1 mg/ml BSA)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Mung Bean Nuklease (10 U/μl)	Exonuklease	1 x MBN-Puffer (50 mM Natriumacetat; 30 mM NaCl; 1 mM ZnSO ₄ ; pH 5,0)	NEB (Frankfurt)
T4 DNA-Ligase (5 U/μl)	DNA-Ligase	10 x Ligase-Puffer (400 mM Tris-Cl, pH 7,8; 100 mM MgCl ₂ ; 100 mM DTT; 5 mM ATP)	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4 Polynukleotidkinase (10 U/μl)	Kinase	10 x T4 PNK-Puffer A (500 mM Tris-Cl, pH 7,6; 100 mM MgCl ₂ ; 50 mM DTT; 1 mM Spermidine; 1 mM EDTA)	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4 RNA-Ligase 1 (20 U/μl)	RNA-Ligase	1 x T4 RNA-Lig Puffer (50 mM Tris-Cl, pH 7,8; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM ATP; 10 mM DTT)	NEB (Frankfurt)

Tab. 2.3 Auflistung der verwendeten Enzyme zur Modifikation von Nukleinsäuren, deren Klassifizierung, Pufferzusammensetzungen und Bezugsquellen.

Polymerasen

Enzym	Klasse	Puffer	Firma
Klenow-Enzym (5 U/μl)	DNA-Polymerase/ Exonuklease	1 x NEBuffer 2 (10 mM Tris-Cl, pH 7,9; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT)	NEB (Frankfurt)
Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	DNA-Polymerase	10 x Pfu-Puffer (200 mM Tris-Cl, pH 8,8; 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 100 mM KCl; 1% (v/v) Triton X-100; 1 mg/ml BSA; 20mM MgSO ₄)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Phusion-DNA-Polymerase (2 U/μl)	DNA-Polymerase	5 x HF-Reaktionspuffer	Finnzymes (Espoo, FIN)
RevertAid™ H Minus M-MuLV RT (200 U/μl)	DNA-Polymerase	5 x RT-Puffer (250 mM Tris-Cl, pH 8,3; 250 mM KCl; 20 mM MgCl ₂ ; 50 mM DTT)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Superscript® III RT (200 U/μl)	DNA-Polymerase	5 x RT-Puffer (250 mM Tris-Cl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂)	Invitrogen (Karlsruhe)
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	DNA-Polymerase	10 x Taq-Puffer (500 mM KCl; 100 mM Tris-Cl, pH 8,3; 15 mM Mg ²⁺)	VWR (Darmstadt)

Tab. 2.4 Auflistung der verwendeten Polymerasen, deren Klassifizierung, Pufferzusammensetzungen und Bezugsquellen.

Sonstige Enzyme

Enzym	Klasse	Puffer	Firma
Benzonase (25 U/μl)	Endonuklease		Merck (Darmstadt)
Proteinase K	Serinprotease	2 x PK-Puffer (100 mM Tris-Cl, pH 8,0; 25 mM EDTA; 300 mM NaCl; 2 % SDS)	Roth (Karlsruhe)
Ribo Lock (40 U/μl)	RNase-Inhibitor		Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase A	Ribonuklease		Roth (Karlsruhe)
RNase I _r (50 U/μl)	Ribonuklease		NEB (Frankfurt)
p19 (10 U/μl)	siRNA Bindeprotein	1 x p19-Puffer (20 mM Tris-Cl, pH 7,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM TCEP; 0,02 % Tween-20)	

Tab. 2.5 Auflistung aller weiteren verwendeten Enzyme, deren Funktionen, Pufferzusammensetzungen und Bezugsquellen.

Restriktionsendonukleasen

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (Frankfurt) und Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Die Restriktionsansätze wurden in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem pipettiert.

2.1.3.2 Kits

Produkt	Firma
DecaLabel DNA Labeling Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen (Hilden)
FireSilver Staining Kit	Proteome Factory AG (Berlin)
mirVana miRNA Isolation Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
mirVANA Probe & Marker Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Wizard Plus SV Minipreps	Promega (Mannheim)

Tab. 2.6 Übersicht der verwendeten Kits und deren Bezugsquellen.

2.1.3.3 Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Firma
anti-GFP	Kaninchen	1:1.000	Santa-Cruz (Heidelberg)
anti-GFP-HRP	Maus	1:10.000	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
anti-HA	Maus	1:10.000	Sigma (Taufkirchen)
anti-HA-Peroxidase	Maus	1:1.000	Roche (Mannheim)
anti-His	Maus	1:1.000	NEB (Frankfurt)
anti-Kaninchen-Peroxidase	Ziege	1:1.000	Santa-Cruz(Heidelberg)
anti-Maus IgG-Peroxidase	Ziege	1:1.000	Sigma(Taufkirchen)
anti-MBP	Maus	1:10.000	NEB (Frankfurt)

Tab. 2.7 Auflistung der verwendeten Antikörper, deren Herkunft, eingesetzte Verdünnungen und Bezugsquellen.

2.1.3.4 Oligonukleotide

RNA-Oligonukleotide

Die synthetischen RNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen) und Exiqon (Vedbaek, DK) bezogen. Die Aufnahme der lyophilisierten Oligonukleotide erfolgte in H₂O mit einer Konzentration der Stammlösung von 1 µg/µl.

Bezeichnung	Sequenz (5' à 3')
19nt siRNA 19nt siRNA*	AGAGUGCCAUGCCCGAAGG CCUUCGGGCAUGGCACUCU
21nt siRNA #1 21nt siRNA* #1	AGAGUGCCAUGCCCGAAGGUU CCUUCGGGCAUGGCACUCUUG
21nt siRNA #2 21nt siRNA* #2	CCAAUAUUUACGUGCUGCUUU AGCAGCACGUAAAUAUUGGUU
24nt siRNA 24nt siRNA*	AGAGUGCCAUGCCCGAAGGUUAUU UAACCUUCGGGCAUGGCACUCUUU
ath-miR171a ath-miR171a*	UGAUUGAGCCGCGCAAUAUC UAUUGGCCUGGUUCACUCAGA
ath-miR171b,c ath-miR171b,c*	UUGAGCCGUGCCAAUAUCACG AGAUUUAGUGCGGUUCAUC
ath-miR396a ath-miR396a*	UUCCACAGCUUUCUUGAACUG GUUCAUAAAGCUGUGGGAAG
hsa-let-7i hsa-let-7i*	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU CUGCGCAAGCUACUGCCUUGCU
hsa-miR-101 hsa-miR-101*	UACAGUACUGUGAUAAUCUGAA CAGUUUACACAGUGCUGAUGCU
hsa-miR-10b hsa-miR-10b*	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG ACAGAUUCGAUUCUAGGGGAU
hsa-miR-122 hsa-miR-122*	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG AACGCCAUUAUCACACUAAAUA
hsa-miR-193a hsa-miR-193a*	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA AACUGGCCUACAAAGUCCAGU
hsa-miR-196a hsa-miR-196a*	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG CGGCAACAAGAAACUGCCUGAG
hsa-miR-26a hsa-miR-26a-1*	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU CCUAUUCUUGGUUACUUGCACG
hsa-miR-379 hsa-miR-379*	UGGUAGACUAUGGAACGUAGG UAUGUAACAUGGUCCACUAACU
hsa-miR-92a hsa-miR-92a-1*	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU AGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCU

Tab 2.8 Übersicht und Sequenzen der verwendeten RNA-Oligonukleotide.

DNA-Oligonukleotide

Die DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die Oligonukleotide wurden als 100 µM Stocklösung bei -20°C gelagert.

Bezeichnung	Sequenz (5' à 3')
Cupin clon_F	CCGGAATTC <u>CGGATGGGCTGCATCGGTG</u>
Cupin clon_R	CCC <u>GCTCGAGCGGCTCGAATTGGTAATG</u>
FINK mut_F	GCATTGAAAATGTTCA <u>TTAATAAGCGTTC</u>
FINK mut_R	GAACGCTTATTAATGAACATTTTCAATGC
HA-HC-Pro XbaI_F	GGTGCTCTAGAGCAATGTATCCATATGATGTTCC
HC-Pro mut C1_F	AACATTACAGAGTTAAGGCCATGGGTAAG
HC-Pro mut C1_R	CTTTACCCATGGCCTTA <u>ACTCTGTAATGTT</u>
HC-Pro mut C4_F	CAAACCATGTCCTGTCATTGATTCTTATGG
HC-Pro mut C4_R	CCATAAGAATCAATGACAGACATGGTTTG
HC-Pro mut C5_F	GAAGGTTATTCTATCTCAATATTTTCC
HC-Pro mut C5_R	GGAAAATATTGAGATAGGAATAACCTTC
HC-Pro mut C6_F	GCTTCTGGTGATCCATAGTCTAGAGATCTGCCAGC
HC-Pro mut C6_R	GCTGGCAGATCTCTAGACTATGGATCACCAGAAGC
HC-Pro mut C7_F	GGTGATCAAAGTCCATGGATCTGCCAGC
HC-Pro mut C7_R	GCTGGCAGATCCATGGACTTTGGATCACC
HC-Pro mut C8_F	CTCAATATTTTCTCGCCATGGTTGTGAATG
HC-Pro mut C8_R	CATTCAACAACCATGGCGAGAAAATATTGAG
HC-Pro mut C9_F	GATCCCATGGTTGGGCAGTGG
HC-Pro mut C9_R	CCACTGCCCAAACCATGGGGATC
HC-Pro mut C10_F	GAGAACGAAGCCATGGATTTACCAAAAATG
HC-Pro mut C10_R	CATTTTGGTGAAATCCATGGCTTCGTTCTC
HC-Pro mut C11_F	CTTGTGAATGTTAATAACGAAGCAAAG
HC-Pro mut C11_R	CTTTGCTTCGTTATTAACATTCACAAG
HC-Pro mut C12_F	GCAATGCTTGTGGTTAATGAGAACG
HC-Pro mut C12_R	CGTTCTCATTAAACCACAAGCATTGC
HC-Pro mut N1_F	GATAGTTTCAAGGAGAGCTCTCATTACG
HC-Pro mut N1_R	CGTAATGAGAGCTCTCCTTGAAACTATC
HC-Pro mut T146V_F	GGTTCATTGGTTGTACAAGACG
HC-Pro mut T146V_R	CGTCTTGTACAACCAATGAACC
HC-Pro mut ΔQ147_F	GGTTCATTGGTTGACGAATTGG
HC-Pro mut ΔQ147_R	CCAATTCGTCAACCAATGAACC
HC-Pro mut ΔT146_F	GGTTCATTGGTTCAAGACGAATTGG
HC-Pro mut ΔT146_R	CCAATTCGTCTTGAACCAATGAACC
HC-Pro mut ΔV145_F	GGTTCATTGCAAGACGAATTGG
HC-Pro mut ΔV145_R	CCAATTCGTCTTGAACCAATGAACC
HC-Pro NcoI_F	CATGCCATGGGGTCGTCACAACCGGAAGTTC
HC-Pro NcoI_R	CATGCCATGGCGCCAACCTCTGTAATGTTTC
HC-Pro XbaI-NotI_F	GCTCTAGAGCGGCCGCATCGTCACAACCGGAAGTTC
HC-Pro XbaI-NotI_R	GCTCTAGATTAAGCGGCCGCGCCAACCTCTGTAATG
LP1 clon_F	CGCGGATCCATGGCTGGAGTGATGAAG
LP1 clon_R	CCC <u>GCTCGAGCGGCCTCACGGTTTTTC</u>
pKB-GFP XbaI_R	GCTCTAGAGGATCCTTATTTGTATAGTTCATCC
pKB-HA-HcPro KpnI_F	GGGGTACCCCATGTATCCATATGATGTTCCGGATTACCGGTCGTCACAACCGGAAGTTC

Tab 2.9 Übersicht und Sequenzen der verwendeten DNA-Oligonukleotide. Entsprechende Sequenzen von Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen; Matrizen-überspannende Sequenzabschnitte sind hervorgehoben.

2.1.4 Vektoren und Expressionsplasmide

Plasmid	Kommentar	Resistenz	Zitat
pBin19:HA-HC-Pro FINK	pBin19 Binärvektor mit HA-HC-Pro FINK Gen in T-DNA unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors und Poly(A)-Signals	Km	(Shiboleth et al., 2007)
pBin19:HA-HC-Pro FRNK	pBin19 Binärvektor mit HA-HC-Pro FRNK Gen in T-DNA unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors und Poly(A)-Signals	Km	(Shiboleth et al., 2007)
pET28b(+):HC-Pro	siehe Abschnitt 2.2.4.1	Cb	diese Arbeit
pET32a(+)	Vektor kodiert für trxA-Gen zur Expression von Zielproteinen mit N-terminalem trx-Tag und C-terminalem 6x His-Tag	Cb	(LaVallie et al., 1993)
pET32a(+)-HA-LP1	siehe Abschnitt 2.2.4.8	Cb	diese Arbeit
pET32a(+)-HA-QP	siehe Abschnitt 2.2.4.9	Cb	diese Arbeit
pJet1.2/blunt	Klonierungsvektor linearisiert mit EcoRV; eco47III-Gen zur positiven Selektion	Cb	
pKB:biNLS-GFP		Sm/Sp	(Boonrod et al., 2004)
pKB:biNLS-HC-Pro-GFP	siehe Abschnitt 2.2.4.4	Sm/Sp	diese Arbeit
pMAL.c2X	Vektor kodiert für malE-Gen zur Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem MBP	Cb	(di Guan et al., 1988)
pMAL.c2X:HA-HC-Pro mut C7-mGFP-His	siehe Abschnitt 2.2.4.7	Cb	diese Arbeit
pMAL.c2X:HA-HC-Pro ^{FINK}	siehe Abschnitt 2.2.4.3	Cb	diese Arbeit
pMAL.c2X:HA-HC-Pro ^{FRNK}	siehe Abschnitt 2.2.4.2	Cb	diese Arbeit
pMAL.c2X:HA-HC-Pro-GFP	siehe Abschnitt 2.2.4.5	Cb	diese Arbeit
pPCVΔ702SM	pPCV702SM Vektor ohne Expressionskassette	Sm/Sp	(Dalakouras et al., 2009)
pPCV702SM	Modifiziertes pPCV702-Plasmid mit Streptomycin/Spectinomycin Resistenzgen; zusätzlicher Polylinker zwischen 35S Promoter und p(A)nos Sequenz	Sm/Sp	(Wassenegger et al., 1994)
pPCV702SM:GpG	IR des mGFP5 Gens durch ein PSTVd-Fragment getrennt	Sm/Sp	(Dalakouras et al., 2009)
pUC57:HA-HC-Pro FINK	pUC57 Klonierungsvektor mit HA-HC-Pro FINK Gen	Cb	(Shiboleth et al., 2007)
pUC57:HA-HC-Pro FRNK	pUC57 Klonierungsvektor mit HA-HC-Pro FRNK Gen	Cb	(Shiboleth et al., 2007)

Tab 2.10 Übersicht der verwendeten Vektoren und Ausgangsplasmide.

2.1.5 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

2.1.5.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

Air Liquide (Pfungstadt), Applichem (Darmstadt), Applied Biosystems (Darmstadt), Bio-Rad (München), Biozym (Oldendorf), Duchefa (Haarlem, NL), Fisher Scientific (Schwerte), GE Healthcare (Freiburg), Invitrogen (Karlsruhe), J.T. Baker (Deventer, NL), Loewe (Sauerlach), Merck (Darmstadt), Neolab (Heidelberg), Perkin Elmer (Rodgau), Plano (Wetzlar), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen), Qiagen (Hilden), Thermo Fisher (Bonn), VWR (Darmstadt).

Membranen, Filtersysteme, Plastikartikel, Röntgenfilme und sonstiger Laborbedarf wurde von folgenden Firmen bezogen:

3M (Neuss), Axon (Kaiserslautern), Biometra (Göttingen), Brand (Wertheim), Braun (Melsungen), Eppendorf (Hamburg), Fisher Scientific (Schwerte), GE Healthcare (Freiburg),

Greiner (Frickenhausen), LHG (Karlsruhe), Medical Markt (Hofheim), Merck (Darmstadt), Millipore (Schwalbach), Neolab (Heidelberg), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht), Sartorius (Göttingen), Schleicher & Schüll (Dassel), Sigma (Taufkirchen), Steinbrenner (Wiesebach), VWR (Darmstadt).

2.1.5.2 Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Autoklav	HAST 4-5-6	Zirbus (Bad Grund)
Blot-Kammer	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad (München)
Brutschrank	EB 18	Jouan (St. Herblain, F)
	MIR-153	SANYO (Loughborough, UK)
Digitalkamera	EOS 30 D	Canon (Krefeld)
Elektrophoresekammer	Mini blu; Midi blu	Harnischmacher (Schauenburg)
	B2 EasyCast Mini Gel System	Thermo Fisher (Bonn)
ELISA Photometer	Multiskan Ascent	Thermo Fisher (Bonn)
Feinwaage	XS204	Mettler Toledo (Giessen)
Geldokumentation	BIS 303 PC	Biostep (Jahnsdorf)
Gradientencycler	Mastercycler ep gradient	Eppendorf (Hamburg)
Hybridisierungssofen	H-2004	Axon (Kaiserslautern)
Inkubator	Orbital Incubator	SANYO (Loughborough, UK)
	Certomat IS	Sartorius (Göttingen)
	Multitron	Infors (Einsbach)
Kontaminationsmonitor	LB 124	Berthold (Bad Wildbad)
Kühlzentrifugen	Rotanta 460 R	Hettich (Tuttlingen)
	RC-5 Plus	Thermo Fisher (Bonn)
Laserscanner	Pharos FX plus	Bio-Rad (München)
Magnetrührer	M5, M6.1	CAT (Staufen)
Mini-Zentrifuge	Rotilabo Mini-Zentrifuge	Roth (Karlsruhe)
pH-Meter	pH level 1	VWR (Darmstadt)
Pipetten	Pipetman	Gilson (Limburg-Offheim)
qPCR-Cycler	DNA-Engine	Bio-Rad (München)
Schüttler	Logic	Lion (Heidelberg)
	E 865	Consort (Turnhout, B)
Spannungsquellen	EPS 3501 XL	GE Healthcare (Freiburg)
	BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Spektralphotometer	Nanodrop ND-1000	Thermo Fisher (Bonn)
	AccuBlock	Labnet (Oakham, UK)
Thermoblock	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems (Darmstadt)
Thermocycler	Z 233	HERMLE (Wehingen)
	Mikro-22 R	Hettich (Tuttlingen)
Transilluminator	UST-20M-8K	Biostep (Jahnsdorf)
Trockenschrank	T 5042 EK	Heraeus (Hanau)
Vakuumentrifuge	RC 1010	Jouan (St. Herblain, F)
Vertikale Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad (München)
	XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen (Karlsruhe)
Vortex	Vortex Genius 3	IKA (Staufen)
	IntelliMixer	Neolab (Heidelberg)
	Vibrax VXR	IKA (Staufen)
Waage	CP4202S	Sartorius (Göttingen)
	HF 1200 G	AND
Wasseraufbereitung	Lab HP	TKA (Niederelbert)
Wasserbad	W12	Funke Medingen (Freital)
Zellmühle	MM 200	Retsch (Haan)
	MM 301	Retsch (Haan)

Tab. 2.11 Auflistung der verwendeten Geräte mit Typenbezeichnung und Herkunft.

2.1.6 Software

Programm	Quelle / Firma
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Chromas Lite	Technelysium Pty Ltd
Clone Manager 7	Sci Ed Central
Expasy	Swiss Institute of Bioinformatics
MS Excel 2003	Microsoft
OligoCalc	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
PrimeView 5.0	GE Healthcare
PSI-BLAST	http://hhrep.tuebingen.mpg.de/psi_blast
Quantity One 4.2.1	Bio-Rad
T-Coffee	Swiss Institute of Bioinformatics

Tab 2.12 Übersicht der verwendeten Programme und Bezugsquellen.

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierungen und allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1.1 Präparation kompetenter E. coli-Zellen

Die Herstellung chemokompetenter Bakterien der E. coli-Stämme INV α , SM10, BL21(DE3) und BL21(DE3) codon plus erfolgte nach dem Protokoll von Inoue (1990).

Der jeweils benötigte E. coli-Stamm wurde am Vortag aus einer Dauerkultur auf LB-Platten ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden von der Platte einige Kolonien mit einer Impföse steril in 247,5 ml SOB-Medium mit 2,5 ml Mg²⁺-Lösung in einen 2 l Erlenmeyerkolben überführt. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte von A₆₀₀ = 0,3 bei einer Temperatur von 18°C und 190 Upm geschüttelt. Der Kolben mit den Zellen wurde 10 Min. auf Eis gekühlt und anschließend die Zellkultur in einen gekühlten Zentrifugenbecher gefüllt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4.000 x g_{av} für 10 Min. bei 4°C. Das Zellpellet wurde in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer aufgenommen und für 10 Min. im Eisbad inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (4.000 x g_{av}, 10 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 20 ml TB-Puffer gelöst. Es erfolgte die Zugabe von DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % und eine Inkubation für 10 Min. auf Eis. Die Zellsuspension wurde in 100 μ l Aliquots aufgeteilt und in flüssigem N₂ gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

LB-Medium (pH 7,5)	1 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	1 % (w/v)	NaCl
für LB-Platten zusätzlich	1,5 % (w/v)	Agar

SOB-Medium	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
steriles MgCl ₂ und MgSO ₄ nach dem Autoklavieren	2	% (w/v)	Trypton
hinzufügen	10	mM	NaCl
	2,5	mM	KCl
	10	mM	MgCl ₂
	10	mM	MgSO ₄

Transformationspuffer	10	mM	PIPES
pH 6,7 mit KOH einstellen	15	mM	CaCl ₂
steril filtrieren (0,45 µm)	250	mM	KCl
	55	mM	Mangan-(II)-chlorid

2.2.1.2 Transformation von Bakterien

Ein 100 µl Aliquot der chemokompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 5-10 µl eines Ligationsansatz bzw. 10-50 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. auf Eis erfolgte zur Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen eine Hitzeinduktion für 45-60 Sek. bei 42°C. Der Ansatz wurde 2 Min. auf Eis gekühlt und anschließend mit 200 µl SOC-Medium gemischt und für 1 Std. bei 37°C und 190 Upm kultiviert.

SOC-Medium	20	mM	Glucose in SOB-Medium
------------	----	----	-----------------------

2.2.1.3 Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen

Zur unbegrenzten Lagerung und Vermehrung von Bakterienkulturen mit den entsprechenden rekombinanten Plasmiden muss eine Dauerkultur angelegt werden. Durch Zugabe von Glycerin wird die zellschädigende Eiskristallbildung beim Tiefrieren verhindert und ermöglicht somit die Kultivierung der Zellen nach dem Auftauen.

Zum Anlegen einer Dauerkultur werden 800 µl einer Bakterienkultur und 200 µl Glycerin (87 %) gemischt und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.1.4 Selektion transformierter E. coli-Zellen

Der Reaktionsansatz wurde nach dem einstündigen Wachstum auf eine LB-Platte, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion rekombinanter Klone enthält, ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C über Nacht kultiviert. Nur die Zellen, die ein rekombinantes Plasmid mit dem entsprechenden Resistenzgen aufgenommen haben, sind in der Lage auf dem antibiotikahaltigem Medium zu wachsen. In Tab. 2.13 sind die Konzentrationen der Antibiotika, die zur Selektion rekombinanter Klone benötigt wurden, aufgeführt. Nach Abkühlen des LB-Mediums auf ~ 60°C wurde das jeweilige Antibiotikum zugegeben.

Antibiotikum	Endkonzentration	Abkürzung	Resistenzgen
Ampicillin	100 µg/ml	LB _{Amp100}	amp ^r bzw. bla _(TEM-1)
Carbenicillin	50 µg/ml	LB _{Cb50}	amp ^r bzw. bla _(TEM-1)
Kanamycin	50 µg/ml	LB _{Km50}	nptII
Streptomycin	20 µg/ml	LB _{Sm20}	AadA (Strep/Spec ^R)-Gen
Spectomycin	25 µg/ml	LB _{Sp50}	AadA (Strep/Spec ^R)-Gen

Tab. 2.13 Übersicht der verwendeten Antibiotika zur Selektion rekombinanter Klone, deren Endkonzentrationen, Abkürzungen und die jeweiligen Resistenzgene.

Eine weitere Möglichkeit zur Selektion bietet das Blau-Weiß-Screening. Der dafür ausgelegte Vektor pGEM-T easy besitzt in der multiplen MCS einen Teil des lacZ-Gens. Dieses wird in *E. coli* zur Bildung einer funktionsfähigen β -Galaktosidase benötigt, die das farblose Substrat X-Gal zu einem Indoxyl-Derivat spaltet, das an der Luft zu einem blauen Dibrom-Dichrom-Derivat oxidiert. IPTG wird zur Induktion der Genexpression benötigt, da dieses an den Lac-Repressor bindet und eine Dissoziation vom Operator bewirkt. Das Lac-Operon wird aktiviert und als Folge der β -Galaktosidase Expression färben sich die Kolonien blau. Befindet sich in der MCS dagegen ein DNA-Fragment, bleiben die Kolonien weiß. Für das Blau-Weiß-Screening müssen eine halbe Stunde vor dem Ausplattieren des Ligationsansatzes 80 µl X-Gal (20 mg/ml) und 40 µl IPTG (100 mM) ausgestrichen werden.

Der Vektor pJET1.2/blunt dagegen besitzt in der MCS das lethale Gen *eco47IR*, das für eine positive Selektion der Klone mit einem DNA-Fragment in der MCS sorgt. Der pJET1.2/blunt Vektor ist Bestandteil des CloneJET PCR Cloning Kit, das eine direkte Klonierung von PCR-Produkten mit glatten, als auch mit überstehenden Enden ermöglicht. Die Klonierung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA nach alkalischer Methode

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der selektiven alkalischen Denaturierung der genomischen DNA (Birnboim & Doly, 1979).

Dazu wurden zunächst die entsprechenden Bakterienklone in 1 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Zellen wurden 5 Min. bei 4.000 g_{av} in einer Tischzentrifuge sedimentiert und anschließend das Sediment in 100 µl P1 gelöst. Nach der Zugabe von 200 µl P2 wurden die Reaktionsgefäße mehrfach invertiert. Es erfolgte die Zugabe von 150 µl P3. Nachdem die Proben gut gemischt wurden, erfolgte eine Inkubation von 5 Min. bei -20°C. Anschließend wurde der Ansatz 5 Min. bei 17.900 g_{av} zentrifugiert und der Überstand (~ 400 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das bereits 500 µl eiskaltes Ethanol (p.a.) enthielt. Nach kräftigem Mischen erfolgte eine Inkubation für 10 Min. bei -20°C und eine anschließende Zentrifugation von 5 Min. bei 17.900 g_{av}. Das Sediment wurde anschließend mit 500 µl kaltem Ethanol (70 %) gewaschen

und die Proben erneut 5 Min. bei 17.900 g_{av} zentrifugiert. Nach dem Trocknen erfolgte die Aufnahme in 15 μ l H₂O.

P1	50	mM	Tris-Cl, pH 7,5
	10	mM	EDTA
	5	% (v/v)	Glycerol
	100	g/ml	RNase A
P2	200	mM	NaOH
	1	% (w/v)	SDS
P3	3	M	Kaliumacetat, pH 5,5

2.2.1.6 Präparative Plasmidisolierung

Zur Plasmid-DNA Isolation wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dazu wurden die entsprechenden Bakterienklone in 5-10 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C kultiviert. Nachdem die Kultur für 5 Min. bei 4.000 g_{av} zentrifugiert wurde, erfolgte die Plasmidisolierung nach Angaben des Herstellerprotokolls. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Bindung von Plasmid-DNA mit einem Hochsalz-Puffer an eine Silikamembran, einem Waschschriff und die anschließende Rückgewinnung der Plasmid-DNA in einem Puffer mit niedriger Salzkonzentration.

2.2.1.7 UV-Absorptionsmessungen von Nukleinsäuren

Zur schnellen Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren bedient man sich der Absorptionsmessung im UV-Bereich (ca. 200-400 nm). Das Ausmaß der Absorption wird als Extinktion (E) bezeichnet und ist nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz definiert als:

$$E = \epsilon c d \quad (\epsilon = \text{Molarer Extinktionskoeffizient [l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}; c = \text{Konzentration der absorbierenden Moleküle [mol} \times \text{l}^{-1}\text{]}; d = \text{Länge der Messstrecke [cm]})$$

Die Messungen im Bereich von $E = 0,05-1,5$ gelten als genau. Bei Messungen im UV-Bereich werden Küvetten aus Quarz verwendet, da Glas oder Kunststoff bei diesen Wellenlängen absorbieren. Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte bei 260 nm. Einer Extinktion von 1 entsprechen 50 μ g \times ml⁻¹ doppelsträngige DNA, 40 μ g \times ml⁻¹ RNA und 33 μ g \times ml⁻¹ eines Oligonukleotids. Da die Absorptionsbereiche von Nukleinsäuren (260 nm) und Proteinen (280 nm)

teilweise überlagern, lässt sich die Reinheit einer Nukleinsäurepräparation als Quotient E_{260}/E_{280} bestimmen, wobei saubere Präparationen Werte zwischen 1,8 und 2,0 annehmen.

2.2.1.8 Restriktionsverdau von DNA

Die Plasmid-DNA wurde nach Angaben der Hersteller (NEB, Frankfurt; Fermentas, St. Leon-Rot) mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Restriktionsendonukleasen schneiden DNA durch Hydrolyse, indem diese eine kurze, definierte Nukleotidsequenz erkennen. Wichtige Parameter für diese Reaktion sind neben der Temperatur und Reaktionszeit auch die Pufferkonzentration und die Enzymaktivität (x U Enzym / x µg DNA). Man unterteilt die Restriktionsendonukleasen in drei Klassen, wobei in den Experimenten ausschließlich Enzyme der Klasse II verwendet wurden, die die DNA innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der Erkennungssequenz schneiden. Die Enzyme der beiden anderen Klassen sind ATP-abhängig und schneiden entweder 20-25 Basenpaare von der Erkennungssequenz entfernt (Klasse I) bzw. an einer zufälligen Stelle, weit entfernt von der Erkennungssequenz (Klasse III).

Der Verdau wurde in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer durchgeführt. Für einen Kontrollverdau wurde ein Reaktionsansatz von 10 µl verwendet; für eine Klonierung erfolgte die Restriktion in 50 µl.

Komponente	Kontrollverdau		Verdau für Klonierungen	
DNA-Fragment	1-5	µl	5-20	µl
linearisierter gereinigter Vektor	1	µl	5	µl
10 x Ligationspuffer	je 1	U	je 2	U
nuklease-freies H ₂ O	x	µl	x	µl
	10	µl	50	µl

Tab 2.14 Übersicht der Reaktionsansätze für einen Kontrollverdau und für Klonierungen.

Der Reaktionsansatz wurde für 30-90 Min. bei 37°C inkubiert.

2.2.1.9 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden mit dem Klenow-Fragment

Um 5'-überhängende DNA-Enden, wie sie z.B. nach dem Verdau mit Restriktionsenzymen entstehen, aufzufüllen und diese anschließend als glatte DNA-Enden zu ligieren, wurde das Klenow-Enzym (großes Fragment der DNA-Polymerase I von E. coli) verwendet. Dieses Enzym besitzt eine DNA-abhängige 5'-3'-Polymerase sowie eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (proof reading). Die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität wurde durch proteolytische Spaltung zerstört. Die Reaktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers des Klenow-Enzyms (NEB, Frankfurt) durchgeführt.

2.2.1.10 Dephosphorylierung von linearen DNA-Fragmenten

Um eine Rezirkularisierung von linearisierten Plasmiden zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit einer alkalischen Phosphatase entfernt. Zu einem 50 µl Restriktionsansatz wurde pro µg Plasmid-DNA 1 U der FastAP™ Alkalische Phosphatase (Fermentas, St. Leon-Rot) zugegeben und für 30-60 Min. bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz 5 Min. bei 75°C inkubiert. Zum Entfernen des Enzyms wurde eine Phenol-/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung durchgeführt. Die Nukleinsäure wurde in 12 µl H₂O aufgenommen, wovon 2 µl nach Zugabe des 6 x DNA-Probenpuffers (Fermentas, St. Leon-Rot) auf einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert wurden.

2.2.1.11 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenolextraktion ist eine Standardmethode zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen. Das Phenol wirkt als Wasserstoffbrückenbildner und kann gleichzeitig hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäure-Seitenketten ausbilden. Das Phenol dissoziiert mit den Protein-Nukleinsäure-Komplexen in freie Komponenten, wobei sich denaturierte Proteine in der Phenolphase anreichern. Das Phenol muss einen pH-Wert von 7,8 besitzen, da ansonsten die DNA in die Phenolphase übergeht. Man verwendet ein Gemisch aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol in einem Verhältnis von 25:24:1. Das Chloroform denaturiert die Proteine und erleichtert somit die Phasentrennung. Der Isoamylalkohol verhindert das Schäumen und die Ausbildung einer breiten Interphase.

Zunächst wurde ein Reaktionsansatz mit der zu reinigenden Nukleinsäure mit dem gleichen Volumen (Vol.) einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)-Lösung versetzt und 30 Sek. kräftig gemischt. Nach einer Zentrifugation bei 17.900 g_{av} für 5 Min. wurde die wässrige Phase (obere Phase) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) gemischt. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation bei 17.900 g_{av} wurden die beiden Phasen getrennt und die wässrige Phase mit den Nukleinsäuren in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss erfolgte die Fällung der Nukleinsäuren.

2.2.1.12 Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe der Fällungsreaktion werden Nukleinsäuren aus salzhaltigen wässrigen Lösungen durch Zugabe von Alkohol ausgefällt. Dazu wurden 1/10 des Vol.-Gesamt der Probe an Natriumacetatlösung und 2-2,5 Vol. Ethanol (p.a.) zur Probe gegeben. Nach einer Inkubation von 30 Min. bei -20°C erfolgte eine Zentrifugation für 10 Min. bei 17.900 g_{av} und 4°C. Das Nukleinsäurepellet wurde anschließend mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und erneut für 5 Min.

bei 17.900 g_{av} zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Trockenschrank bei 55°C für 10 Min. vollständig getrocknet und anschließend in 12 µl H₂O aufgenommen.

Natriumacetatlösung (pH 5,5)	3 M	Natriumacetat
------------------------------	-----	---------------

2.2.1.13 Agarose-Gelelektrophorese und Dokumentation

Die Agarose-Gelelektrophorese gibt Aufschluss über die Größe von linearen DNA-Fragmenten und über die vorliegende Struktur der Plasmid-DNA. Zur Auftrennung von Fragmenten kleiner als 1 kb wurden 1,5-2 %ige Agarosegele, für Fragmente bis 8 kb 1 %ige Agarosegele und für Fragmente größer als 8 kb 0,8 %ige Agarosegele verwendet, die jeweils mit 1 x TAE-Puffer angesetzt wurden. Dazu wurde die Agarosesuspension in einem Mikrowellengerät vorsichtig aufgeköcht und anschließend bei RT auf 50-60°C abgekühlt. Für den späteren Nachweis der aufgetrennten Nucleinsäuren wurden pro ml Agarosesuspension 50 ng EtBr zugegeben. Die Agaroselösung wurde bis zu einer Schichtdicke von maximal 5 mm in eine Gelkammer gefüllt und mit einer Taschenschablone für die Bildung der Auftragsaschen mit einem Volumen von 20-40 µl versehen. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Taschenschablone entfernt und das Gel in einer horizontalen Gelkammer mit 1 x TAE-Puffer überschichtet.

Die DNA-Proben wurden mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Auftragsaschen auf der Kathodenseite geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 50-100 V im Milliamperebereich. Die Migration der Bromphenolblau- und Xylencyanol-Färbungen im Gel gab unter Berücksichtigung des Agarosegehaltes der Gele Aufschluss über den Auftrennungsgrad der DNA-Fragmente.

Der Gellauf wurde nach dem gewünschten Auftrennungsgrad gestoppt und auf einen Transilluminator unter UV-Licht dokumentiert. Als Größenstandard diente der GeneRuler DNA-Ladder Mix (Fermentas, St. Leon-Rot).

50 x TAE-Puffer (pH 8,3)	2 M	Tris-Base
	1 M	Essigsäure
	0,1 M	EDTA

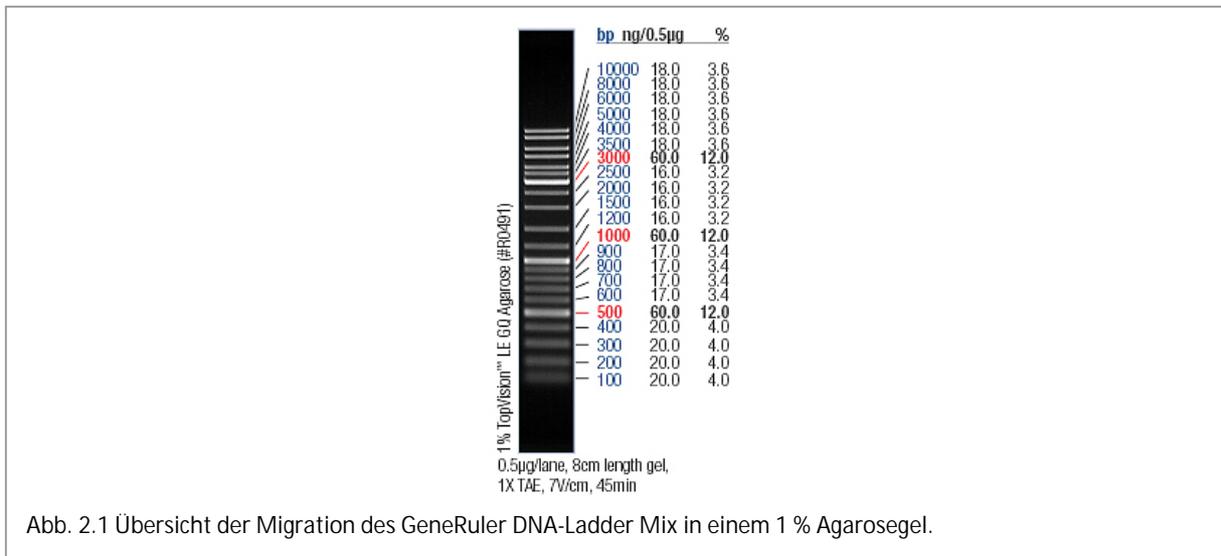


Abb. 2.1 Übersicht der Migration des GeneRuler DNA-Ladder Mix in einem 1 % Agarosegel.

2.2.1.14 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit

Die für die Ligation verwendeten linearen DNA-Fragmente wurden nach dem Auftrennen mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel isoliert. Dazu wurde das DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und das Gelstück bei 55°C im Extraktionspuffer gelöst. Die DNA wurde anschließend an eine Silikamembran gebunden und durch Waschstritte Verunreinigungen wie Agarose, Salze, Proteine und das Ethidiumbromid entfernt. Die Elution der DNA erfolgte mit H₂O und konnte anschließend zur Ligation eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.1.15 Ligation von linearen DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der T4 DNA-Ligase ist es möglich, komplementäre 5'- oder 3'-überhängende DNA Enden sowie glatte DNA-Enden mit anderen glatten DNA-Enden durch kovalente Bindung zu verknüpfen. Die Ligase katalysiert dabei unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe eines Nukleotidtriphosphates und einer frei vorliegenden 3'-OH-Gruppe innerhalb doppelsträngiger DNA. Die Ligationsreaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl nach Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt.

Komponente	Menge	
DNA-Fragment	5-10	µl
linearisierter gereinigter Vektor	2	µl
10 x Ligationspuffer	2	µl
T4 DNA-Ligase	1	µl
nuklease-freies H ₂ O	x	µl
	20	µl

Tab 2.15 Übersicht eines Reaktionsansatzes für eine Ligation.

Die Inkubation erfolgte für 1 Std. bei RT oder über Nacht bei 8°C. Im Anschluss wurden 10 µl des Ligationsansatzes für die Transformation von E. coli-Zellen verwendet.

2.2.1.16 5'-Endmarkierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA/RNA-Oligonukleotiden für sRNA-Northern Blot Hybridisierungen erfolgt mit Hilfe von [γ -³²P]-ATP (Perkin Elmer, Rodgau). Das Enzym T4-Polynukleotidkinase überträgt die γ -Phosphatgruppe des ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe des Oligodesoxynukleotids. Die Markierung erfolgte mit dem mirVANA Probe & Marker Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers.

Alle Reaktionskomponenten wurden auf Eis aufgetaut und der Reaktionsansatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert:

Komponente	Menge	
DNA/RNA-Oligonukleotid	0,1-20	pmol
[γ - ³² P]-ATP	1-40	pmol
10 x Kinase-Puffer	1	µl
T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)	1	µl
nuklease-freies H ₂ O	x	µl
	<u>10</u>	<u>µl</u>

Tab 2.16 Übersicht eines Reaktionsansatzes für eine 5'-Endmarkierung.

Der Ansatz wurde gemischt und anschließend für 1 Std. bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels der im Kit enthaltenen Säulen. Der Reaktionsansatz wurde zunächst mit 350 µl Bindungs-/Waschpuffer versetzt, auf eine Säule gegeben und 30 Sek. zentrifugiert (10.000 g_{av}, RT). Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, erfolgte ein zweiter Waschschrift mit 300 µl Bindungs-/Waschpuffer. Die Säulen wurden auf neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und anschließend 30 µl Elutionspuffer (95°C) auf die Säulen pipettiert. Die radioaktiv-markierten DNA/RNA-Oligonukleotide konnten durch Zentrifugieren (30 Sek., 10.000 g_{av}, RT) von der Säule eluiert werden. Der Elutionsschritt wurde mit 20 µl Elutionspuffer wiederholt.

Elutionspuffer	10	mM	Tris, pH 7,0
	0,1	mM	EDTA

2.2.1.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Sequenzen mit Hilfe einer DNA-Polymerase. Dabei hybridisieren spezifische Primer an die einzelsträngig vorliegende Nukleinsäurematrize (Template-DNA), von deren 3'-Ende aus eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang synthetisiert. Um eine gezielte DNA-Sequenz zu vervielfältigen, werden zwei gegenläufige Primerpaare gewählt, von denen die DNA-Polymerase einen positiven und einen

negativen gegensinnigen Strang synthetisieren kann. Das grundlegende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte (Denaturierung, Hybridisierung und Extension) und die exponentielle Amplifikation der DNA-Matrize.

Ein PCR-Zyklus startet mit einer Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 94-98°C. Im nächsten Schritt erfolgt über Basenpaarung die Primer-Hybridisierung an die einzelsträngige DNA bei Temperaturen $\geq 50^\circ\text{C}$. Die Amplifikation des Sequenzabschnittes erfolgt bei 72-74°C durch das hitzestabile Enzym Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Nach dem letzten PCR-Zyklus werden die Proben für 5-10 Min. auf 72°C erhitzt, um die überstehenden Enden der PCR-Produkte aufzufüllen.

Die Durchführung der PCR erfolgt in einem Thermocycler. Das PCR-Gefäß wird in einen temperierbaren Reaktionsraum eingesetzt, in dem durch eine automatische Steuerung ein Temperaturprogramm mit mehreren Zyklen geregelt wird. Die Zeiten und Temperaturen für jeden Reaktionsschritt sind individuell programmierbar. In einem Gradientencycler besteht zudem die Möglichkeit, eine PCR mit einem Temperaturgradienten zur Bestimmung der optimalen Primer-Hybridisierungstemperatur durchzuführen.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche DNA-Polymerasen verwendet:

- Die Taq-Polymerase (5 Prime) aus dem thermophilen Mikroorganismus *Thermus aquaticus* wurde für die meisten PCR-Reaktionen eingesetzt. Diese besitzt ein Temperaturoptimum von 74°C und eine Halbwertszeit von 5 Min. bei 100°C. Der Taq-Polymerase fehlt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, sie besitzt aber eine Transferaseaktivität und hängt einen Adenosylrest an das 3'-Ende der PCR-Produkte an. Dies ermöglichte die direkte Klonierung der PCR-Produkte in entsprechende Vektoren (TOPO TA; pGEM-T easy).
- Die Pfu-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) stammt aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* und wurde in dieser Arbeit überwiegend für die gerichtete Mutagenese eingesetzt. Durch 3'-5'-Exonukleaseaktivität (proofreading-Aktivität) werden falsch eingebaute Desoxynukleotide erkannt und entfernt, was zu einer bis zu 10-fachen geringeren Fehlerrate des Enzyms im Vergleich zur Taq-Polymerase führt. Es werden des Weiteren keine Adenosylreste an die 3'-Enden der PCR-Produkte angehängt. Die rekombinante Pfu-Polymerase besitzt eine Halbwertszeit von 4 Std. bei 95°C.
- Eine modifizierte Version der Pfu-Polymerase, die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland), zeichnet sich durch eine Fehlerrate aus, die 50fach geringer im Vergleich zur Taq-Polymerase und 6fach geringer im Vergleich zur Pfu-Polymerase ist. Ein weiterer Vorteil des Enzyms ist die verkürzte Zeit zur Synthese der komplementären Stränge.

Die Primersequenzen wurden mit dem Programm Clone Manager 7 (Sci Ed Central) erstellt und die Schmelztemperatur mit dem Online-Programm OligoCalc nach der nearest neighbour Methode berechnet. Die Primer wurden mit 5'-terminalen Restriktionsschnittstellen versehen, die für anschließende Klonierungen in den entsprechenden Vektor benötigt wurden. Die DNA-Oligonukleotide wurden von Sigma (Taufkirchen) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen (Tab. 2.9). In den nachfolgenden Tabellen sind die Reaktionsansätze und die PCR-Temperaturprogramme für eine Standard-PCR mit den unterschiedlichen DNA-Polymerasen angegeben. Alle Komponenten wurden auf Eis aufgetaut und in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert.

Komponente	Taq-Polymerase	Pfu-Polymerase	Phusion-Polymerase
PCR-Puffer	1 x	1 x	1 x
dNTPs (je 10 mM)	je 0,2 mM	je 0,2 mM	je 0,2 mM
Template-DNA	50-100 ng	50-100 ng	50-100 ng
Primer A	0,1-0,2 µM	0,1-1 µM	0,5 µM
Primer B	0,1-0,2 µM	0,1-1 µM	0,5 µM
DNA-Polymerase	0,5-2,5 U	1,25 U	1 U
Gesamtvolumen	50 µl	50 µl	50 µl

Tab 2.17 Übersicht der Reaktionsansätze für die unterschiedlichen DNA-Polymerasen.

Taq-Polymerase			Pfu-Polymerase			Phusion-Polymerase		
Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer
1	94°C	5 Min.	1	95°C	3 Min.	1	98°C	30 Sek.
	94°C	30 Sek.		95°C	30 Sek.		98°C	10 Sek.
30-35	Primer-abhängig	30 Sek.	18	Primer-abhängig	30 Sek.	30-35	Primer-abhängig	30 Sek.
	74°C	1 Min./kb		72°C	1 Min./kb		72°C	15-30 Sek./kb
1	74°C	10 Min.	1	72°C	5 Min.	1	72°C	5 Min.

Tab 2.18 Übersicht der Temperaturprogramme für die unterschiedlichen DNA-Polymerasen.

2.2.1.18 Zirkuläre Mutagenese und DpnI-Selektion der Mutanten

Mit dieser Methode ist es möglich, Mutationen in Plasmide bis zu einer Größe von 10 kb einzubringen (Weiner et al., 1994), da diese Methode keine weiteren Klonierungsschritte erfordert. Über eine PCR-Reaktion mit zwei Mutagenese-Primern werden mit Hilfe der Pfu-Polymerase aus der denaturierten DNA-Matrize neue, mutierte Plasmide erzeugt. Die unmutierte DNA-Matrize muss vor der Transformation des PCR-Produktes jedoch mit Hilfe des Restriktionsenzym DpnI gespalten werden, damit überwiegend das mutierte Plasmid transformiert wird. Das Restriktionsenzym wird direkt zu dem PCR-Ansatz gegeben und spaltet spezifisch methylierte Sequenzen, wie die der bakteriellen DNA-Matrize. Das PCR-Produkt ist nicht methyliert und kann von dem Enzym nicht

gespalten werden. Durch die anschließende Transformation des PCR-Ansatzes in kompetente Bakterienzellen können anschließend rekombinante Klone erzeugt werden.

Die Mutagenese-Primer müssen komplementär zueinander und 25-45 nt lang sein. Die mutierte Sequenz sollte in der Mitte der Primer liegen und von mindestens 8 unmutierten Nukleotiden flankiert werden. Des Weiteren sollte der GC-Gehalt größer als 40 % sein und die Schmelztemperatur über 60°C liegen.

Zunächst wurde der Reaktionsansatz auf Eis in ein steriles PCR-Gefäß pipettiert und anschließend die PCR in einem Thermocycler durchgeführt.

Komponente	Menge
10X Pfu-Puffer mit MgSO ₄	5 µl
dNTP-Mix (2 mM each)	5 µl
Primer A (10 mM)	1,5 µl
Primer B (10 mM)	1,5 µl
Template-DNA	10-50 ng
Pfu DNA-Polymerase (2,5 U / µl)	0,5 µl
nuklease-freies H ₂ O	x µl
	<hr/>
	50 µl

Tab 2.19 Übersicht des Reaktionsansatzes der gerichteten Mutagenese.

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	3 Min.
	94 °C	30 Sek.
18	55 °C	30 Sek.
	72 °C	1 Min./kb
1	72 °C	5 Min.

Tab 2.20 Übersicht des Temperaturprogrammes für die gerichtete Mutagenese.

Nach erfolgter PCR wurde das Produkt auf einem Agarosegel analysiert und das Ausgangsplasmid aus dem Reaktionsansatz entfernt. Dazu wurden 2 µl des Restriktionsenzym DpnI zugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Transformation kompetenter E. coli-Zellen mit 5 µl des Reaktionsansatzes. Die Kolonien konnten am nächsten Tag analysiert werden, wozu bei der Mutation eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle eingefügt oder entfernt wurde.

2.2.1.19 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird eine spezifische RNA-Sequenz in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben. Das dafür benötigte Enzym Reverse Transkriptase wurde bereits 1970 in RNA-Viren entdeckt (Baltimore, 1970; Temin & Mizutani, 1970). Zur Bildung einer cDNA aus einer RNA-Sequenz benötigt die Reverse Transkriptase Primer, dNTPs und den entsprechenden Puffer. Die Primer binden an die RNA und werden an deren 3'-OH-Ende komplementär zur RNA-Matrize verlängert und die cDNA kann anschließend direkt in einer PCR (RT-PCR) eingesetzt

werden. Diese Methode dient zum Nachweis von geringsten Mengen an RNA-Molekülen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer Zweistrangsynthese, die die direkte Klonierung der cDNA-Moleküle ermöglicht.

Die in dieser Arbeit verwendeten Reversen Transkriptasen sind die RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, St. Leon-Rot), die ein Temperaturoptimum von 42-45°C aufweist und keine RNase H-Aktivität besitzt, sowie die Superscript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Frankfurt), die ein Temperaturoptimum von 50°C und eine verminderte RNase H-Aktivität besitzt.

Man unterscheidet bei der reversen Transkription zwischen einer Einschritt- und einer Zweischrittreaktion. Bei der Einschrittreaktion finden die cDNA-Synthese und die anschließende Amplifikation in einem Reaktionsgefäß unter gleichen Pufferbedingungen statt. Die Zweischrittreaktion erfolgt unter optimalen Pufferbedingungen in getrennten Reaktionsgefäßen und wurde ausschließlich in dieser Arbeit angewendet.

Zunächst wurden der spezifische Primer und die RNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 10 Min. bei 65°C denaturiert. Die RNA-Primer-Mischung wurde auf Eis abgekühlt und der Mastermix (dNTPs, 5 x Puffer, DTT, RNase Inhibitor) zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 2 Min. bei 42°C bzw. 50°C, anschließend erfolgte die Zugabe von 200 U der Reversen Transkriptase und eine Inkubation für 1 Std. bei 42-55°C. Ein Aliquot der RT-Reaktion wurde im Anschluss für eine PCR verwendet.

Komponente	Menge	
Gesamt-RNA	0,01-5	µg
Gen-spezifischer Primer	10-20	pmol
dNTP-Mix (je 10 mM)	2	µl
5 x Reaktionspuffer	4	µl
0,1 M DTT (nur Superscript III)	1	µl
RiboLock RNase Inh. (40 U/µl)	0,5	µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1	µl
nuklease-freies H ₂ O	x	µl
	20	µl

Tab 2.21 Übersicht des Reaktionsansatzes einer reversen Transkription.

2.2.1.20 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wird an eine Silikamembran-Säule gebunden und durch Waschschrte werden Verunreinigungen wie Salze, Primer, dNTPs und die DNA-Polymerase entfernt. Die DNA wird mit 30-50 µl H₂O von der Säule eluiert und anschließend für Klonierungen oder andere Anwendungen eingesetzt bzw. bei -20°C gelagert.

2.2.1.21 RNA-Extraktion aus Pflanzen

Die RNA-Extraktion erfolgte nach zwei Methoden. Mit Hilfe des Trizol-Reagenz (Sigma, Taufkirchen) konnte Gesamt-RNA für Northern Blot Analysen und für reverse Transkription Reaktionen isoliert werden. Zur Klonierung von kleinen RNA-Molekülen wurde das mirVana™ miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet, das eine Anreicherung von kleinen RNA-Molekülen ermöglicht.

RNA-Extraktion mit dem Tri-Reagenz

Die RNA-Extraktion mit dem Tri-Reagenz (Sigma, Taufkirchen) beruht auf dem Prinzip der Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform Methode und ermöglicht die gleichzeitige Gewinnung von RNA, DNA und Proteinen (Chomczynski & Sacchi, 1987). Die Extraktion der RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden 0,2 g Blattmaterial von einem gesunden Blatt (ohne Hauptnerv) in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit einer Wolfram-Karbon-Metallkugel überführt und in flüssigem N₂ schockgefroren. Das Gewebe wurde in einer Zelmühle für 1 Min. bei 30 Hz homogenisiert und erneut in flüssigem N₂ überführt. Nach Zugabe von 1 ml Tri-Reagenz wird das homogenisierte Gewebe durch auf- und absaugen mit der Pipette weiter zerkleinert. Die Proben wurden für 5 Min. bei RT inkubiert und anschließend mit 1/5 Vol. Chloroform versetzt und für 10 Min. bei RT unter Schütteln inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation für 15 Min. bei 17.900 g_{av} und der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erfolgter Fällung mit 1,5 Vol. Isopropanol für 30 Min. bei RT wurde die Probe für 30 Min. bei 17.900 g_{av} und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (80 %) gewaschen. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet 15 Min. bei RT getrocknet und in 20-50 µl RNA Storage Solution (Applied Biosystems, Darmstadt) aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C und die Quantifizierung über eine Messung mit dem Spektralphotometer und einer elektrophoretischen Auftrennung der RNA auf einem TBE-Kontrollgel (1 %).

RNA-Extraktion mit dem mirVana™ miRNA Isolation Kit

Die RNA-Extraktion mit dem mirVana™ miRNA Isolation Kit (Biosystems, Darmstadt) ermöglicht eine schnelle und effiziente Methode zur Anreicherung von kleinen RNA-Molekülen bis ~ 200 nt. Diese Methode vereint die saure Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode sowie die Anreicherung von kleinen RNA-Molekülen über eine Kombination von Glasfaserfilter und unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen - lange RNA-Moleküle werden bei einer niedrigen Ethanolkonzentration (25 %) auf dem Glasfaserfilter gebunden und von den kleinen RNA-Molekülen, die sich im Filtrat befinden, getrennt. Die langen RNA-Moleküle können anschließend durch die Erhöhung der

Ethanolkonzentration (55 %) von dem Glasfaserfilter isoliert werden. Die RNA-Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.22 Nachweis von sRNA-Molekülen über Northern Blot-Analysen

Der Nachweis von sRNA-Molekülen erfolgte über den sRNA-Northern Blot. Im Gegensatz zum Northern-Blot wurden zur Auftrennung der sRNA-Moleküle 20 %ige TBE-Polyacrylamidgele verwendet.

Zunächst wurden 10 µg Gesamt-RNA mit 1 Vol. TBE-Harnstoff-Puffer versetzt und bei 65°C denaturiert. Die Proben wurden auf ein 20 % TBE-Polyacrylamidgel (Anamed, Groß-Bieberau) geladen. Die Elektrophorese erfolgte in einer XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen, Karlsruhe) bei 100 V in 0,5 x TBE-Puffer. Die RNA wurde im Anschluss über einen elektrophoretischen Transfer mit der Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell (Bio-Rad, München) auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Applied Biosystems, Darmstadt) übertragen. Der Transfer erfolgte in 1 x TBE-Puffer für eine Stunde bei 350 mA im Kühlraum, anschließend wurde die Membran mit 2 x SSC gewaschen und die RNA auf einem Transilluminator bei 240 mJ/cm² auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung erfolgte in 25 ml PerfectHyb™ Plus Hybridization Buffer (Sigma, Taufkirchen). Nach Zugabe des radioaktiv-markierten DNA-Oligonukleotides (siehe Kap. 2.2.1.16) erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 42°C im Hybridisierungsöfen. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für 30 Min. mit je 25 ml Waschpuffer bei 50°C gewaschen und anschließend über die Autoradiographie mit Phosphoreszenzspeicherplatten analysiert.

10 x TBE-Puffer	890	mM	Tris-Base
	890	mM	Borsäure
	20	mM	EDTA

2 x TBE-Harnstoff-Puffer	0,5	x	TBE-Puffer
	12	% (w/v)	Ficoll 400
	0,01	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,05	% (w/v)	Xylencyanol
	7	M	Harnstoff

Waschpuffer	2	x	SSC
	2	% (w/v)	SDS

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinextraktion aus Pflanzen

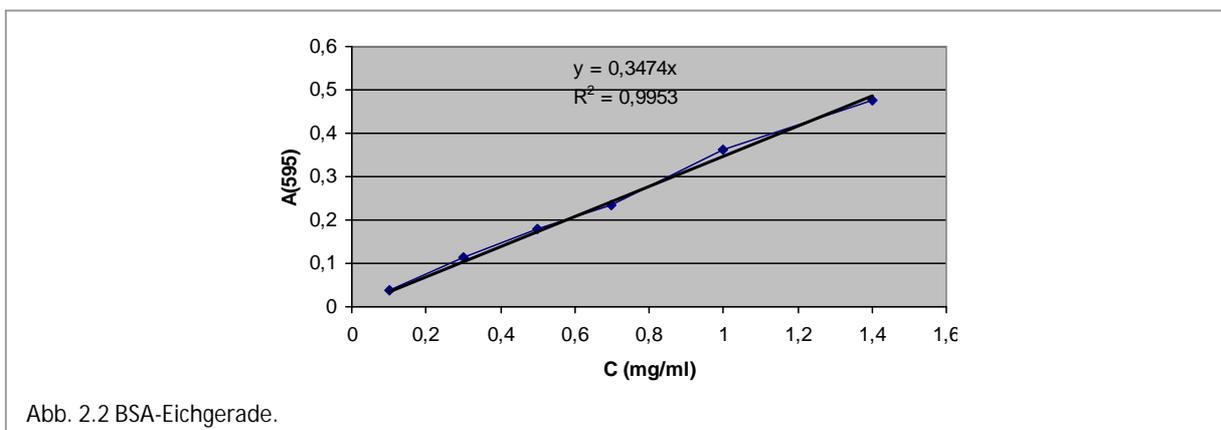
Zur Isolation von Gesamt-Proteinen aus Pflanzen wurde zunächst 100 mg Blattmaterial abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Blattmaterial wurde mit 1 Vol. Extraktionspuffer und Proteaseinhibitoren Complete, EDTA-free (Roche, Mannheim) versetzt und mit Hilfe eines Mikropistills homogenisiert. Die Proben wurden 15 Min. bei 17.900 g_{av} bei 4°C zentrifugiert und vom Zelldebris getrennt. Es erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford und die Analyse über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung oder Western Blot Analyse. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -20°C.

Extraktionspuffer	83 mM	Tris-Cl; pH 7,5
	0,8 mM	MgCl ₂
	66 mM	KCl
	100 mM	NaCl
	0,02 % (v/v)	Tween 20
	10 mM	DTT

2.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die durch Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine hervorgerufene Veränderung ihres Absorptionsverhaltens kann bei einer A₅₉₅ mit Hilfe eines Spektralphotometers gemessen werden, durch das sich mittels einer Eichgeraden die Gesamtprotein-Konzentration ermitteln lässt.

Es wurden zunächst 5 µl des Gesamtproteinextrakts in 795 µl H₂O pipettiert und anschließend 200 µl Bradford-Reagenz (Sigma, Taufkirchen) hinzugegeben. Die Proben wurden in eine 1,5 ml Küvette überführt und mit Hilfe eines Spektralphotometers die Absorption bestimmt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden BSA-Lösungen in Konzentrationen von 0,1-1,4 µg/µl verwendet.



2.2.2.3 Reinigung von HA-Fusionsproteinen

Die Reinigung des HA-Fusionsproteins aus Gesamtproteinextrakten von transgenen Pflanzen erfolgte mit Hilfe der Anti-HA-Agarose (Sigma, Taufkirchen). Zunächst wurden die Gesamt-Proteine aus 1 g Blattmaterial mit 1 Vol. Extraktionspuffer extrahiert. Dem Proteinextrakt wurden 50 µl der Anti-HA-Agarose Suspension zugegeben, danach folgte eine Inkubation für drei Stunden auf einem Schüttler bei 4°C. Das Gemisch wurde auf eine Polypropylensäule überführt und der Durchfluss wurde verworfen. Die Anti-HA-Matrix wurde vier Mal mit je 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift erfolgten die Zugabe von 100 µl HA-Peptid (Sigma, Taufkirchen) im Extraktionspuffer (100 ng/µl) und eine Inkubation über Nacht bei 4°C zur Elution des Fusionsproteins.

10 x PBS	27	mM	KCl
	1,4	M	NaCl
	81	mM	Na ₂ HPO ₄
	15	mM	KH ₂ PO ₄

2.2.2.4 Gelfiltration des Arabidopsis-Gesamtproteinextrakts und Dialyse

Zunächst erfolgte eine Proteinextraktion wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. 15 g Blattmaterial wurden in ½ Vol. Extraktionspuffer homogenisiert und durch Zentrifugation von Zellresten getrennt. Um eine Blockierung der Gelfiltrationssäule durch pflanzliche Organellen und Blattpigmente zu vermeiden, wurde zusätzlich eine Chloroform-Extraktion des Proteinextraktes durchgeführt. Die Gelfiltration wurde mit dem Extraktionspuffer (ohne DTT) mittels des ÄKTAprime™ plus-Systems (GE Healthcare, München) und einer vorgepackten Säule (HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare, München) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gesammelten Fraktionen (je 1 ml) wurden anschließend nach „Peaks“ zusammengefasst und das Volumen unter Verwendung von Dialysebeuteln (Sartorius, Göttingen) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa reduziert. Die funktionelle Analyse erfolgte durch Einsatz der Fraktionen in Gelshift-Experimenten.

2.2.2.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der denaturierenden SDS-PAGE (Laemmli, 1970) können gelöste Polypeptide und Proteine aus heterogenen Suspensionen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Proteine werden in Gegenwart von 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgrund des Molekulargewichtes in Richtung Anode getrennt. Durch eine Hitzedenaturierung der Polypeptide in einem SDS-haltigen Probenpuffer wird die Eigenladung der Proteine durch das anionische Detergenz überdeckt. Es handelt sich dabei um einen proportionalen Zusammenhang, bei dem die Nettoladung der Proteine (Ladung pro Gewichtseinheit) gleich ist und eine elektrophoretische Auftrennung nach dem

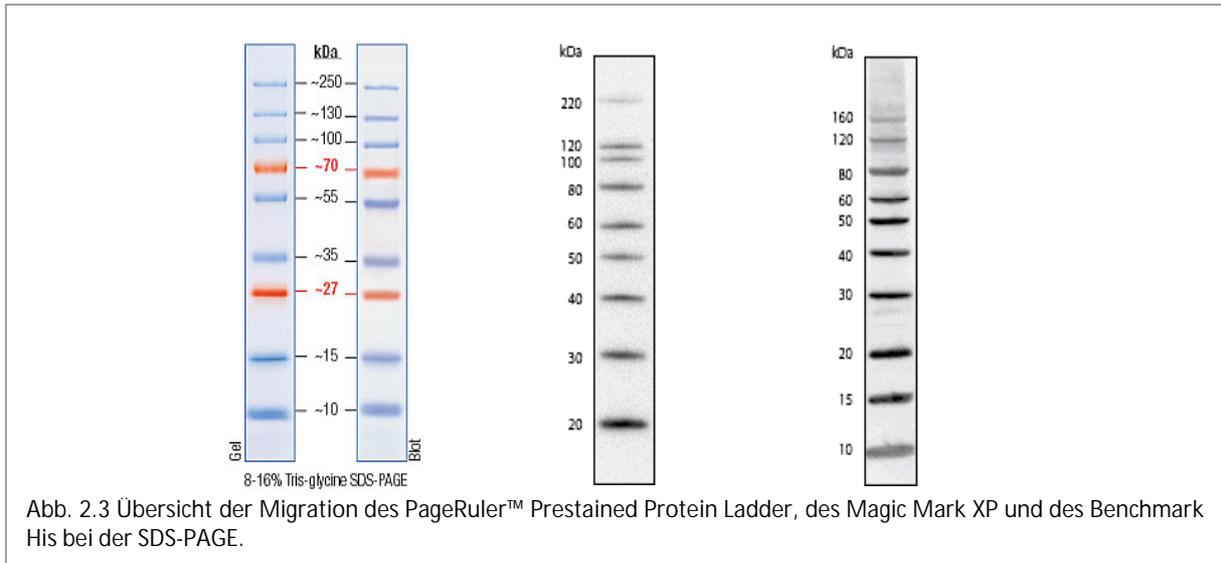
Größenprinzip stattfinden kann. Des Weiteren werden Disulfidbrücken in den Polypeptidketten durch niedermolekulare Thiole wie Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol (β -ME) reduziert. Zunächst wurden 10 μ g Gesamtprotein mit 1 Vol. 3 x Probenpuffer gemischt und für 10 Min. bei 95°C hitzedenaturiert. Es erfolgte die Gelelektrophorese mit 9 % Vario-Fertiggelen (Anamed, Groß-Bieberau) in einer XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen, Karlsruhe) oder selbst hergestellten Polyacrylamidgelen in einer Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad, München) gemäß den Angaben des Herstellers der Elektrophoreseapparatur. Die Gelzusammensetzung der selbst hergestellten Gele mit Dimensionen von 0,75 mm x 7,3 cm x 8,3 cm und unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen ist in nachfolgender Tabelle aufgeführt:

Gelzusammensetzung	Acrylamidkonzentrationen			
	Sammelgel	Trenngel		
		4 %	10 %	15 %
30 % Acrylamid-Lösung [ml]	0,31	2,1	3,2	3,7
Sammel-/Trenngelpuffer [ml]	0,31	1,6	1,6	1,6
H ₂ O [ml]	1,81	1,95	1,5	1
10 % APS [μ l]	25	60	60	60
TEMED [μ l]	5	8	8	8

Tab 2.22 Übersicht der Gelzusammensetzung für Polyacrylamidgele mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration.

Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5	M	Tris-Cl; pH 8,8
	0,4	% (w/v)	SDS
Sammelgelpuffer (pH 6,7)	0,5	M	Tris-Cl; pH 6,7
	0,4	% (w/v)	SDS
3 x Probenpuffer (pH 6,8)	65	mM	Tris-Cl; pH 6,8
	20	% (v/v)	Glycerin
	10	% (v/v)	β -Mercaptoethanol
	4	% (w/v)	SDS
	0,2	% (w/v)	Bromphenolblau

Für die Elektrophorese wurden zunächst die Gele nach Anleitung des Herstellers vorbereitet, in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit dem Laufpuffer versehen. Die Geltaschen wurden ausgespült und die Proben in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (130-180 V) für ca. 1 Std. in 1 x Tris-Glycin-Laufpuffer. Als Größenstandard dienten der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) sowie der Magic Mark XP bzw. der Benchmark His (Invitrogen, Karlsruhe).



10 x Tris-Glycin-Laufpuffer (pH 8,3)	0,25 M	Tris-Cl; pH 8,3
	2 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS

2.2.2.6 Coomassie-Färbung

Zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 verwendet, welcher als tiefblauer Komplex unspezifisch an fast alle Proteine bindet. Die Nachweisgrenze der Färbung liegt bei 200-400 ng Protein pro Bande. In dieser Arbeit wurde die PageBlue Protein-Färbelösung (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

Zunächst wurde das Gel in einen Behälter mit 50 ml Wasser gegeben und ca. 1 Min. in einem Mikrowellengerät erhitzt (nicht kochen) und danach 4 Min. gewaschen. Der Waschschrift wurde noch zwei Mal wiederholt. Anschließend wurde das Wasser entfernt und 20 ml PageBlue Protein-Färbelösung in die Färbeschale gegeben. Nach kurzem Erhitzen in einem Mikrowellengerät (30 Sek., nicht kochen) wurde das Gel 20 Min. in der Färbelösung inkubiert. Es folgten weitere Waschschriffe in 50 ml Wasser bis zum Erreichen des gewünschten Entfärbungsgrades. Anschließend wurde das Gel fotografiert bzw. getrocknet.

2.2.2.7 Silber-Färbung

Das Prinzip der Silber-Färbung beruht auf der Ausbildung von Ag^+ -Ionen-Komplexen mit Asp-, Cys- und Glu-Resten von Proteinen. Der Ag^+ -Komplex wird anschließend durch alkalisches Formaldehyd zu Ag reduziert. Die Nachweisgrenze der Proteine liegt bei 50-100 pg Protein pro Bande. Zur Silber-Färbung wurde das FireSilver Staining Kit (Proteome Factory AG, Berlin) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.2.8 Western Blot und Immunnachweis von Proteinen

Der Western Blot dient dem Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose- oder PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membranen. Durch Inkubation spezifischer Antikörper können auf solchen Membranen Proteine von Interesse markiert und detektiert werden.

Nach erfolgter Elektrophorese wurde die Elektrophoresezelle von der Spannungsquelle getrennt und die Gelkassette entnommen. Die PVDF-Membran (Sigma, Taufkirchen) wurde mit Methanol befeuchtet und anschließend mit 1 x Transferpuffer gewaschen. Die Proteine wurden im Anschluss über einen elektrophoretischen Transfer mit der Mini-Trans-Blot electrophoretic transfer cell (Bio-Rad, München) auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Transfer erfolgte in 1 x Transferpuffer für eine Stunde bei 350 mA im Kühlraum. Die Membran wurde im Anschluss mit 1 x Marvel-Puffer gewaschen und in 10 ml Milchlösung (5 %) für 2 Std. geblockt. Es erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers in der entsprechenden Verdünnung und eine Inkubation über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Die Membran wurde ein Mal mit 1 x PBST und drei Mal mit 1 x PBS je 5 Min. gewaschen und mit 10 ml Milchlösung (5 %) und dem sekundären Antikörper eine Stunde bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Autoradiographie der Blots. Durch Zugabe von 1 ml ECL-Substrat [1 ml Substrat A; 100 µl Substrat B; 0,5 µl H₂O₂ (30 %)] auf die Membran wird durch die Peroxidase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, die Oxidation von Luminol katalysiert und eine Chemilumineszenz ausgelöst. Diese kann über einen Film gemessen werden.

Nach dem Auflegen des Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film (Roche, Mannheim) auf die Membran mit dem ECL-Substrat in einer Filmkassette erfolgte eine Exposition von 30 Sek. bis zu 5 Min. Der Film wurde anschließend entwickelt und die Banden analysiert.

1 x Marvel-Puffer	20 mM	Tris-Cl, pH 7,8
	180 mM	NaCl
Milchlösung	5 % (w/v)	Milchpulver in 1 x Marvel-Puffer
1 x PBST	0,1 % (v/v)	Tween 20 in 1 x PBS
Substrat A	100 mM	Tris-Cl, pH 8,6
	1,4 mM	Luminol
Substrat B	6,7 mM	p-Cumarinsäure in DMSO

2.2.2.9 Protein Identifizierung über Massenspektroskopie

Die Identifizierung von Proteinen wurde von der Firma Proteome Factory (Berlin) mittels MALDI-TOF-MS durchgeführt. Dazu wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung

durchgeführt und die entsprechende Proteinbande mit einer Skalpellklinge isoliert und für weitere Analysen der Firma übersandt.

2.2.2.10 Genexpression in *E. coli* – Herstellung von rekombinanten Proteinen

Mit Hilfe eines geeigneten Expressionssystems ist es möglich, große Mengen eines fremden Genproduktes in einer lebenden Zelle zu produzieren. Zu dem Expressionssystem zählen Expressionsvektoren, die für unterschiedliche Selektionsmarker, Promotoren und Fusionspartner kodieren sowie ein Organismus oder eine Zelllinie, in die der Expressionsvektor eingebracht wird. Die Expression des Gens erfolgt je nach Promoter während der gesamten Kultivierungszeit oder nachdem der Promoter von außen induziert wurde. Nach der Expression ist es erforderlich, das rekombinante Protein von den Proteinen der Wirtszelle zu trennen und aufzureinigen.

Die Konstruktion der Expressionsvektoren wird in Kapitel 2.4 beschrieben. Der dafür verwendete Vektor pMAL-c2X (NEB, Frankfurt) kodiert für ein Maltose-Bindeprotein (MBP). Die gewünschten Gene werden als Fusionsprotein mit dem MBP exprimiert und mit Hilfe von Amylose-Magnetpartikeln aufgereinigt. Im Falle des pET28b(+)-Vektors (zwei 6 x His-Tags) und des pET32a(+)-Vektors (Trx-Tag und 6 x His-Tag) (Merck, Darmstadt) erfolgt die Aufreinigung über eine Ni²⁺-NTA-Affinitätsmatrix. Die Vektoren besitzen einen tac-Promoter bzw. T7-Promoter; die Expression wird durch Zugabe von IPTG induziert.

Zunächst wurde der entsprechende *E. coli*-Stamm BL21 (DE3); BL21 (DE3) codon plus oder ArcticExpressTM(DE3) (Stratagene, Waldbronn) mit dem Expressionsplasmid transformiert. Am nächsten Tag wurden 25 ml LB-Selektivmedium mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 190 Upm kultiviert. Anschließend wurden 1.000 ml des LB-Selektivmediums mit 10 ml der Übernachtskultur beimpft und solange bei 37°C inkubiert, bis eine A₆₀₀ = 0,5-0,6 erreicht wurde. Vor der Induktion mit 1 mM IPTG wurde 1 ml der Bakterienkultur als Negativkontrolle entnommen, nach der Induktion erfolgte die Expression der Proteine bei einer vorher ermittelten Temperatur und Dauer.

Zur Ermittlung der Kultivierungsdauer und Temperatur wurde in Vorversuchen mit einem geringeren Kulturvolumen je 1 ml der induzierten Bakterienkultur nach 3, 4 und 5 Std. bei 37°C sowie nach 16 h bei 14°C entnommen und die Expression des Proteins durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung bzw. Western Blot analysiert.

Die Bakterienkultur wurde nach optimaler Inkubationszeit (meist 16 h bei 14°C) in einen Zentrifugenbecher überführt und 15 Min. bei 4.000 g_{av} und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend für die Proteinextraktion verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.2.2.11 Proteinextraktion aus E. coli

Das Bakterienpellet von 1.000 ml Kulturvolumen wurde in 15 ml BugBuster® Protein Extraction Reagent mit 5 µl Benzonase (Merck, Darmstadt) und einer Tablette Proteaseinhibitoren Complete, EDTA-free (Roche, Mannheim) aufgenommen und für 1 h bei 4°C unter leichtem Schütteln lysiert. Es erfolgte eine Zentrifugation für 15 Min. bei 9.000 g_{av} und 4°C. Sowohl der Überstand mit den löslichen Proteinen als auch das Sediment wurden anschließend analysiert. Zur Analyse geringerer Mengen wurden für das Bakterienpellet von 1 ml Kulturvolumen analog 100 µl BugBuster® Protein Extraction Reagent mit 0,5 µl Benzonase verwendet und bei 37°C für 30 Min. bzw. bei 4°C für 1 h inkubiert.

2.2.2.12 Reinigung eines MBP-Fusionsproteins

Die Reinigung des MBP-Fusionsproteins erfolgt mit Hilfe von Amylose-Magnetpartikeln (NEB, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden 250 µl der Magnetpartikelsuspension mit MBP-Puffer gewaschen und anschließend zu dem bakteriellen Proteinextrakt gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4°C unter Schütteln wurden die Magnetpartikel mit dem gebundenen MBP-Fusionsprotein über ein Magnetfeld isoliert. Es folgten drei Waschschrte mit je 1 ml MBP-Puffer und die Elution der Proteine von den Magnetpartikeln mit 500 µl MBP-Puffer und 10 mM Maltose für 15 Min. bei 4°C.

MBP-Puffer (pH 7,4)	20	mM	Tris-Cl, pH 7,4
	200	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	1	mM	DTT

2.2.2.13 Reinigung von His-Fusionsproteinen

Die mit sechs Histidinresten fusionierten Proteine wurden mit Hilfe einer Ni²⁺-NTA-Affinitätsmatrix unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Zunächst wurden 100 µl Ni-NTA Superflow Suspension (Qiagen, Hilden) zu dem bakteriellen Proteinextrakt gegeben und für eine Stunde bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Das Gemisch wurde in eine Polypropylensäule überführt und der Durchfluss verworfen. Durch dreimaliges Waschen der Matrix mit dem Waschpuffer wurden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer und einer Inkubation über Nacht bei 4°C.

Waschpuffer (pH 8,0)	50	mM	NaH ₂ PO ₄
	300	mM	NaCl
	20	mM	Imidazol

Elutionspuffer (pH 8,0)	50	mM	NaH ₂ PO ₄
	300	mM	NaCl
	250	mM	Imidazol

Sollte das Expressionsprodukt schwer löslich sein und in Form von inclusion bodies vorliegen, besteht die Möglichkeit der Reinigung unter denaturierenden Bedingungen durch Zugabe von 6 M Guanidiniumhydrochlorid oder 8 M Harnstoff und einer anschließenden Aufreinigung über eine Ni²⁺-NTA-Affinitätsmatrix. Die Reinigung erfolgte nach den Protokollen des QIAExpressionist (Qiagen, Hilden).

2.2.2.14 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Der in vitro Nachweis von Protein-RNA-Wechselwirkungen erfolgte mit Hilfe des EMSA. In dieser Arbeit wurde die Bindungskapazität der HC-Pro von synthetischen kleinen RNA-Molekülen analysiert. Nach der Inkubation von Proteinen mit einem synthetischen RNA-Doppelstrang erfolgt die Auftrennung über ein Polyacrylamidgel, wobei RNA-Protein-Komplexe langsamer wandern als nicht gebundene RNA-Moleküle. Die Banden können über eine radioaktive Markierung der RNA-Moleküle sichtbar gemacht werden.

Zunächst wurden die synthetischen RNA-Oligonukleotide (Sigma, Taufkirchen; Tab. 2.8) am 5'-Hydroxyl-Ende mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert. Es wurden jeweils zwei Reaktionen durchgeführt, bei denen entweder ein radioaktives Substrat [γ -³²P]-ATP (Perkin Elmer, Rodgau) oder ein nicht-radioaktives Substrat (100 mM ATP) für die Markierung verwendet wurde. Der Reaktionsansatz wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert.

radioaktiv markierter RNA-Strang		
Komponente	Menge	
RNA-Oligonukleotid (sense)	250	ng
[γ - ³² P]ATP (6000 μ Ci/mmol)	1	μ l
10 x T4 PNK-Puffer A	2	μ l
T4-Polynukleotidkinase (10 U/ μ l)	1	μ l
RNase-Inhibitor (40 U/ μ l)	0,5	μ l
nuklease-freies H ₂ O	X	μ l
	<u>20</u>	<u>μl</u>

Tab 2.23 Übersicht des Reaktionsansatzes einer radioaktiven Endmarkierung von RNA-Oligonukleotiden.

nicht-radioaktiv markierter RNA-Strang		
Komponente	Menge	
RNA-Oligonukleotid (antisense)	200	ng
ATP (100 mM)	0,3	μ l
10 x T4 PNK-Puffer A	2	μ l
T4-Polynukleotidkinase (10 U/ μ l)	1	μ l
RNase-Inhibitor (40 U/ μ l)	0,5	μ l
nuklease-freies H ₂ O	X	μ l
	<u>20</u>	<u>μl</u>

Tab 2.24 Übersicht des Reaktionsansatzes einer Endmarkierung von RNA-Oligonukleotiden.

Die Reaktionsansätze wurden eine Stunde in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Zur Bildung des synthetischen sRNA-Doppelstranges wurden die beiden Reaktionsansätze vereint (40 µl) und in einem Becherglas mit 400 ml heißem Wasser (94°C) solange inkubiert, bis das Wasserbad auf RT abgekühlt ist.

Die Aufreinigung der siRNA-Moleküle erfolgte über ein 12 % TBE Polyacrylamidgel in einer MINI-Vertikal Doppel-Elektrophorese-Kammer (Roth, Karlsruhe) gemäß den Angaben des Herstellers der Elektrophoreseapparatur. Die Gelzusammensetzung der selbst hergestellten Gele mit Dimensionen von 10 cm x 10 cm x 1,5 mm und unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen ist in nachfolgender Tabelle aufgeführt:

Gelzusammensetzung	Acrylamidkonzentrationen			
	5 %	10 %	12 %	15 %
40 % Acrylamid [ml]	2,5	5	6	7,5
10 x TBE-Puffer [ml]	1	1	1	1
H ₂ O [ml]	16,3	13,8	12,8	11,3
TEMED [µl]	8	8	8	8
10 % APS [µl]	200	200	200	200

Tab 2.25 Übersicht der Gelzusammensetzung für TBE Polyacrylamidgele mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration.

Nach dem Polymerisieren wurde die Gelkassette in die Gelelektrophorese-Apparatur nach Anleitung des Herstellers eingesetzt und mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllt. Die sRNA-Proben wurden mit 10 µl sterilem 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und in eine Geltasche (50 µl) pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 70 V bis die Bromphenolblau-Bande ca. 3 cm auf dem Gel gewandert ist.

Nach erfolgter Elektrophorese wurde die Glasplatte entfernt und die Teflonplatte mit dem Gel auf eine größere Glasplatte gelegt und mit Folie umwickelt. In der Dunkelkammer wurde das Gel zwei Min. auf einen Film gelegt und die Position des Gels auf dem Film markiert. Nach der Entwicklung des Films wurde dieser an die richtige Position des Gels gebracht und mit Hilfe einer Nadel die Eckpunkte der sRNA-Bande markiert. Die entsprechende Bande konnte anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert werden.

Zur Extraktion der sRNA wurde die ausgeschnittene Bande halbiert und anschließend jedes Gelstück mit Hilfe eines Mikropistills in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 1 ml 2 x PK-Puffer homogenisiert und über Nacht bei RT unter Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Gelsuspension 2 x bei 17.900 g_{av} für 5 Min. zentrifugiert und der Überstand anschließend zu je 500 µl in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Jedem Aliquot wurden 1 µl Glycogen (20 mg/µl; Fermentas, St. Leon-Rot) zugesetzt und anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung. Die RNA wurde in 50 µl sterilem H₂O aufgenommen.

2 x PK-Puffer	100	mM	Tris-Cl, pH 8,0
	25	mM	EDTA
	300	mM	NaCl
	2	%	SDS

Die EMSA erfolgten mit den aufgereinigten MBP-Fusionsproteinen aus *E. coli* oder mit Gesamt-Proteinextrakten aus *Agrobacterium*-infiltrierten Pflanzen.

Dazu wurden 0,5 µl des markierten synthetischen sRNA-Doppelstranges in 100 µl Extraktionspuffer verdünnt und anschließend 5 µl für eine Bindungsreaktion verwendet. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 15-20 µl im Extraktionspuffer und mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen durchgeführt. Nach einer Inkubation für 30 Min. bei RT wurden die Proben mit 2 µl 6 x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte auf einem 5 % TBE Polyacrylamidgel in 1 x TBE-Puffer. Nach dem Vorlauf des Gels für 30 Min. bei 50 V im Kühlraum wurde das Gel beladen und die Proben zunächst bei 10 V in das Gel einlaufen lassen. Die Elektrophorese erfolgte danach bei 60-70 V für 2 Std. Nach der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und eine Phosphoreszenzspeicherplatte über Nacht exponiert. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers.

2.2.3 Kultur und Transformation von Pflanzen

2.2.3.1 Präparation kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Zur Herstellung chemokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen wurde die freeze-thaw Methode verwendet. Der relativ einfachen und schnellen Ausführung steht eine geringe Transformationsrate von ca. 10^{-3} Transformanten pro µg DNA gegenüber.

Zunächst wurde eine Einzelkolonie des *A. tumefaciens*-Stamms in 3 ml LB-Medium über Nacht bei 28°C und 160 Upm kultiviert. Am nächsten Tag wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und bei 28°C und 160 Upm bis zu einer $A_{600} = 0,3$ kultiviert. Anschließend wurde die Kultur für 15 Min. auf Eis abgekühlt und für 5 Min. bei $4.000 \times g_{av}$ und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde danach in 10 ml einer sterilen und eiskalten 100 mM $MgCl_2$ -Lösung aufgenommen und für 1 Std. auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation (5 Min., $4.000 \times g_{av}$, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 2 ml einer sterilen und eiskalten 20 mM $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen und für 2 Std. auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde Glycerin (87 %) zu einer Endkonzentration von 20 % (v/v) der Bakteriensuspension zugesetzt und diese in Aliquots von 50 µl bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Transformation der kompetenten *A. tumefaciens*-Zellen

Die kompetenten *A. tumefaciens*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend 1 µg der Plasmid-DNA zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Transformationsansatz für 1 Min. in flüssigen

N₂ getaucht und danach entweder für 5 Min. bei 37°C oder für 90 Sek. bei 42°C inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl SOC-Medium erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 28°C und 160 Upm.

2.2.3.3 Selektion transformierter *A. tumefaciens*-Zellen

Der Reaktionsansatz wurde nach dem einstündigen Wachstum auf eine LB-Platte, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion rekombinanter Klone enthält, ausplattiert und im Brutschrank bei 28°C für 2 Tage kultiviert. Wie auch bei den transformierten *E. coli*-Zellen können nur die Zellen, die ein rekombinantes Plasmid mit dem entsprechenden Resistenzgen aufgenommen haben, auf dem Antibiotikum-haltigen Medium wachsen. In Tab. 2.26 sind die Konzentrationen der Antibiotika, die zur Selektion rekombinanter Klone benötigt wurden, aufgeführt.

Antibiotikum	Endkonzentration	Abkürzung	Resistenzgen
Kanamycin	50 µg/ml	LB _{Km50}	nptII
Rifampicin	100 µg/ml	LB _{Rif100}	rpoB-Mutation
Streptomycin	100 µg/ml	LB _{Sm100}	AadA (Strep/Spec ^R)-Gen
Spectomycin	100 µg/ml	LB _{Sp100}	AadA (Strep/Spec ^R)-Gen

Tab. 2.26 Übersicht der verwendeten Antibiotika zur Selektion rekombinanter Klone, deren Endkonzentrationen, Abkürzungen und die jeweiligen Resistenzgene.

2.2.3.4 Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens*-Zellen

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens*-Zellen erfolgt mit Hilfe des Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega, Mannheim). Dazu wurden die entsprechenden Bakterienklone in 10 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum für 1-2 Tage bei 28°C kultiviert. Nachdem die Kultur für 5 Min. bei 4.000 g_{av} zentrifugiert wurde, erfolgte die Plasmidisolierung nach Angaben des Herstellerprotokolls. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde anschließend in einen *E. coli*-Stamm transformiert, um ein reines Plasmid für weitere Analysen (Sequenzierung, Restriktionsanalyse) zu erhalten. Dazu wurden 10 µl der Plasmid-DNA für die Transformation eingesetzt.

2.2.3.5 Aussaat und Anzucht von *N. benthamiana*-Pflanzen

Zunächst wurden *N. benthamiana*-Samen auf angefeuchteter Fruhstorfer Einheitserde Typ P in einer Plastikschiene ausgesät und mit einem Plastikdeckel vor Austrocknung geschützt. Nach einer Woche wurden die Keimlinge in 10er Töpfe mit Fruhstorfer Einheitserde Typ T pikiert. Das Wachstum erfolgte im Gewächshaus bei einer konstanten Temperatur von 25°C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Std./12 Std., mit Standardtageslichtbedingungen. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 55 %.

2.2.3.6 Transiente Transformation von *N. benthamiana*-Pflanzen

Zur transienten Transformation von *N. benthamiana*-Pflanzen wurde die Agrobakterien-Infiltrationsmethode angewendet. Dazu wurden junge, 4-6 Wochen alte Pflanzen verwendet, die 24 Std. vor der Transformation nicht mehr bewässert wurden. Zunächst wurde eine 15 ml Kultur der Agrobakterien, die mit einem binären Vektor transformiert wurden, in einem 50 ml Kolben 1-2 Tage bei 28°C inkubiert. Die Agrobakterien-Kultur wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 Min. bei 4.000 g_{av} zentrifugiert. Zum Einstellen einer A₆₀₀ = 0,5-1,0 erfolgte die Aufnahme des Bakterienpellets in 5-15 ml Infiltrationsmedium. Anschließend wurden die Bakterien für 2 Std. bei RT inkubiert.

Infiltrationsmedium (pH 5,8)	10 mM	MES; pH 5,8
	10 mM	MgCl ₂
	200 mM	Acetosyringon

Die Infiltration erfolgte mit Hilfe einer 2 ml Spritze ohne Nadel. Dazu wurde die Spritze mit der Bakteriensuspension auf die Unterseite der Blätter aufgesetzt und die Bakteriensuspension unter leichtem Gegendruck eingespritzt. Nach 3-5 Tagen wurden Blattproben entnommen und die entsprechenden Proteine bzw. RNA konnten analysiert werden.

2.2.3.7 Anzucht von *N. benthamiana*-Pflanzen unter sterilen Bedingungen

Die Samen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 500 µl Ethanol (70 %) wurde zugegeben und maximal eine Minute inkubiert. Danach wurden die Samen in 700 µl Natriumhypochlorid (5 %) überführt und 10 Min. unter Schütteln inkubiert. Es erfolgten anschließend drei Waschschrte mit je 1 ml sterilem H₂O. Die Samen wurden auf MS-Agarplatten verteilt und in der Klimakammer kultiviert. Bei transgenen Samen wurde den MS-Agarplatten das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

MS-Agarplatten zur Regeneration	2 %	Saccharose
	0,48 %	MS-Fertigmedium
	0,75 %	Plant-Agar

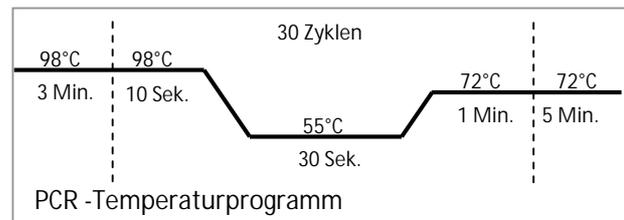
2.2.4 Konstruktion der Expressionsvektoren

2.2.4.1 Herstellung des Vektors pET28b(+):HC-Pro

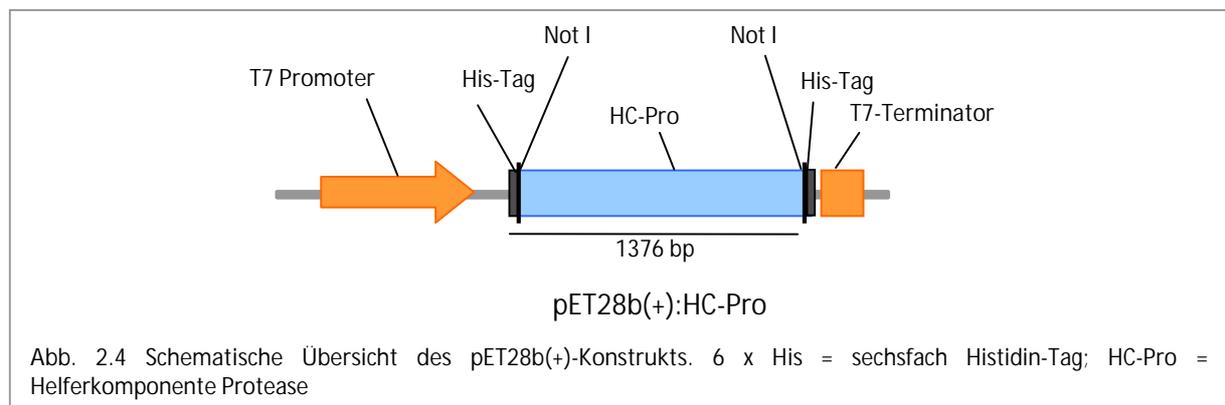
Die Gelshift-Analysen und weitere Untersuchungen erforderten die bakterielle Expression der HC-Pro. Die kodierende Sequenz der HC-Pro wurde dazu in unterschiedliche bakterielle Expressionsvektoren kloniert und anschließend in verschiedenen E. coli-Stämmen exprimiert.

Der pET28b(+)-Vektor ermöglicht die Expression des Proteins mit einem N-terminalen 6 x His-Tag.

Dazu wurde der pET28b(+)-Vektor zunächst mit dem Restriktionsenzym NotI linearisiert. In einer PCR wurde die HC-Pro kodierende Sequenz aus dem pKB:biNLS-HC-Pro-GFP amplifiziert. Der 5'-Primer (HC-Pro



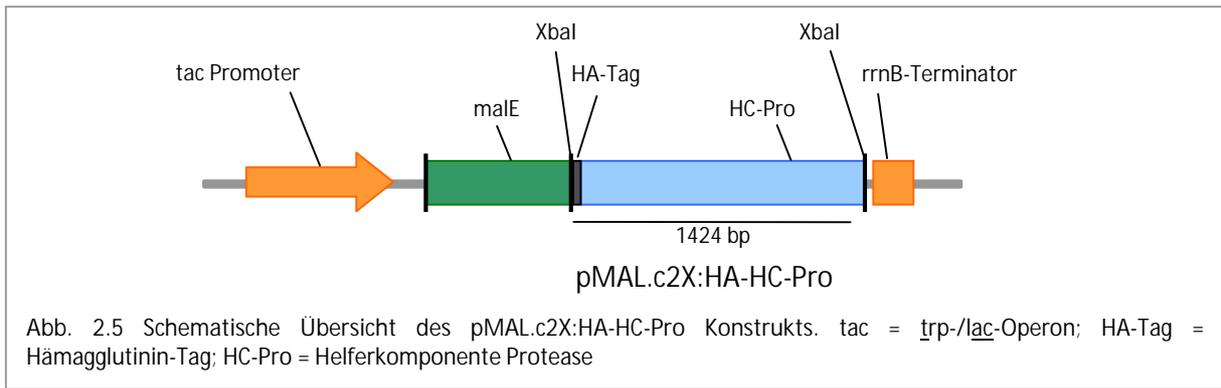
XbaI-NotI_F) überspannte 19 bp der HC-Pro kodierenden Sequenz und umfasste eine XbaI- und NotI-Schnittstelle für die Klonierung. Der 3'-Primer (HC-Pro XbaI-NotI_R) besaß ebenfalls eine XbaI- und NotI-Schnittstelle und überspannte 20 bp des HC-Pro-Gens. Das PCR-Fragment wurde mit NotI geschnitten und in den ebenfalls mit NotI linearisierten pET28b(+)-Vektor kloniert.



2.2.4.2 Herstellung des Vektors pMAL.c2X:HA-HC-Pro^{FRNK}

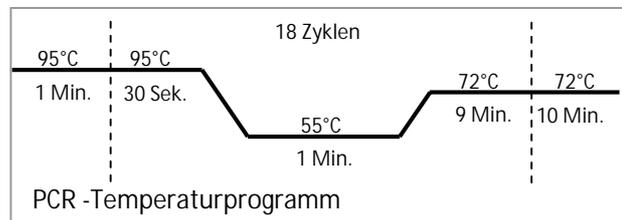
Ein weiterer bakterieller Expressionsvektor pMAL.c2X ermöglichte die Fusion der HC-Pro an das C-terminale Ende eines MBP, welches von dem malE-Gen kodiert wird.

Die HA-HC-Pro^{FRNK} kodierende Sequenz wurde aus dem pUC57:HA-HC-Pro-Vektor mit dem Restriktionsenzym XbaI isoliert und in den ebenfalls mit XbaI linearisierten pMAL.c2X-Vektor gerichtet und stromabwärts des malE-Gens eingefügt.



2.2.4.3 Herstellung des Vektors pMAL.c2X:HA-HC-Pro^{FINK}

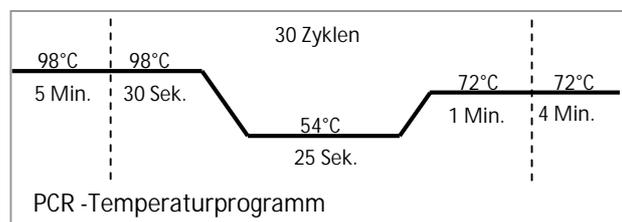
Auf dem pMAL.c2X:HA-HC-Pro^{FINK}-Vektor wurde eine gerichtete Mutagenese mit den komplementären Primern FINK mut_F und FINK mut_R durchgeführt. Durch das Primerpaar wurden zwei Basenaustausche in der Sequenz vorgenommen, die zum Austausch der AS Arg-180 zu Ile-180 im HC-Pro-Proteins führten. Zusätzlich entstand durch die Mutagenese eine neue Asel-Schnittstelle für die Selektion positiver Klone.



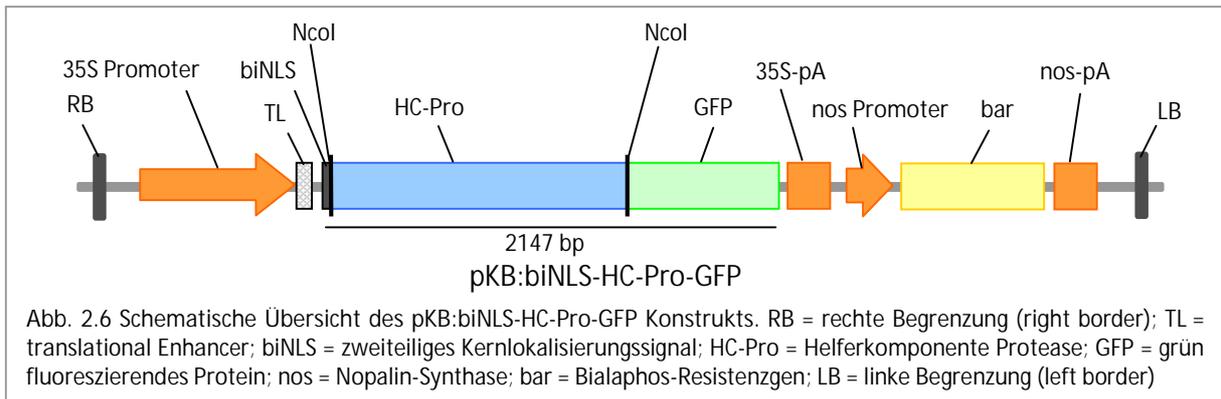
2.2.4.4 Herstellung des Vektors pKB:biNLS-HC-Pro-GFP

Zur Herstellung bakterieller Expressionsvektoren, die zur Expression von HA-HC-Pro-GFP-Fusionsproteinen dienen, musste die HC-Pro kodierende Sequenz zunächst stromaufwärts des GFP-Gens in den pKB-biNLS-GFP zwischenkloniert werden. Dazu wurde eine PCR mit der Phusion-Polymerase auf dem pUC57-HA-HC-Pro-Vektor durchgeführt, um das vollständige offene Leseraster der HC-Pro zu amplifizieren.

Der 5'-Primer (HC-Pro NcoI_F) überspannte 19 bp der HC-Pro kodierenden Sequenz und besaß eine NcoI-Schnittstelle für die Klonierung. Der 3'-Primer (HC-Pro NcoI_R)



überspannte 19 bp des HC-Pro-Gens ohne das Stop-Codon und besaß ebenfalls eine NcoI-Schnittstelle. Das 1391 bp große DNA-Fragment konnte in den mit NcoI linearisierten pKB:biNLS-GFP-Vektor zwischen die biNLS- und GFP-Sequenz kloniert werden. Im Anschluss wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen BstXI und Sall durchgeführt, um die Orientierung des HC-Pro-Fragments zu überprüfen. Im Falle der sense-Orientierung wurden zwei Fragmente mit einer Größe von 9732 bp und 1494 bp erwartet.

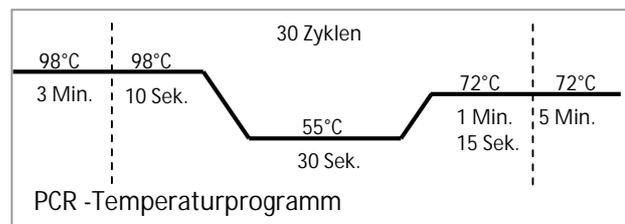


2.2.4.5 Herstellung des Vektors pMAL.c2X:HA-HC-Pro-GFP

Die Analyse der autoproteolytischen Aktivität der HC-Pro erfolgte mit Hilfe von bakteriell exprimierten Proteinen, bei denen an das C-terminale Ende der HC-Pro ein GFP-Protein fusioniert wurde.

Die HC-Pro-GFP kodierende Sequenz wurde aus dem pKB:biNLS-HC-Pro-GFP-Vektor amplifiziert.

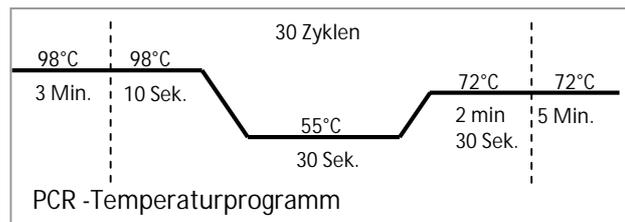
Durch die Primer pKB-HA-HC-Pro KpnI_F und pKB-GFP XbaI_R wurden eine KpnI-Schnittstelle und eine HA-Tag kodierende Sequenz (5'-Primer), sowie eine XbaI-Schnittstelle (3'-Primer) eingebracht. Das



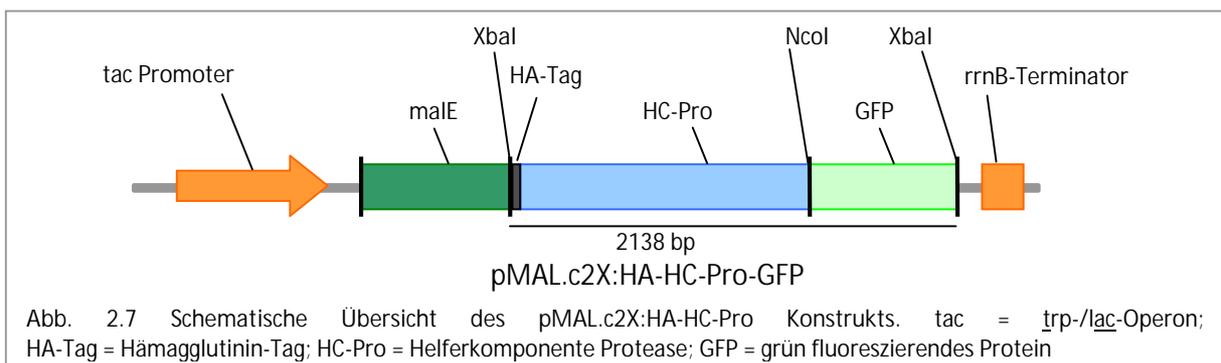
PCR-Produkt wurde in den pJET1.2/blunt-Vektor kloniert, woraus der pJET1.2:HA-HC-Pro-GFP-Vektor als Zwischenprodukt hervorging.

Über eine zweite PCR-Reaktion wurden in die HA-HC-Pro-GFP kodierende Sequenz zwei

XbaI-Schnittstellen eingefügt, die für eine Klonierung in den pMAL.c2X-Vektor erforderlich waren. Die Amplifikation erfolgte mit den Primern HA-HC-Pro XbaI_F und pKB-GFP XbaI_R. Das 2133 bp große PCR-



Fragment wurde mit XbaI geschnitten und in den mit XbaI linearisierten pMAL.c2X-Vektor kloniert.



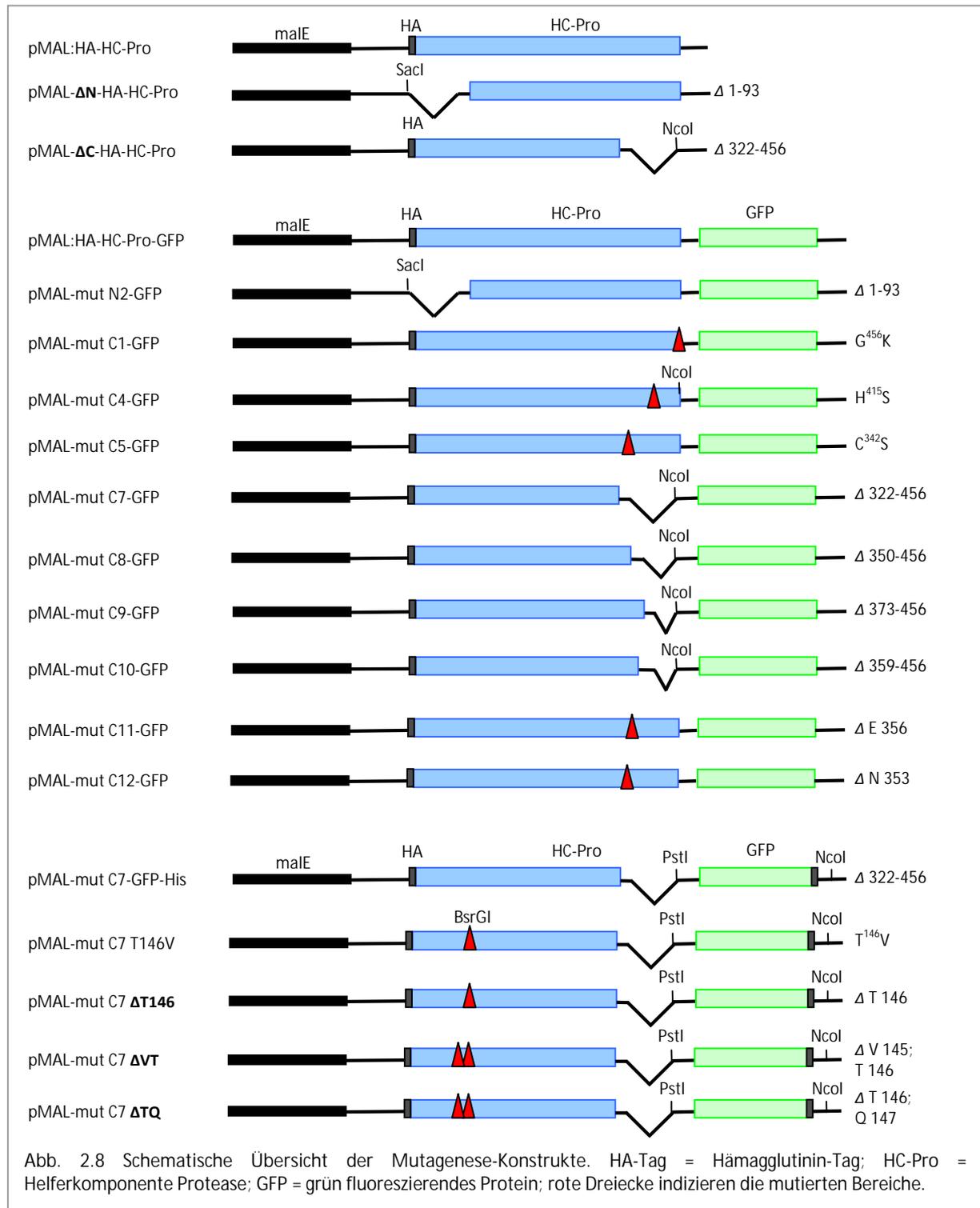
2.2.4.6 Mutagenese und HC-Pro Deletionskonstrukte in pMAL.c2X-Vektoren

Zur Analyse von verkürzten HC-Pro-Proteinen im N- bzw. C-terminalen Bereich oder Proteinen mit einem AS-Austausch wurde die HC-Pro kodierende Sequenz mutiert. Die Mutagenese wurde auf den pMAL.c2X:HA-HC-Pro- bzw. pMAL.c2X:HA-HC-Pro-GFP-Vektoren durchgeführt.

Ausgangsplasmid	Primer	Mutation AS	Schnittstelle	mutiertes Plasmid
pMAL-HA-HC-Pro	HC-Pro mut N1_F HC-Pro mut N1_R	Δ 1-93	+ SacI	pMAL- Δ N-HA-HC-Pro
pMAL-HA-HC-Pro	HC-Pro mut C6_F HC-Pro mut C6_R	Δ 322-456	+ XbaI	pMAL- Δ C-HA-HC-Pro
pMAL-HA-HC-Pro-GFP	HC-Pro mut C1_F HC-Pro mut C1_R	G ⁴⁵⁶ K		pMAL-mut C1-GFP
pMAL-HA-HC-Pro-GFP	HC-Pro mut C4_F HC-Pro mut C4_R	H ⁴¹⁵ S		pMAL-mut C4-GFP
pMAL-HA-HC-Pro-GFP	HC-Pro mut C5_F HC-Pro mut C5_R	C ³⁴² S		pMAL-mut C5-GFP
pMAL-HA-HC-Pro-GFP	HC-Pro mut C7_F HC-Pro mut C7_R	Δ 322-456	+ XbaI	pMAL-mut C7-GFP
pMAL-HA-HC-Pro-GFP	HC-Pro mut C8_F HC-Pro mut C8_R	Δ 350-456	+ XbaI	pMAL-mut C8-GFP
pMAL-HA-HC-Pro-GFP	HC-Pro mut C9_F HC-Pro mut C9_R	Δ 373-456	+ XbaI	pMAL-mut C9-GFP
pMAL-HA-HC-Pro-GFP	HC-Pro mut C10_F HC-Pro mut C10_R	Δ 359-456	+ XbaI	pMAL-mut C10-GFP
pMAL-HA-HC-Pro-GFP	HC-Pro mut C11_F HC-Pro mut C11_R	Δ E 356		pMAL-mut C11-GFP
pMAL-HA-HC-Pro-GFP	HC-Pro mut C12_F HC-Pro mut C12_R	Δ N 353		pMAL-mut C12-GFP
pMAL-HA-HC-Pro-GFP	HC-Pro mut N1_F HC-Pro mut N1_R	Δ 1-93	+ SacI	pMAL-mut N2-GFP
pMAL-mut C7-GFP-His	HC-Promut T146V_F HC-Promut T146V_R	T ¹⁴⁶ V	+ BsrGI	pMAL-mut C7 T146V
pMAL-mut C7-GFP-His	HC-Promut Δ T146_F HC-Promut Δ T146_R	Δ T 146		pMAL-mut C7 Δ T146
pMAL-mut C7 Δ T146	HC-Promut Δ V145_F HC-Promut Δ V145_R	Δ V 145		pMAL-mut C7 Δ VT
pMAL-mut C7 Δ T146	HC-Promut Δ Q147_F HC-Promut Δ Q147_R	Δ Q 147		pMAL-mut C7 Δ TQ

Tab. 2.27 Übersicht der durch Mutagenese erzeugten Plasmide sowie deren Ausgangsvektoren, verwendete Primerpaare, Änderungen der AS und neue Restriktionsschnittstellen.

Im Falle der N-terminalen Deletion wurde nach dem Einbringen einer neuen SacI-Schnittstelle ein Restriktionsverdau durchgeführt, das dabei entstehende Fragment isoliert und der Vektor wieder ligiert. Die Deletionen im C-terminalen Bereich wurden entweder durch das Einbringen eines prä-terminalen Stop-Codons in die HC-Pro kodierende Sequenz (pMAL.c2X:HA-HC-Pro) oder wie bei den N-terminalen Deletionen durch Einbringen einer zusätzlichen NcoI-Schnittstelle mit anschließender Restriktion und Ligation des Vektors erzielt (pMAL.c2X:HA-HC-Pro-GFP). In nachfolgender Tabelle sind die Ausgangsvektoren, die eingesetzten Primer und die AS-Änderungen bzw. -Deletionen aufgeführt. Die Angaben der AS-Position beziehen sich auf das HC-Pro-Protein von ZYMV.



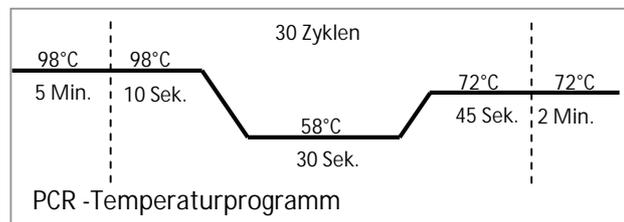
2.2.4.7 Herstellung des Vektors pMAL.c2X:HA-HC-Pro mut C7-mGFP-His

Aufgrund der Spaltung des HC-Pro-Proteins, welche durch pflanzliche und bakterielle Proteasen hervorgerufen werden könnte, wurde eine Mutante generiert, durch die man über eine N-terminale Sequenzierung des gespaltenen und über den His-Tag isolierten HC-Pro-mGFP-His-Peptides Informationen über die Spaltungsstelle erhalten konnte.

Dazu wurde der PUC19:T7-GFP-Vektor mit den Restriktionsenzymen PstI und NcoI geschnitten und das 794 bp große mGFP-His-Fragment durch eine Gelelektrophorese isoliert. Der Vektor pMAL.c2X:HA-HC-Pro mut C7-GFP wurde ebenfalls mit PstI und NcoI geschnitten, um die GFP kodierende Sequenz durch die mGFP-His kodierende Sequenz zu ersetzen.

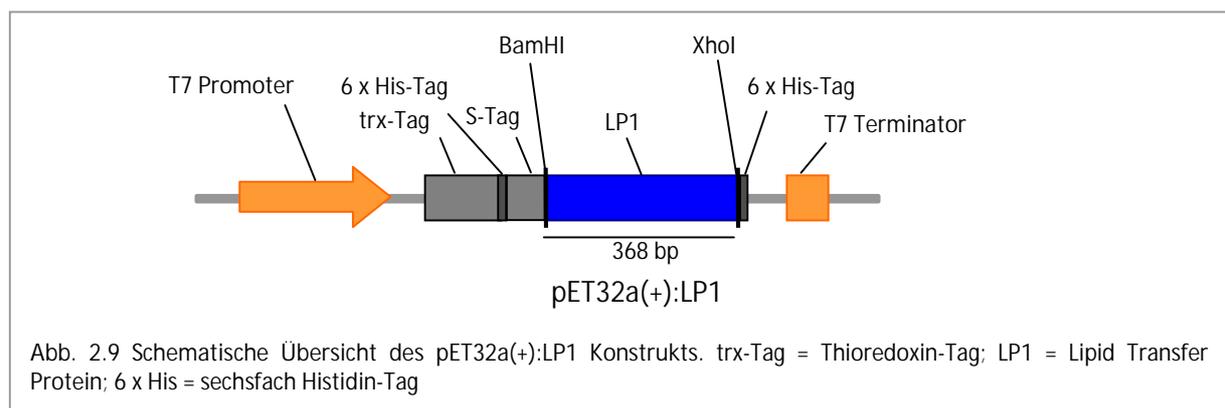
2.2.4.8 Klonierung der cDNA des Lipid-Transfer Protein 1 (LP1) aus *A. thaliana* in den pET32a(+)-Expressionsvektor

Anhand der Sequenz des LP1-Gens aus Arabidopsis (AT2G38540; NM_129411) wurden zwei Primer synthetisiert, mit welchen anschließend eine PCR auf der cDNA des LP1-Gens aus Arabidopsis durchgeführt wurde. Zunächst erfolgte eine reverse Transkription mit dem 3'-Primer LP1 clon_R, der 14 bp der LP1-Sequenz überspannte und eine XhoI-Schnittstelle für die Klonierung einfügte. Nach der reversen Transkription auf der Gesamt-RNA von Arabidopsis mit dem 3'-Primer LP1 clon_R und einer Inkubation für 1 h bei 42°C erfolgte eine PCR zusammen mit dem 5'-Primer LP1 clon_F, der 18 bp des 5'-Bereiches der cDNA



überspannte und eine BamHI-Schnittstelle in das PCR-Produkt einfügte. Das 376 bp große PCR-Produkt wurde in den pJET1.2/blunt-Vektor kloniert und anschließend sequenziert.

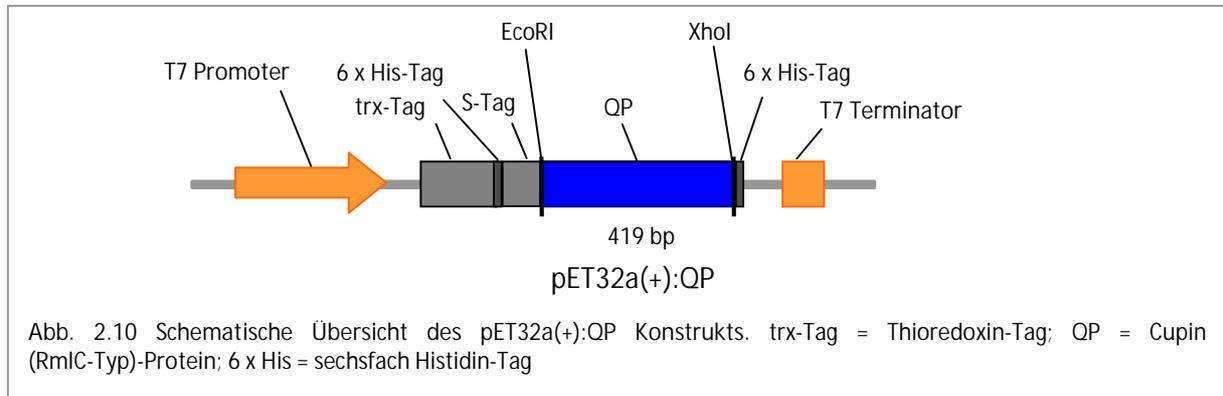
Die Klonierung erfolgte anschließend in den Vektor pET32a(+). Dazu wurde sowohl der Vektor als auch das PCR-Produkt mit BamHI und XhoI geschnitten und anschließend ligiert.



2.2.4.9 Klonierung der cDNA des RmlC-Cupin Domänen Proteins (QP) aus *A. thaliana* in den pET32a(+)-Expressionsvektor

Die Klonierung des QP-Gens aus Arabidopsis (AT4G10300; NM_117098) verlief analog zur Klonierung des LP1-Gens. Für die reverse Transkription wurde der 3'-Primer Cupin clon_R verwendet, dieser überspannte 15 bp der QP-Sequenz und fügte eine XhoI-Schnittstelle zur Klonierung ein. Im

Anschluss erfolgte eine PCR auf der cDNA, bei der zusätzlich der 5'-Primer Cupin clon_F verwendet wurde. Dieser fügte eine zusätzliche EcoRI-Schnittstelle zur Klonierung in das PCR-Produkt ein. Das 427 bp große PCR-Produkt wurde über die EcoRI- und XhoI-Schnittstellen in den pJET1.2/blunt-Vektor kloniert und anschließend sequenziert.



3. Ergebnisse

3.1 Analyse der RNA Silencing Suppressor-Aktivität von ZYMV HC-Pro^{FRNK} und HC-Pro^{FINK}

Die Aktivität der ZYMV HC-Pro als RSS konnte bereits durch einen transienten Ansatz in *N. benthamiana*-Pflanzen nachgewiesen werden (Shiboleth et al., 2007). Um die Funktionalität der pBIN:HA-HC-Pro^{FRNK}- bzw. pBIN:HA-HC-Pro^{FINK}-Konstrukte zu testen, wurde die Agrobakterien-vermittelte Infiltrationsmethode gewählt. Diese Methode bietet die Möglichkeit, die Funktion von HC-Pro unabhängig vom Kontext des gesamten viralen Genoms zu untersuchen.

Das RNA Silencing wird durch dsRNA-Moleküle ausgelöst, die in siRNAs gespalten werden und anschließend den Sequenz-spezifischen RNA-Abbau vermitteln. Zur Induktion des GFP Silencing in transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen, welche das GFP konstitutiv exprimieren (Nb-16c) (Ruiz et al., 1998), wurde in einem transienten Ansatz das pPCV702SM:GpG-Konstrukt als Positivkontrolle (Dalakouras et al., 2009) durch die Agrobacterium-vermittelte Infiltration mit dem GV3101-Stamm in die Pflanzen eingebracht. Der pPCV702SM:GpG- Vektor kodiert für eine GFP-Haarnadelschleife, die das IR-PTGS induziert (Hamilton & Baulcombe, 1999).

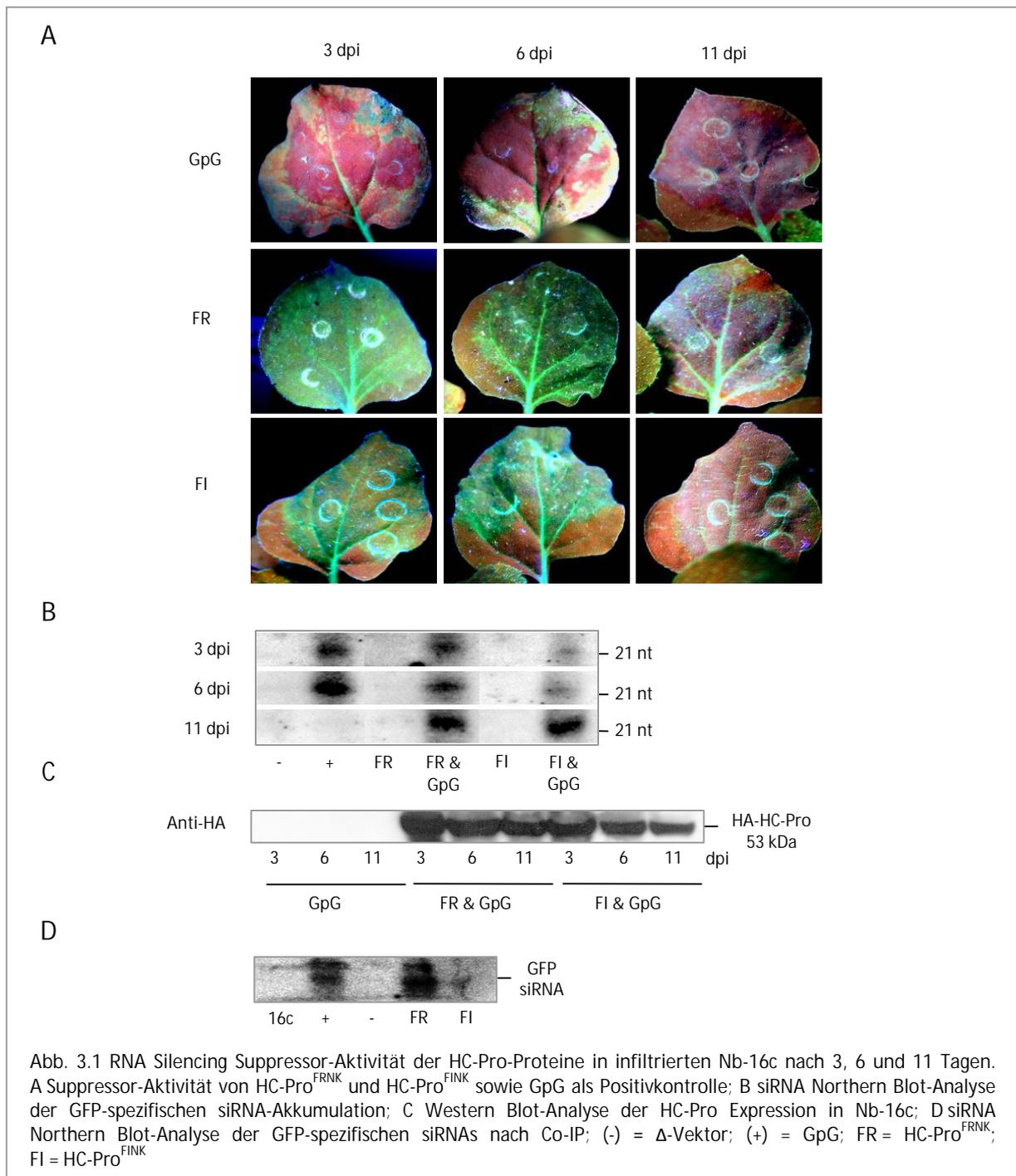
Zur Analyse der RSS-Aktivität der HC-Pro-Proteine aus ZYMV erfolgte eine Koinfiltration von Nb-16c mit dem Agrobacterium-Stamm welcher das GpG-Konstrukt trägt (Positivkontrolle) und dem Agrobacterium-Stamm ATHV der die pBIN:HA-HC-Pro^{FRNK}- bzw. pBIN:HA-HC-Pro^{FINK}-Konstrukte enthält. Die pBIN-Konstrukte umfassen die ZYMV HC-Pro kodierenden Sequenzen, welche unter der Kontrolle des konstitutiven pflanzlichen 35S-Promoters stehen (Shiboleth et al., 2007). Als Negativkontrolle diente der *A. tumefaciens*-Stamm der den pPCV702SM- Δ -Vektor enthielt; diesem Vektor wurden der 35S-Promoter und der nos-Terminator entfernt (Dalakouras et al., 2009). Nach der Infiltration wurde die GFP-Expression unter UV-Licht analysiert.

Die Blattbereiche der Nb-16c, welche mit den Agrobacterium-Stämmen, die das GpG- sowie das HA-HC-Pro^{FRNK}- bzw. HA-HC-Pro^{FINK}-Konstrukt enthielten, koinfiltriert wurden, wiesen in Folge der RSS-Aktivität der HC-Pro-Proteine nach drei und sechs Tagen eine stark erhöhte grüne Fluoreszenz auf (Abb. 3.1 A). Nach 11 Tagen kam es allerdings zum Silencing des GFP. Im Gegensatz dazu zeigten die Blattbereiche die lediglich mit dem Agrobacterium-Stamm, der das GpG-Konstrukt enthielt, infiltriert wurden, bereits nach drei Tagen ein Silencing des GFP-Signals und eine dunkle Rotfärbung (Abb. 3.1 A).

Die Ergebnisse der Northern Blot-Analysen in Abb. 3.1 B zeigen, dass es durch die Agrobacterium-vermittelte Infiltration des GpG-Konstrukts in den entsprechenden Blattbereichen nach drei bzw. sechs Tagen zu einer starken Anhäufung der GFP-spezifischen siRNAs kam.

Im Gegensatz dazu konnte in den Nb-16c, welche mit dem Agrobacterium-Stamm infiltriert wurden, der den pPCV702SM- Δ -Vektor (Negativkontrolle) enthielt, keine siRNAs detektiert werden. In den durch Agrobacterium-Stämmen, welche die HA-HC-Pro^{FRNK}- bzw. HA-HC-Pro^{FINK}-Konstrukte enthielten, infiltrierten Blattbereichen ließen sich die GFP-spezifischen siRNAs bereits nach drei Tagen nachweisen und waren im Vergleich zur Positivkontrolle auch weiterhin nach elf Tagen detektierbar (Abb. 3.1 B). Die Expression der HA-HC-Pro-Proteine konnte mit Hilfe einer Western Blot-Analyse unter Verwendung des Anti-HA Antikörpers als Signal bei 53 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.1 C). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die siRNA-Doppelstränge in einem inaktiven und geschützten Zustand vorliegen und dadurch nicht mehr in der Lage sind, die Spaltung der GFP mRNA zu vermitteln. In den Kontrollpflanzen können die siRNAs dagegen ungehindert die Sequenz-spezifischen Spaltung der GFP mRNA bzw. deren Translation vermitteln.

Um eine direkte Bindung der siRNAs durch die HC-Pro-Proteine zu analysieren, wurde der siRNA-Protein-Komplex über den N-terminalen HA-Tag gereinigt (Co-IP) und die an die HA-HC-Pro-Proteine gebundenen RNAs isoliert. Im Anschluss erfolgte die Analyse der isolierten RNAs über einen siRNA Northern-Blot mit einer GFP-spezifischen Sonde. Die Ergebnisse zeigen, dass die HC-Pro^{FRNK}, jedoch nicht die HC-Pro^{FINK}, GFP-spezifische siRNAs gebunden hat (Abb. 3.1 D). Dies könnte auf einen Verlust der Bindungskapazität der HC-Pro^{FINK} zurückzuführen sein und deutet darauf hin, dass die Funktion als RSS durch einen zusätzlichen Mechanismus des Proteins erzielt wird.



3.2 Der Einfluss von HC-Pro auf die Veränderung der miRNA-Mengen in *N. benthamiana*-Pflanzen

Diverse Studien mit transgenen *N. tabacum*- und *A. thaliana*-Pflanzen, die das P1/HC-Pro als Transgen enthielten zeigen, dass die Anwesenheit des P1/HC-Pro-Proteins zu einer Veränderung der miRNA-Mengen führt und dadurch die Entwicklung der Pflanze stark beeinträchtigt wird. Einen Hinweis auf die Störung des miRNA-Mechanismus durch die HC-Pro geben *A. thaliana*-Pflanzen mit

Mutationen der Kernkomponenten des miRNA-Mechanismus, bei denen es zu starken pleiotropen Effekten in der Entwicklung kommt, die mit P1/HC-Pro transgenen *A. thaliana*-Pflanzen vergleichbar sind (Mallory et al., 2002; Kasschau et al., 2003; Chapman et al., 2004; Dunoyer et al., 2004; Mlotshwa et al., 2005; Mallory & Vaucheret, 2006).

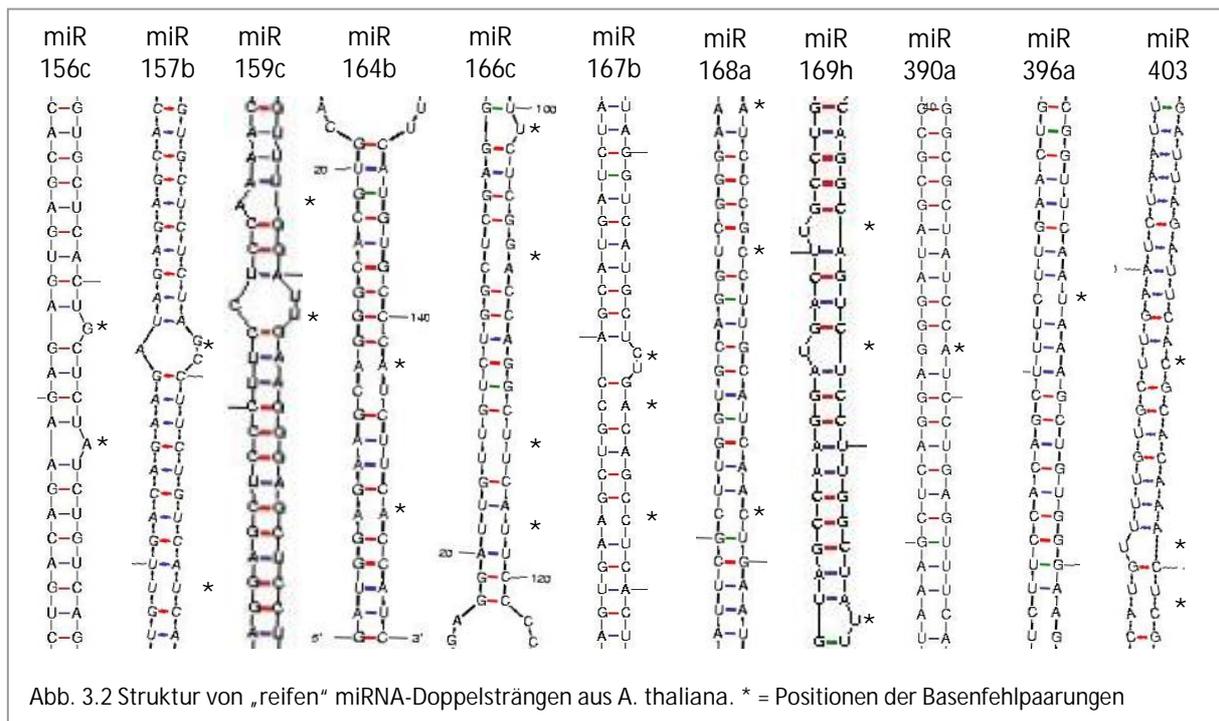
Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte der Einfluss der ZYMV HC-Pro^{FRNK} und HC-Pro^{FINK} auf die miRNA-Akkumulation in *N. benthamiana*-Pflanzen (WT) untersucht werden. Dabei sollte vor allem die Akkumulation des instabilen miR*-Stranges analysiert werden, da dieser normalerweise in der Pflanze sehr schnell abgebaut wird und dadurch als Indikator für die Stabilität des miRNA-Doppelstrangs dient. Durch die Anwesenheit der HC-Pro sollte der miRNA-Doppelstrang stabilisiert werden. Der miR-Strang wird nicht mehr in den RISC aufgenommen, wodurch der miRNA-Doppelstrang erhalten bleibt und der miR*-Strang vor dem Abbau geschützt ist.

Die miRNAs besitzen eine unterschiedliche Anzahl an Basenfehlpaarungen und bilden charakteristische Sekundärstrukturen aus. Es ist anzunehmen, dass solche Sekundärstrukturen die Bindung durch die HC-Pro-Proteine stark beeinflussen. Es wurden deshalb unterschiedliche miRNA-Sequenzen gewählt um diesen Zusammenhang zu untersuchen.

Da für *N. benthamiana* keine miRNA-Sequenzen bekannt sind, wurden durch eine Datenbanksuche in miRBase konservierte miRNAs aus *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* und *S. lycopersicon* für die weiteren Analysen gesucht (Griffiths-Jones et al., 2006; Griffiths-Jones et al., 2008). Aus der Vielzahl der konservierten miRNAs konnten mit Hilfe der ASRP-Datenbank die miRNA-Sequenzen ausgewählt werden, die in Blättern von *A. thaliana* im Rahmen einer 454-Sequenzierung nachgewiesen wurden (Gustafson et al., 2005). Weitere Auswahlkriterien stellten die unterschiedliche Anzahl an Basenfehlpaarungen, deren Lage sowie die Ausbildung von bulge-Strukturen innerhalb der reifen miRNA-Doppelstränge dar.

Zu den ausgewählten miRNAs, die in dieser Arbeit getestet wurden, zählten sowohl miRNAs, die die Expression von Transkriptionsfaktoren regulieren (miR156c, miR157b, miR159c, miR164b, miR166c, miR167b, miR169h, miR396a) als auch Komponenten der miRNA-Biogenese (miR168a, miR403a) und der ta-siRNA-Biogenese (miR390a).

Die Ableitung der Sequenzen für die DNA-Oligonukleotide, die anschließend als Sonden zur Detektion der miR- bzw. miR*-Stränge dienten, erfolgte anhand der Sequenzen in der Arabidopsis MPSS Plus-Datenbank (Brenner et al., 2000). Die Sekundärstrukturen der miRNA-Doppelstränge sind in Abb. 3.2 dargestellt; für die graphische Darstellung wurde die Sequenz des miRNA-Vorläufers verwendet und mittels mfold die Sekundärstruktur berechnet (Zuker, 2003).



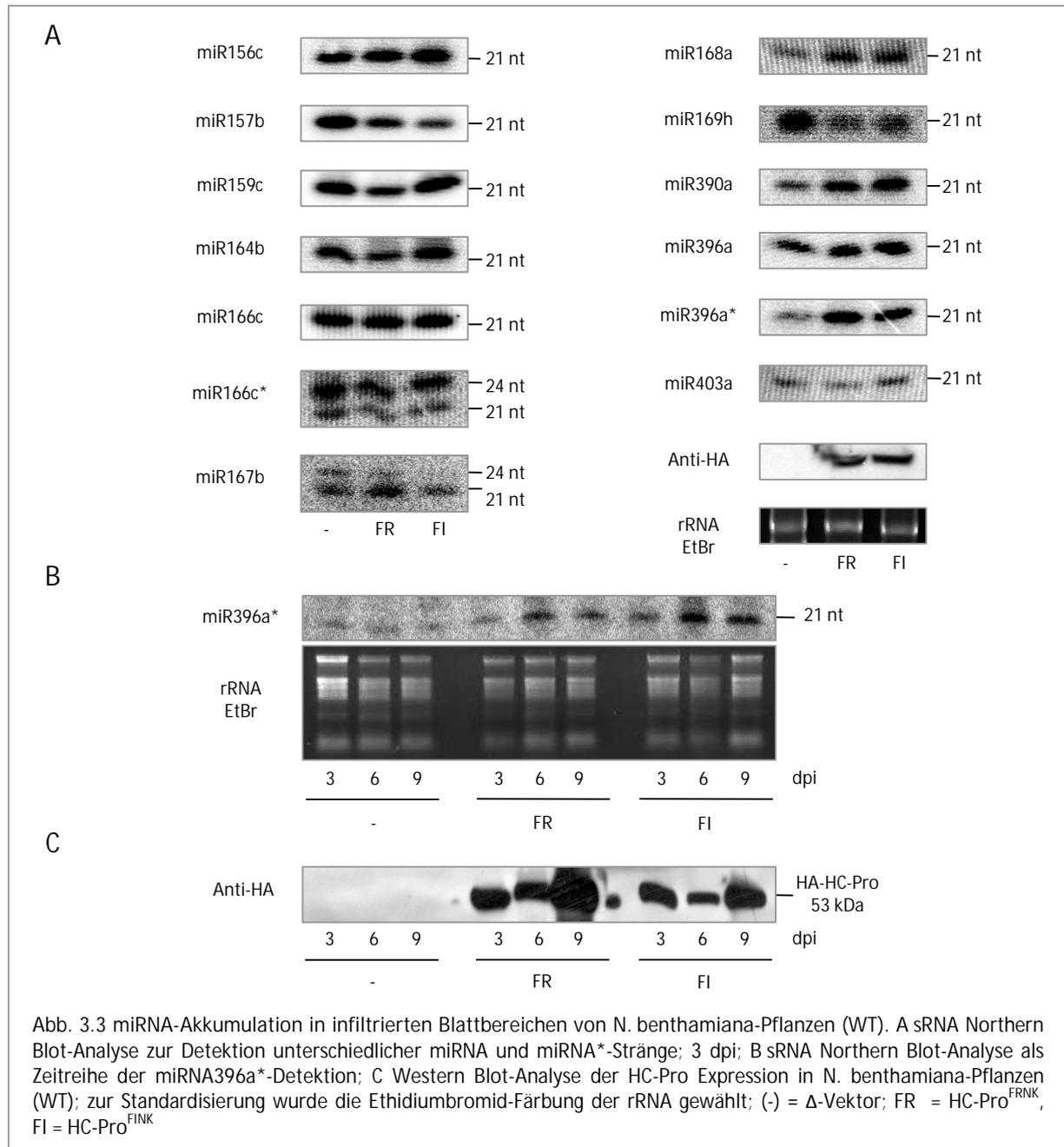
Zur Analyse des Einflusses von ZYMV HC-Pro auf die miRNA-Akkumulation in *N. benthamiana*-Pflanzen (WT) wurden die ausgewählten miRNAs über sRNA Northern Blots nachgewiesen.

Dazu wurden zunächst *N. benthamiana*-Pflanzen mit *Agrobacterium*-Stämmen, die den pBin-HA-HC-Pro^{FRNK}-, pBIN-HA-HC-Pro^{FINK}- bzw. pPCV702SM- Δ -Vektor (Negativkontrolle) enthielten, infiltriert und die Veränderung der miRNA-Mengen nach drei Tagen vergleichend analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle getesteten miR-Stränge detektiert werden konnten, jedoch keine differenzielle Akkumulation erfolgte. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem HC-Pro-Wildtyp und der Mutante wurde nicht beobachtet (Abb. 3.3 A). Die Western Blot-Analyse zeigt, dass die HC-Pro-Proteine über den gesamten Zeitraum exprimiert wurden (Abb. 3.3 C). Dies deutet darauf hin, dass die HC-Pro-Proteine keinen Einfluss auf die Akkumulation der getesteten miRNAs haben.

Im Gegensatz zu den miR-Strängen, konnte der instabile miRNA*-Strang nur in zwei von elf Fällen detektiert werden (miR166c*, miR396a*). Darüber hinaus führte die Analyse der miR166c* und miR167b zum Nachweis einer zusätzlichen Bande mit einer Größe von 24 nt (Abb. 3.3 B).

Allerdings konnte eine Veränderung der miRNA-Mengen für die miR396a* in Anwesenheit der HC-Pro-Proteine im Vergleich zu den Kontrollpflanzen nachgewiesen werden. Nach sechs und neun Tagen kam es durch die *Agrobacterium*-vermittelte Infiltration der HC-Pro^{FRNK}- und HC-Pro^{FINK}-Konstrukte in den entsprechenden Blattbereichen zu einer deutlichen Anreicherung der miR396a* (Abb. 3.3 B).



3.3 Analyse der in vitro Bindekapazität von HC-Pro-Proteinen aus Pflanzen

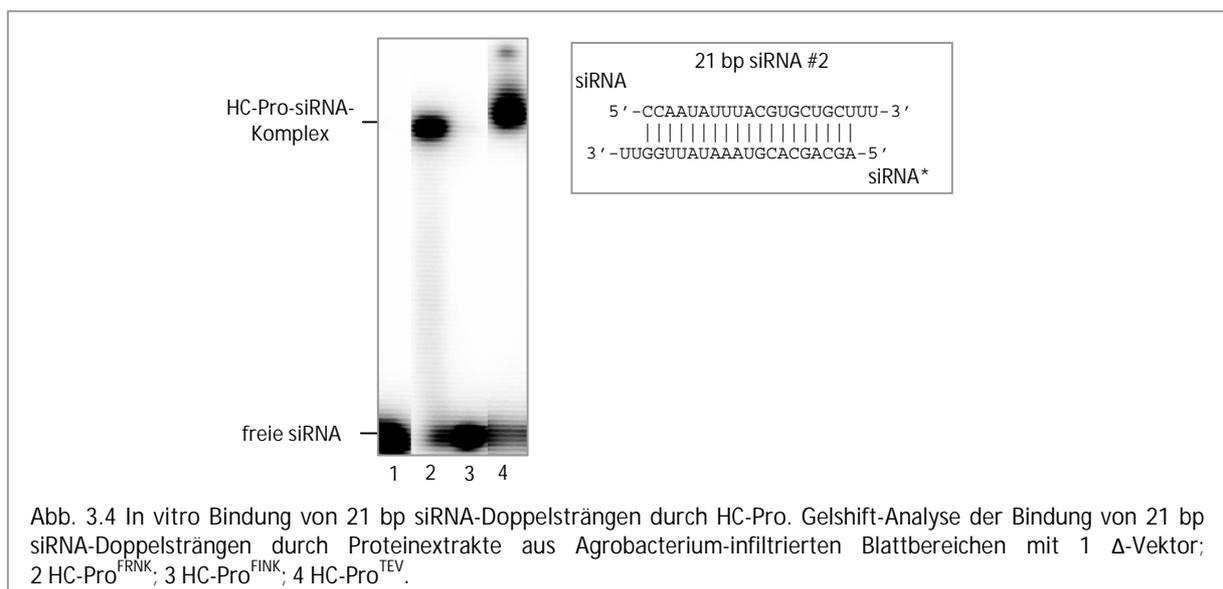
Die in vivo Analyse der miRNA-Veränderung in Folge einer Infiltration von HC-Pro lieferte keine eindeutigen Ergebnisse im Hinblick auf die Bindekapazität der HC-Pro^{FRNK}- und HC-Pro^{FINK}-Proteine, deshalb sollten in vitro Bindungsstudien mit rekombinanten HC-Pro-Proteinen aus Pflanzen und synthetischen sRNA-Doppelsträngen durchgeführt werden.

Zunächst wurde die Bindung von 21 bp siRNA-Doppelsträngen durch das rekombinante HC-Pro-Protein (HC-Pro^{FRNK}) aus ZYMV und der Einfluss der Punktmutation (Arg à Ile) in HC-Pro^{FINK} auf die Bindekapazität kleiner RNA-Moleküle analysiert. Die starke Bindung von

21 bp siRNA-Doppelsträngen durch die TEV HC-Pro wurde bereits in früheren Studien gezeigt und diente als Positivkontrolle (Lakatos et al., 2006).

Drei Tage nach der Infiltration von *N. benthamiana*-Pflanzen (WT) mit *Agrobacterium*-Stämmen, welche die pBin-HA-HC-Pro^{FRNK}-, pBin-HA-HC-Pro^{FINK}- bzw. pBin-HC-Pro^{TEV}-Konstrukte enthielten, wurde ein pflanzlicher Proteinextrakt von den infiltrierten Blattbereichen hergestellt und für die *in vitro* Bindungsstudien verwendet (Abschnitt 2.2.2.14).

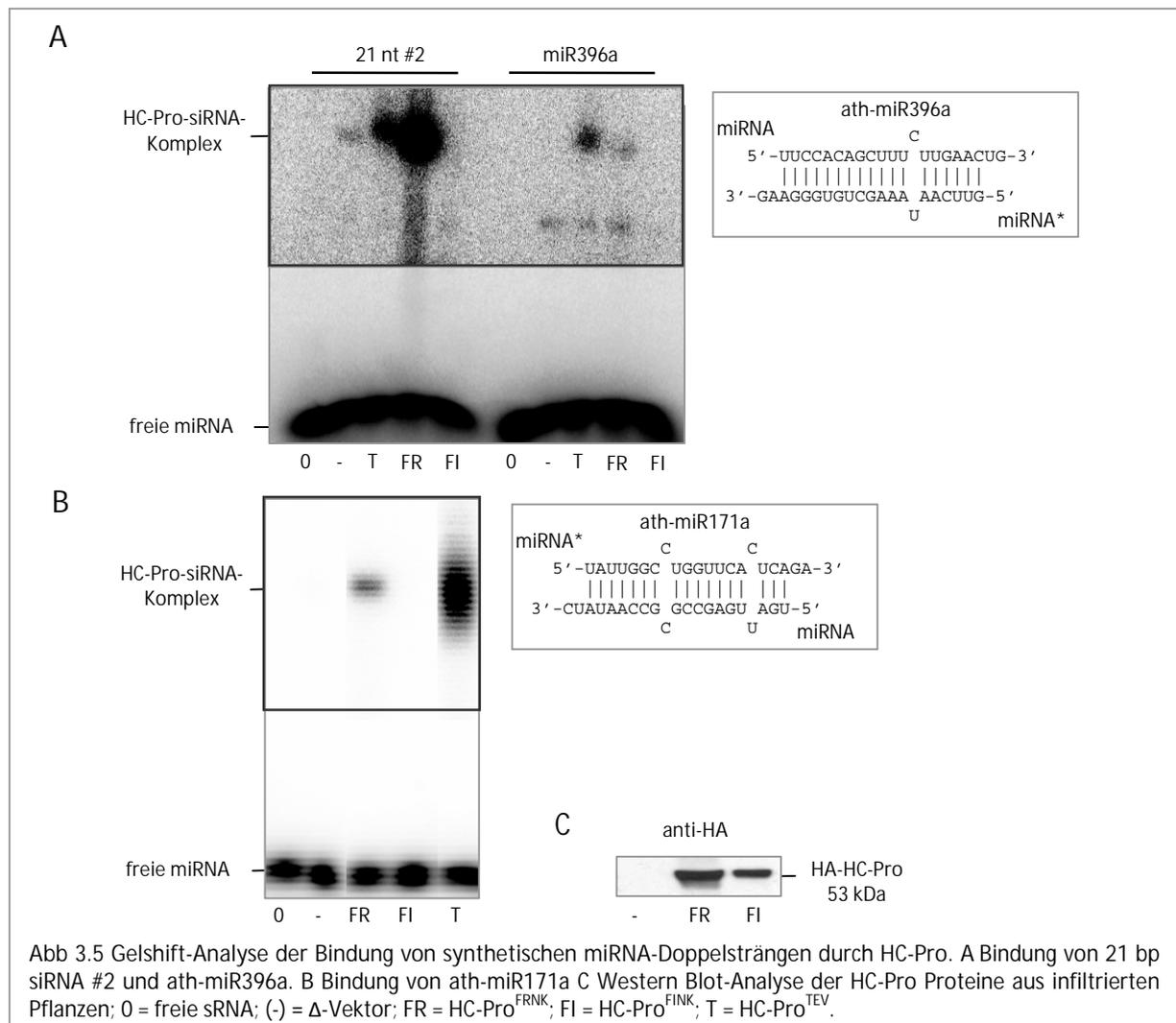
Das Ergebnis in Abb. 3.4 zeigt eine starke Bindung der 21 bp siRNA-Doppelstränge durch die ZYMV HC-Pro^{FRNK}. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass die Punktmutation der HC-Pro^{FINK} zu einem vollständigen Verlust der Bindung von siRNA-Doppelsträngen führte wie auch schon die unter 3.1 beschriebenen Infiltrationsexperimente gezeigt haben.



Neben dem Einfluss der HC-Pro im PTGS und VIGS und der Bindung von siRNAs sollte eine mögliche Interaktion mit dem miRNA-Mechanismus und die Bindung von miRNA-Doppelsträngen untersucht werden, da die schwache Ausprägung der Symptome in ZYMV-AG infizierten Kürbispflanzen vermutlich auf eine Störung der Bindung von miRNAs durch die HC-Pro^{FINK} in Folge der Punktmutation zurückzuführen ist (Shibolet et al., 2007). Zur Analyse der miRNA-Bindekapazität der HC-Pro^{FRNK}- sowie der HC-Pro^{FINK}-Proteine wurden synthetische siRNA-Doppelstränge mit abgeleiteten Sequenzen von *A. thaliana* miRNAs verwendet. Diese besaßen eine unterschiedliche Anzahl an Basenfehlpaarungen innerhalb des Doppelstranges. Aufgrund der differentiellen Bindung des miR396a*-Strangs in den siRNA Northern Blot-Analysen (Abschnitt 3.2) wurde die Sequenz der *ath*-miR396a, welche eine Basenfehlpaarung besaß sowie einer zusätzlichen miRNA mit zwei Basenfehlpaarungen (*ath*-miR171) innerhalb des Doppelstrangs analysiert.

Die Ergebnisse der Gelshift-Analysen zeigen, dass die HC-Pro^{FRNK} alle getesteten synthetischen sRNA-Doppelstränge bindet, wobei eine starke Bindung des 21 bp siRNA-Doppelstrangs zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu konnte für die HC-Pro^{FINK} bei annähernd gleichen Proteinmengen im Vergleich zur HC-Pro^{FRNK}, keine Bindung nachgewiesen werden (Abb. 3.5).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Bindung von ath-miR171a und ath-miR396a nicht signifikant unterscheiden und lassen keine Aussagen über den Einfluss der Anzahl und Lage von Basenfehlpaarungen innerhalb der miRNAs auf die Bindung durch die ZYMV HC-Pro^{FRNK} zu. Dies soll in den nachfolgenden Abschnitten dieser Arbeit eingehender untersucht werden.

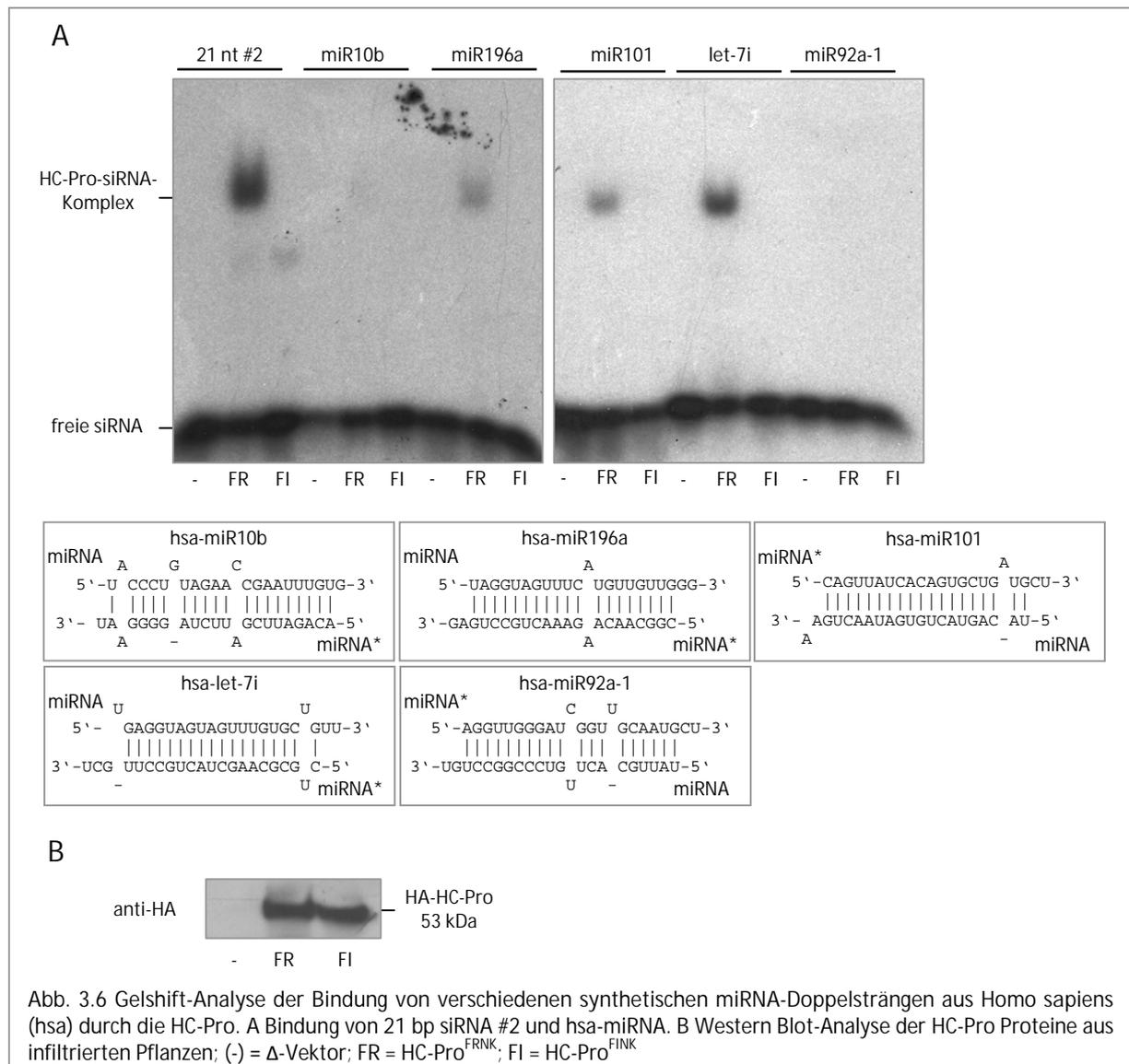


Ergänzende Experimente sollten zeigen, ob ein Zusammenhang zwischen der Bindekapazität der HC-Pro-Proteine und der Anzahl der Basenfehlpaarungen bzw. der Sequenz der miRNAs besteht. Die Versuchsreihe wurde mit verschiedenen synthetischen miRNAs aus Mensch (hsa-miRNA) durchgeführt, wofür eine entsprechende Auswahl von der Firma Exiqon zur Verfügung gestellt wurde und somit zusätzliche miRNA-Spezies, die nicht aus Pflanzen stammten, analysiert werden konnten.

Für die Versuche wurden ausschließlich Proteinextrakte aus Blättern von infiltrierten *N. benthamiana*-Pflanzen (WT, 3 dpi) verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei vergleichbaren Proteinmengen der HC-Pro^{FRNK} und HC-Pro^{FINK} keine Bindung der getesteten miRNA-Doppelstränge durch die HC-Pro^{FINK} erfolgte (Abb. 3.6 A).

Die Bindung der HC-Pro^{FRNK} variierte dagegen sehr stark – wurden für den 21 bp siRNA-Doppelstrang und der miRNA, die nur eine Basenfehlpaarung im flankierenden Bereich besaß (hsa-let-7i), starke Signale detektiert, konnten bei den Versuchen der miRNAs mit einer Basenfehlpaarung in der zentralen Region (hsa-miR196) und zwei Basenfehlpaarungen im flankierenden Bereich (hsa-miR-101) nur schwache Signale bzw. bei miRNAs mit drei Basenfehlpaarungen (hsa-miR10b) und mit zwei Basenfehlpaarungen in der zentralen Region (hsa-miR-92a-1) keine Signale nachgewiesen werden (Abb. 3.6 A). Der Western Blot mit dem Anti-HA Antikörper zeigt eine vergleichbare Expression beider HC-Pro-Proteine (Abb. 3.6 B).



Die Ergebnisse zeigen eine hohe Variabilität der Bindekapazität und -stärke von HC-Pro^{FRNK} für verschiedene miRNA-Strukturen. Interessanterweise wurden neben Pflanzen-typischen miRNAs auch miRNA-Doppelstränge aus anderen Organismen durch die HC-Pro gebunden.

3.4 Rekombinante Expression der HC-Pro-Proteine aus ZYMV in Bakterien

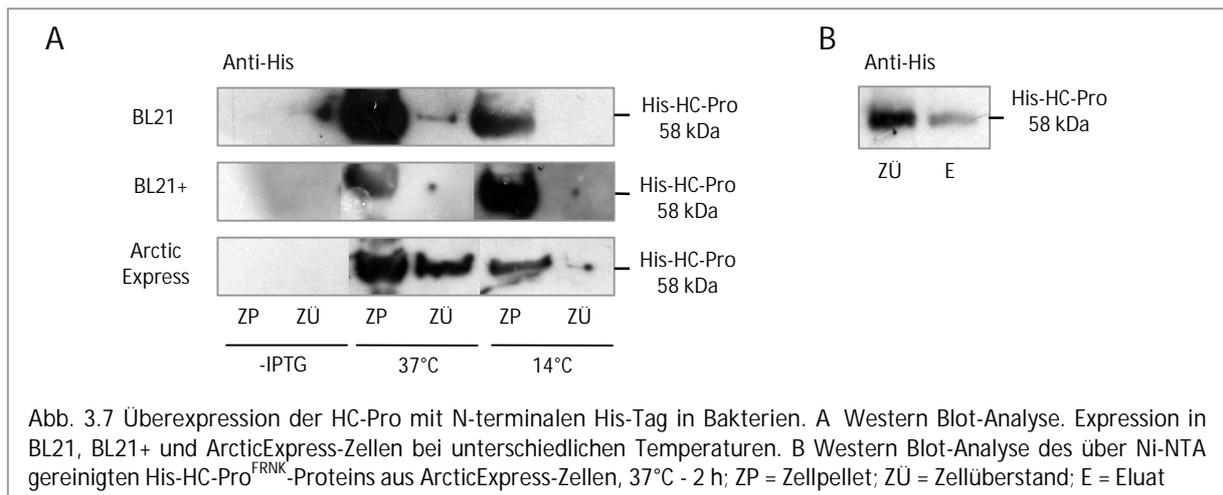
Die Analyse der Bindekapazität kleiner RNA-Moleküle durch die HC-Pro erforderte die rekombinante Expression des Proteins in Bakterien, da die in vitro Bindungsstudien mit den HC-Pro Proteinen aus Pflanzen keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Anzahl und Lage von Basenfehlpaarungen innerhalb der miRNAs und der Bindekapazität lieferten (Abschnitt 3.3). Die Analyse der über den HA-Tag gereinigten Proteine führte zu keiner Bindung (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus ermöglichte dieses System eine schnelle und effiziente Erzeugung von Suppressormutanten für die Analyse der autoproteolytischen Aktivität.

Die für die HC-Pro kodierende Sequenz wurde, wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben, zunächst mit dem pUC57:HA-HC-Pro-Vektor als Template amplifiziert und im Anschluss über die NotI-Schnittstelle in den pET28b(+)-Vektor eingebracht.

Die HC-Pro wurde mit einem N-terminalen 6 x His-Tag exprimiert, wodurch eine Aufreinigung über eine Ni-NTA-Affinitätsmatrix ermöglicht werden sollte. Um optimale Bedingungen für die Expression zu finden, wurden drei verschiedene E. coli-Stämme [BL21 (DE3), BL21 (DE3) codon plus und ArcticExpress (DE3)] verwendet. Die Inkubation erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen für 2 Std. bei 37°C und bei 14°C über Nacht. Die Proteinextraktion wurde, wie in Abschnitt 2.2.2.11 beschrieben, mit Hilfe des BugBuster Protein Extraction Reagent unter der Zugabe von Benzonase und einer nachfolgenden Inkubation bei 37°C für 30 Min. durchgeführt. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot-Analysen mit dem Anti-His Antikörper analysiert.

Die Ergebnisse in Abb. 3.7 A zeigen eine starke Expression des zu erwartenden 58 kDa Proteins in allen drei Bakterienstämmen. In Folge einer übermäßigen Synthese lag dieses aber, durch eine fehlerhafte oder unvollständige Faltung, in Form von unlöslichen Aggregaten (inclusion bodies) vor. Nur die Expression im ArcticExpress (DE3)-Stamm führte zur Bildung der löslichen Form des HC-Pro-Proteins nach 2 Std. Inkubation bei 37°C (Abb. 3.7 A).

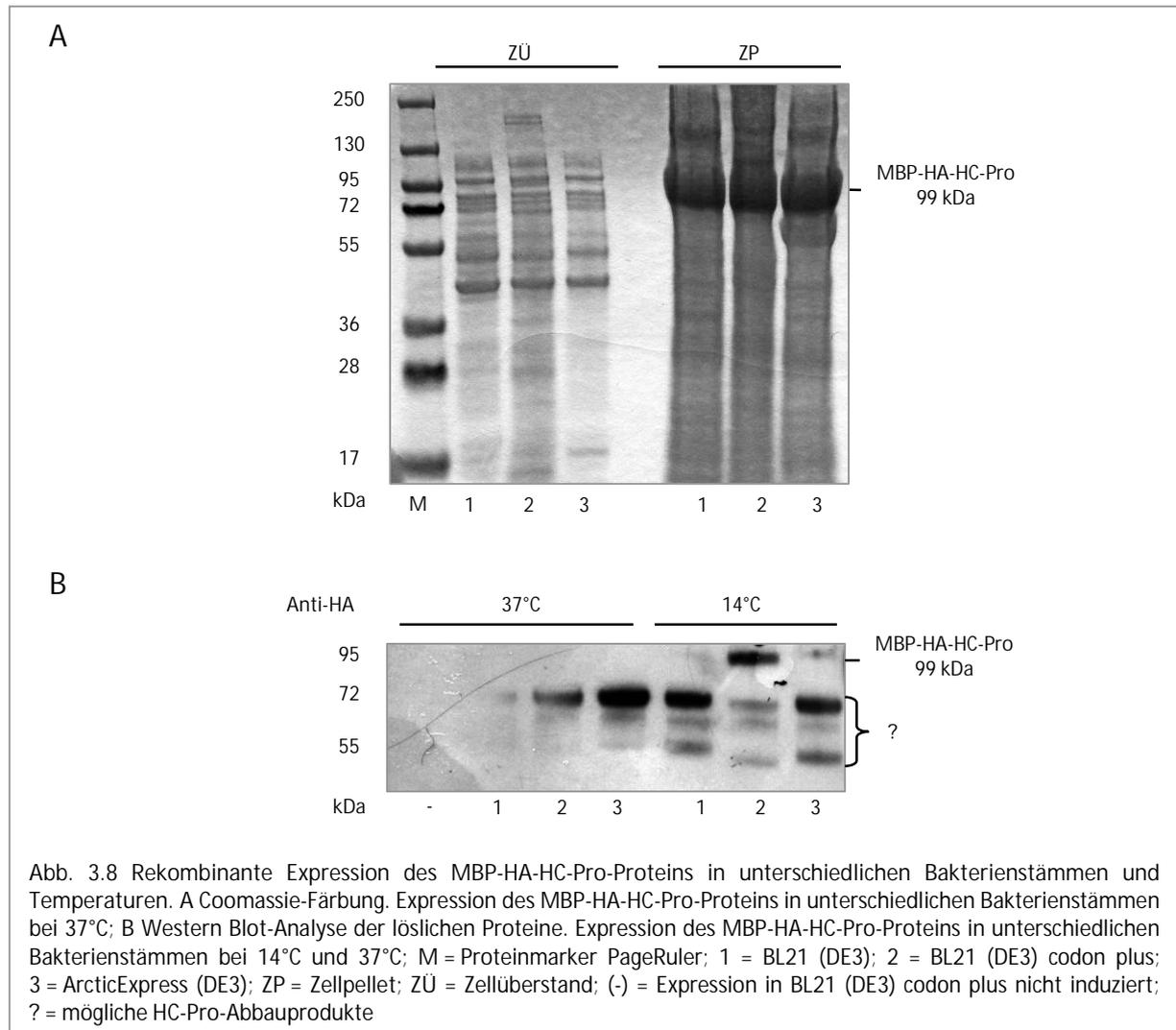
Die Reinigung der rekombinanten His-HC-Pro-Proteine aus ArcticExpress (DE3)-Zellen über den N-terminalen His-Tag mit einer Ni-NTA-Matrix (siehe Abschnitt 2.2.2.13) und anschließender Rückgewinnung von der Matrix mit Imidazol führte lediglich zu geringen Ausbeuten des Proteins (Abb. 3.7 B). Aus diesem Grund wurde ein weiterer Expressionsvektor pMAL.c2X gewählt, um durch das Maltose-Bindeprotein (MBP) einen größeren Anteil löslicher Proteine zu erhalten.



Dazu wurde die für das HA-HC-Pro^{FRNK}-Protein kodierende Sequenz über zwei XbaI-Schnittstellen direkt aus dem pUC57:HA-HC-Pro in den pMAL.c2X Vektor kloniert (siehe Abschnitt 2.2.4.2). Das pMAL:HA-HC-Pro^{FRNK}-Konstrukt konnte durch eine gerichtete Mutagenese mit dem pMAL:HA-HC-Pro^{FRNK}-Vektor als Matrize amplifiziert werden, woraus der Austausch der Aminosäure R180I resultierte (Abschnitt 2.2.4.3).

Die Expression der HC-Pro erfolgte mit einem N-terminalen MBP sowie eines HA-Tags, wodurch die Aufreinigung der rekombinanten HC-Pro-Proteine mit Amylose-gekoppelten Magnetpartikeln bzw. einer Anti-HA Agarose ermöglicht wurde. Die Expression erfolgte wiederum in drei verschiedenen Bakterienstämmen [BL21 (DE3), BL21 (DE3) codon plus und ArcticExpress (DE3)] bei zwei verschiedenen Temperaturen (14°C und 37°C) zur Bestimmung der optimalen Expressionsbedingungen für das Fusionsprotein.

Die Coomassie-Färbung zeigt, dass die Expression des Proteins nach zwei Std. bei 37°C vorwiegend zur Bildung von unlöslichen Aggregaten führte (Abb. 3.8 A). Die Expression von MBP-HA-HC-Pro in löslicher Form konnte jedoch nur nach einer Inkubation der mit 1 mM IPTG induzierten Zellen bei 14°C über Nacht in BL21 (DE3) codon plus-Zellen erzielt werden. Der Nachweis erfolgte über einen Western Blot mit dem Anti-HA Antikörper, bei dem das MBP-HA-HC-Pro-Protein als starke Bande bei 99 kDa nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.8 B). Zusätzlich wurden Banden mit einem niedrigeren Molekulargewicht (MW) zwischen 55 und 72 kDa detektiert, bei denen es sich um Abbauprodukte der HC-Pro in Folge der Aktivität von bakteriellen Proteasen handeln könnte.



Nach der Ermittlung der geeigneten Expressionsparameter der MBP-HA-HC-Pro-Proteine bei 14°C über Nacht im BL21 (DE3) codon plus-Stamm konnten ausreichende Mengen der Proteine produziert werden.

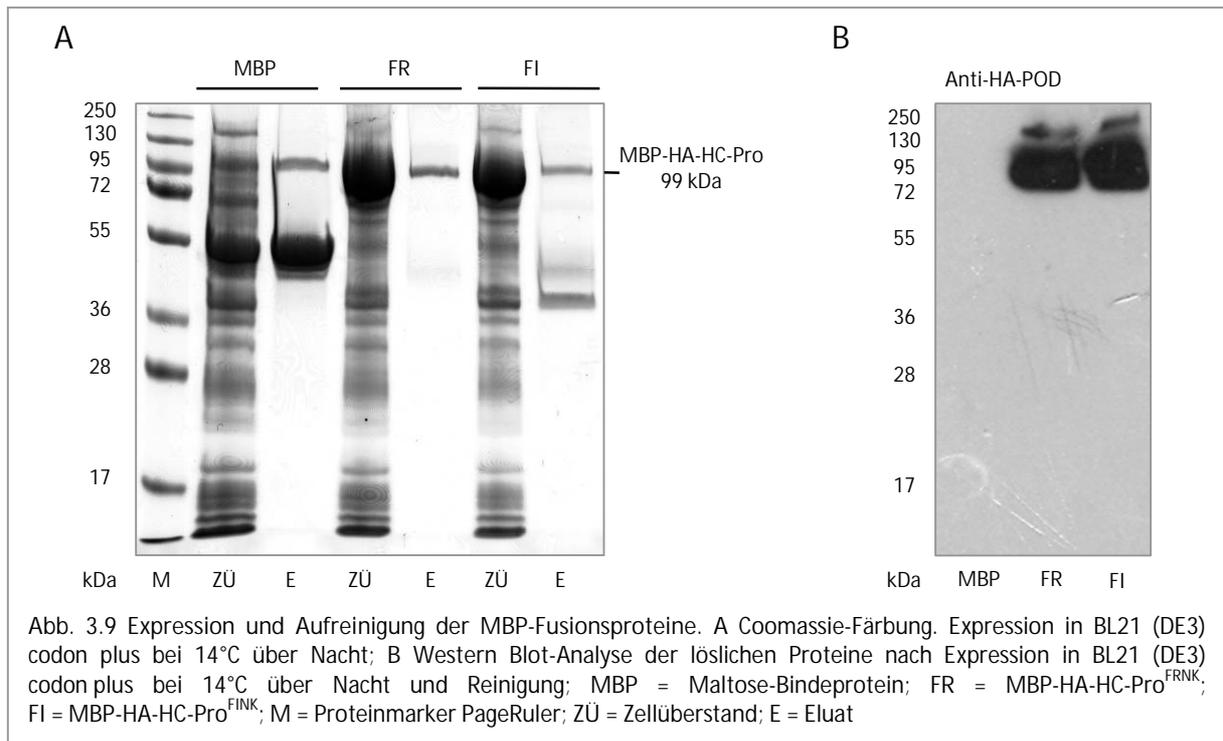
Im Anschluss wurden die MBP-Fusionsproteine über Amylose-gekoppelte Magnetpartikel gereinigt und in dem MBP-Puffer, der mit 10 mM Maltose versetzt wurde, eluiert (Abschnitt 2.2.2.12). Die isolierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend eine Coomassie-Färbung durchgeführt.

Die Ergebnisse der Coomassie-Färbung zeigen neben einer Expression des MBP mit einem MW von 53 kDa (Abb. 3.9 A) auch eine starke Expression der MBP-HA-HC-Pro^{FRNK}- und MBP-HA-HC-Pro^{FINK}-Proteine in löslicher Form mit einem MW von 99 kDa (Abb. 3.9 A).

Durch die Aufreinigung des MBP wurde neben der 53 kDa eine weitere Bande eluiert, welche mit ~ 100 kDa einem Dimer des MBP entsprach (Abb. 3.9 A). Des Weiteren konnten nach der Rückgewinnung der MBP-HA-HC-Pro-Proteine von der Matrix neben den Banden bei 99 kDa zusätzliche Banden zwischen 36 und 55 kDa nachgewiesen werden, welche Abbauprodukte der

HC-Pro darstellen könnten (Abb. 3.9 A). Die Menge der isolierten Proteine wurden über einen Bradford-Assay ermittelt und lagen zwischen 80-100 ng/ μ l.

Die Western Blot-Analyse mit dem Anti-HA-Antikörper in Abb. 3.9 B zeigt ein starkes Signal der MBP-HA-HC-Pro-Proteine bei 99 kDa nach der Expression und Reinigung. Das gereinigte MBP diente als Negativkontrolle.



3.5 Analyse der in vitro Bindekapazität von rekombinanten HC-Pro-Proteinen aus Bakterien

In Abschnitt 3.3 wurde bereits die Bindekapazität der ZYMV HC-Pro-Proteine aus Pflanzen untersucht. Dabei konnte einerseits gezeigt werden, dass der Aminosäureaustausch in der Mutante HC-Pro^{FINK} zum vollständigen Verlust der Bindung von sRNA-Doppelsträngen führt und andererseits die Bindung von miRNA-Doppelsträngen mit unterschiedlicher Anzahl bzw. Lage von Basenfehlpaarungen durch die ZYMV HC-Pro^{FRNK} erfolgt, wobei jedoch kein Zusammenhang zwischen der Bindungsstärke und der miRNA-Struktur gefunden wurde.

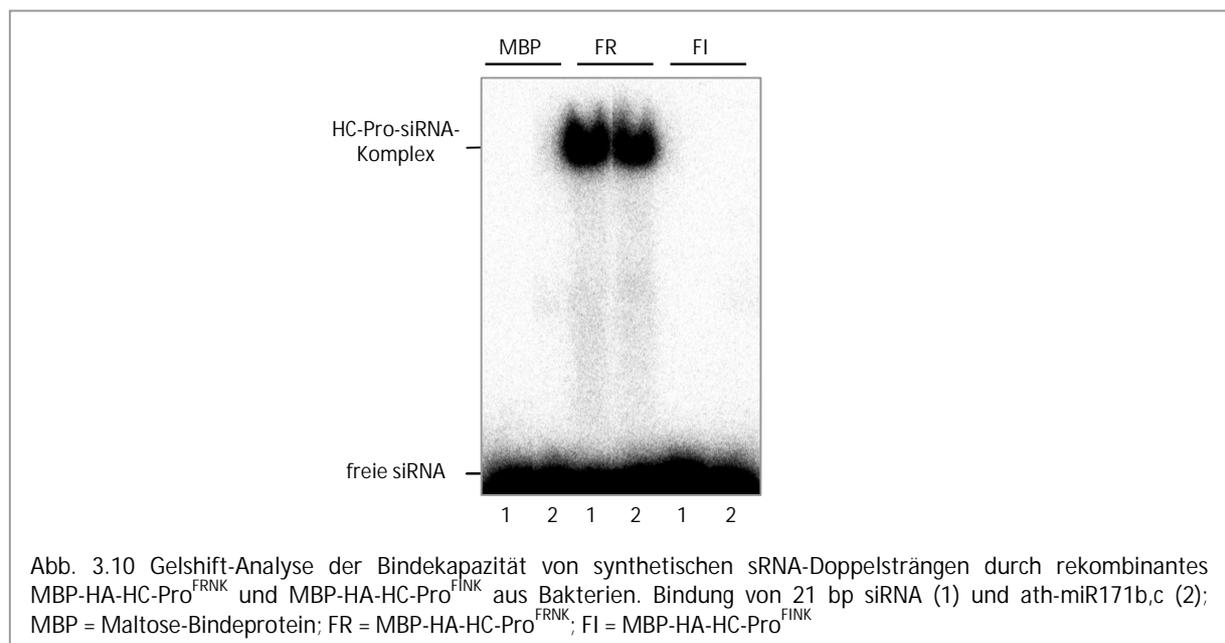
Um eine bessere Aussage über die Bindekapazität der HC-Pro^{FRNK} und HC-Pro^{FINK} treffen zu können, wurden, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, rekombinante Proteine in Bakterien erzeugt und anschließend für die in vitro Bindungsstudien verwendet. Der Vorteil bestand darin, große Mengen

der gereinigten Proteine zu verwenden und gleichzeitig die spezifische Bindung der RNA-Moleküle durch die HC-Pro untersuchen zu können.

Zunächst sollten *in vitro* Bindungsstudien mit den rekombinant erzeugten MBP-HA-HC-Pro-Fusionsproteinen mit einem 21 bp siRNA-Doppelstrang sowie mit einem miRNA-Doppelstrang mit vier Basenfehlpaarungen (ath-miR171b,c) durchgeführt werden, um die Aktivität dieser Proteine zu überprüfen.

Die Ergebnisse in Abb. 3.10 zeigen, dass beide siRNA-Doppelstränge durch das MBP-HA-HC-Pro^{FRNK}-Protein gebunden werden und das rekombinante Protein in einem funktionellen Zustand vorliegt.

Darüber hinaus bestätigen die Ergebnisse, dass die Mutation in HC-Pro^{FINK} zu einem vollständigen Verlust der Bindekapazität sowohl für 21 bp siRNA-Doppelstränge als auch für synthetische miRNA-Doppelstränge führt (Abb. 3.10). Als Negativkontrolle diente das MBP, das unter gleichen Bedingungen wie die MBP-HC-Pro-Proteine exprimiert und gereinigt wurde (Abb. 3.10).



Zusätzliche Analysen einer längenspezifischen Bindung von siRNA-Doppelsträngen durch das MBP-HA-HC-Pro^{FRNK}-Protein zeigen, dass durch das Protein alle Typen der verwendeten synthetischen siRNA-Doppelstränge gebunden werden, wobei eine Präferenz für 21 bp siRNA-Moleküle bestand (Abb. 3.11 A). Vergleicht man das Verhältnis der nicht gebundenen siRNAs mit den durch die HC-Pro gebundenen siRNAs, konnte man eine Divergenz zwischen den 21 bp siRNAs und den 19 bp bzw. 24 bp siRNAs feststellen, wobei der Anteil der nicht gebundenen 21 bp siRNAs im Vergleich zu den 19 bp und 24 bp siRNA Molekülen um ein Vielfaches geringer war.

Dieses Ergebnis deutet auf eine längenspezifische Bindung der siRNA-Doppelstränge mit einer Präferenz für 21 bp siRNA-Doppelstränge durch die HC-Pro hin.

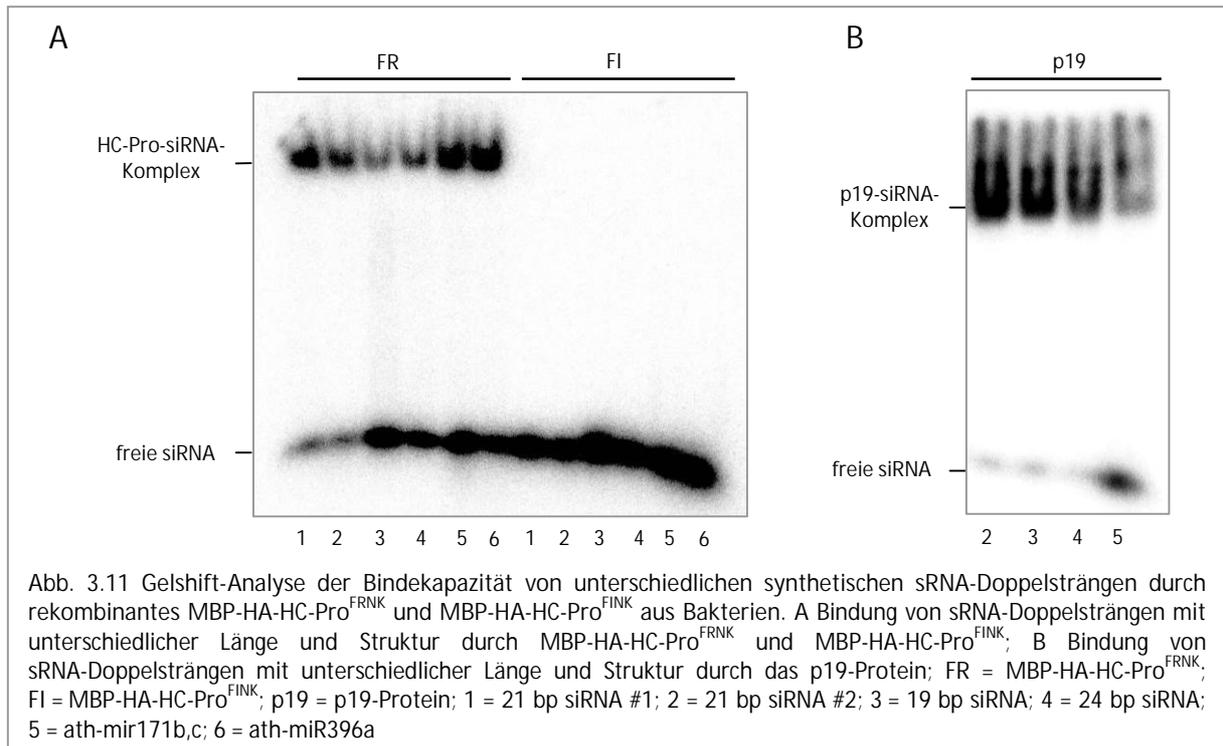
Weitere Analysen, bei denen die Bindung der für die pflanzliche Entwicklung benötigten miRNA-Doppelstränge untersucht wurde, zeigen dass beide getesteten miRNAs (ath-miR171b,c und ath-miR396a) durch das MBP-HA-HC-Pro^{FRNK}-Protein gebunden wurden (Abb. 3.11 A). Der synthetische miRNA-Doppelstrang mit drei Basenfehlpaarungen in der zentralen Region und einer Basenfehlpaarung im flankierenden Bereich (ath-miR171b,c) wird ebenso stark gebunden wie ein miRNA-Doppelstrang mit einer Basenfehlpaarung in der zentralen Region (ath-miR396a). Diese Ergebnisse zeigen erneut keinen Zusammenhang zwischen der Bindungskapazität und der Struktur der miRNAs.

Das p19-Protein ist das RSS-Protein der Tombusviren und blockiert in Pflanzen das RNA Silencing durch die Bindung von sRNA-Molekülen (Lakatos et al., 2004). Das CIRV p19-Protein bindet in Form eines Dimers spezifisch 21 bp siRNA-Doppelstränge mit 2 nt 3'-Überhängen (Vargason et al., 2003) und sollte für vergleichende Studien in dieser Arbeit verwendet werden.

Dazu wurden gleiche Mengen des MBP-HA-HC-Pro^{FRNK}-Proteins und des CIRV p19-Proteins (NEB) in Gelshift-Analysen mit verschiedenen synthetischen sRNA-Doppelsträngen verwendet.

Die Ergebnisse zeigen eine starke Bindung von 21 bp siRNA-Doppelsträngen durch beide Proteine (Abb. 3.11 B). Die Bindung der 19 bp und 24 bp siRNA-Doppelstränge durch das p19-Protein erfolgte fast vollständig (Abb. 3.11 B). Beide Proteine wiesen jedoch eine geringere Bindung von miRNA-Doppelsträngen im Vergleich zu den 21 bp siRNA-Doppelsträngen auf (Abb. 3.11 B).

Dies zeigt, dass die RSS-Proteine eine bestimmte Spezifität für sRNA-Moleküle besitzen und diese selektiv binden. Eine unspezifische Bindung von siRNAs mit unterschiedlicher Länge durch das rekombinante p19-Protein (NEB) erfolgt durch das Vorhandensein der zusätzlichen Fusionsproteine (Molnar A: persönliche Mitteilung, Universität Cambridge, UK, 2009). Das native p19-Protein bindet dagegen spezifisch 21 bp siRNAs. Eine verstärkte Bindung durch das CIRV p19-Protein könnte durch optimierte Pufferbedingungen des p19-Proteins erklärt werden.



Zur Analyse eines Zusammenhangs zwischen der Bindungsstärke der HC-Pro und der Anzahl von Basenfehlpaarungen bzw. der Lage der Basenfehlpaarungen innerhalb des miRNA-Doppelstranges wurden unterschiedliche synthetische miRNAs verwendet.

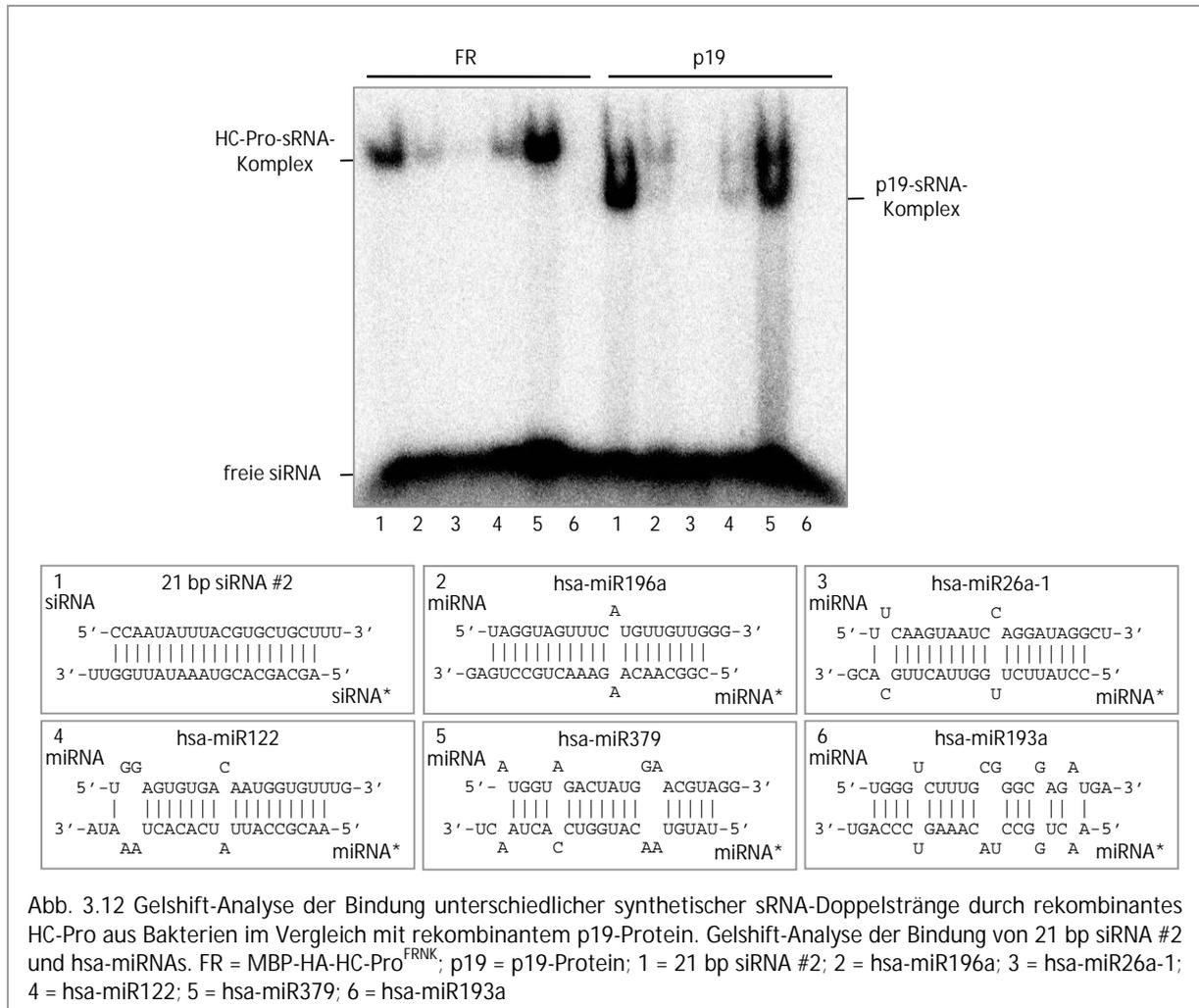
Die Sequenz-spezifischen miRNA-Doppelstränge stammten aus Homo sapiens und besaßen zwischen ein und fünf Basenfehlpaarungen innerhalb des Doppelstrangs. Die Sequenzen sowie die Anzahl und Lage der Basenfehlpaarungen innerhalb des Doppelstrangs werden in Abb. 3.12 gezeigt.

Die Ergebnisse der Gelshift-Analysen zeigen, dass neben dem 21 bp siRNA-Doppelstrang, der als Positivkontrolle diente, auch die hsa-miR379 mit insgesamt vier Basenfehlpaarungen, die sich über den gesamten Doppelstrang erstrecken, durch das MBP-HA-HC-Pro^{FRNK}-Protein gebunden werden (Abb. 3.12).

Darüber hinaus erfolgte eine vergleichbar schwächere Bindung von miRNA-Doppelsträngen mit einer Basenfehlpaarung in der zentralen Region (hsa-miR196a) sowie mit drei Basenfehlpaarungen sowohl in der zentralen Region als auch im flankierenden Bereich (hsa-miR122). Die beiden miRNA-Doppelstränge mit zwei (hsa-miR26a-1) und fünf Basenfehlpaarungen (hsa-miR193a) wurden nicht durch die HC-Pro gebunden (Abb. 3.12).

Die Ergebnisse der Gelshift-Analysen des p19-Proteins sind mit denen des HC-Pro-Proteins vergleichbar (Abb. 3.12). Neben einer starken Bindung der hsa-miR379 (vier Basenfehlpaarungen) wurden die hsa-miR196a (eine Basenfehlpaarung) und hsa-miR122 (drei Basenfehlpaarungen) nur schwach sowie die hsa-miR26a-1 (zwei Basenfehlpaarungen) und hsa-miR193a (fünf Basenfehlpaarungen) überhaupt nicht durch das p19-Protein gebunden.

Zusammen mit den erzielten Ergebnissen der Gelshift-Analysen mit den HC-Pro-Proteinen aus Pflanzen in Abschnitt 3.3 konnte eine selektive Bindung von miRNAs nachgewiesen werden. Es lassen sich jedoch keine eindeutigen Aussagen über einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Basenfehlpaarungen bzw. einen Einfluss von deren Lage und der Bindekapazität treffen.

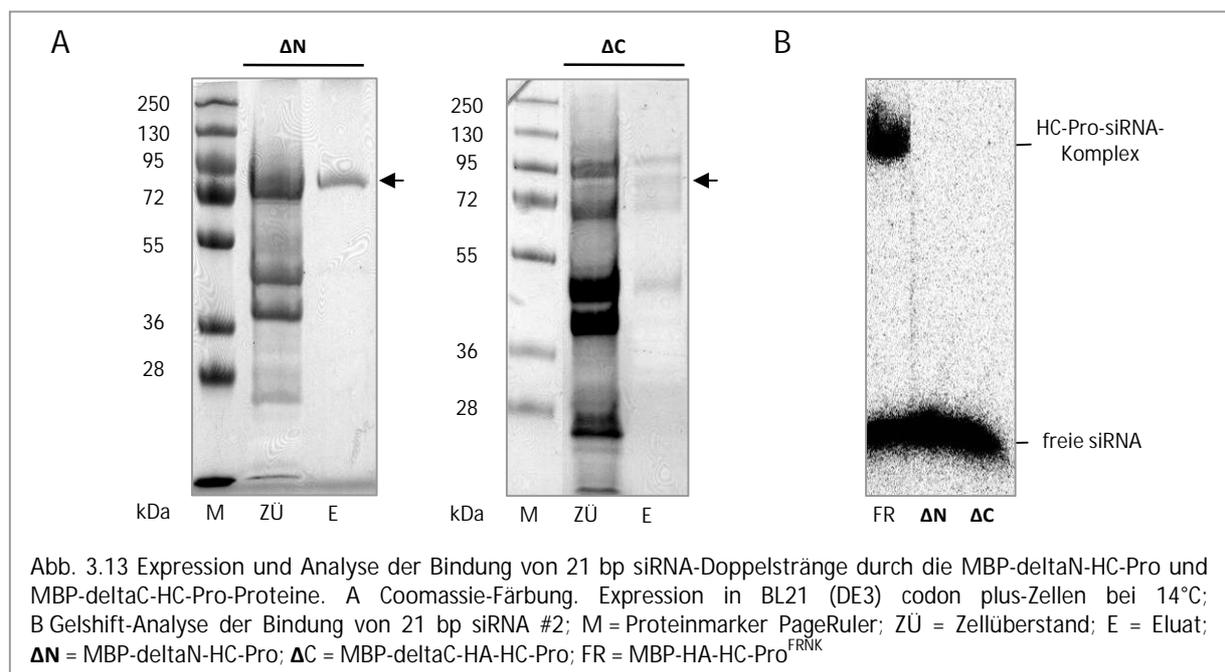


Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses des N-terminalen bzw. C-terminalen Bereichs der HC-Pro auf die Bindekapazität sowie zur Identifizierung eines Minimalmotivs der HC-Pro zur Bindung von sRNA-Doppelsträngen wurden durch gerichtete Mutationen N- und C-terminal verkürzte Varianten des Proteins erzeugt (Abschnitt 2.2.4.6).

Nach der Expression der MBP-HA-HC-Pro^{FRNK}-, MBP-deltaC-HA-HC-Pro- und MBP-deltaN-HC-Pro-Proteine unter den in Abschnitt 3.4 ermittelten Expressionsbedingungen in dem BL21 (DE3) codon plus-Stamm und einer Inkubation bei 14°C über Nacht konnten die Proteine mit dem BugBuster Protein Extraction Reagent isoliert und mit Hilfe der Amylose-gekoppelten Magnetpartikeln gereinigt werden.

Die Analyse der Proteine zeigt, dass die Expression im Vergleich zu den MBP-HA-HC-Pro-Proteinen geringer ausfiel. Beide Proteine waren nach der Aufreinigung und einer Coomassie-Färbung des Gels als schwache Banden bei 85 kDa (ΔN) bzw. 84 kDa (ΔC) nachweisbar. Die Proteinkonzentrationen lagen nach der Bradford-Bestimmung zwischen 30-80 ng/ μ l (Abb.3.13 A).

Zur Untersuchung der *in vitro* Bindung von 21 bp siRNA-Doppelsträngen durch die verkürzten Proteine wurden Gelshift-Analysen mit vergleichbaren Mengen der MBP-deltaC-HA-HC-Pro- und MBP-deltaN-HC-Pro-Proteine sowie dem MBP-HA-HC-Pro^{FRNK}-Protein als Positivkontrolle durchgeführt. Das Entfernen der N- bzw. C-terminalen Domäne der HC-Pro resultierte im vollständigen Verlust der Bindung von 21 bp siRNA-Doppelsträngen (Abb 3.13 B).



3.6 Identifizierung eines Faktors aus Pflanzen zur Erhöhung der Bindungseffizienz der HC-Pro aus ZYMV

Bisherige Studien zeigen, dass die Bindung von synthetischen siRNA-Doppelsträngen durch die HC-Pro aus TEV nach Zugabe eines *A. thaliana*-Proteinextrakts verstärkt wurde (Lakatos et al., 2006). Dieses Phänomen wurde jedoch nicht weiter analysiert.

In dieser Arbeit sollte analysiert werden, inwiefern die HC-Pro aus ZYMV ebenfalls eine erhöhte Bindung von 21 bp siRNA-Doppelsträngen nach Zugabe eines Pflanzenextrakts in den Gelshift-Analysen aufweist. Dazu wurden zunächst Gelshift-Analysen mit den über den N-terminalen HA-Tag gereinigten HA-HC-Pro-Proteinen aus Pflanzen durchgeführt.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.14 B zeigen, dass die HC-Pro-Proteine nach der IP nicht mehr in der Lage sind synthetische 21 bp siRNA-Doppelstränge zu binden und die Reinigung in einem vollständigen Verlust der Bindekapazität resultierte. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass durch die Reinigung des Proteins der pflanzliche Faktor, der die Bindung der HC-Pro verstärken könnte, entfernt wurde und dadurch die Bindung von 21 bp siRNA-Doppelsträngen durch die HC-Pro nicht mehr erfolgt.

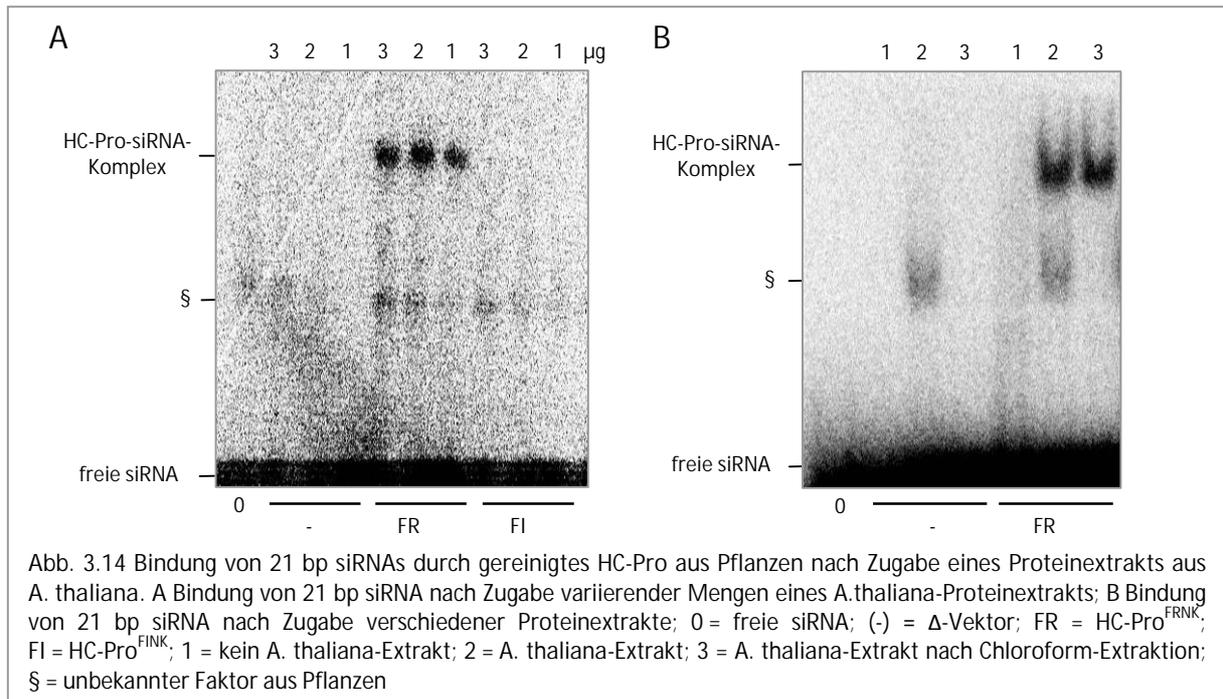
Zur Bestätigung des Effekts der Bindungsverstärkung des ZYMV HC-Pro-Proteins nach Zugabe eines pflanzlichen Proteinextrakts wurde ein Proteinextrakt aus Blättern von *A. thaliana* hergestellt und dieser zusätzlich in Gelshift-Analysen mit den durch die Anti-HA Agarose gereinigten HC-Pro-Proteinen zugegeben.

Die Ergebnisse veranschaulichen, dass die Verwendung des Proteinextrakts zur Bindung der 21 bp siRNA-Doppelstränge durch die gereinigte HA-HC-Pro^{FRNK} führte und variierende Mengen des Proteinextrakts (1-3 µg Gesamtproteinmenge) keinen konzentrationsabhängigen Effekt bei der Bindung bewirkte (Abb. 3.14 A).

Im Gegensatz dazu wurde nach Zugabe des Proteinextrakts keine Bindung der 21 bp siRNA-Doppelstränge durch die HA-HC-Pro^{FRNK} festgestellt (Abb. 3.14 A).

Des Weiteren konnte nach erfolgter Chloroform-Extraktion des pflanzlichen Proteinextrakts, wodurch unlösliche Pflanzenreste und grüne Blattpigmente von den löslichen Proteinen getrennt wurden (Boonrod et al., 2005), ebenfalls ein verstärkender Effekt beobachtet werden (Abb. 3.14 B).

Als Negativkontrolle diente eine Infiltration von *N. benthamiana*-Pflanzen mit dem Agrobacterium-Stamm, der den pPCV702SM-Δ-Vektor ohne Expressionskassette enthielt und die anschließende Reinigung des daraus erzielten Proteinextrakts über die Anti-HA Agarose.



Die Ergebnisse der Versuche mit pflanzlich isolierten HC-Pro-Proteinen waren systembedingt sehr ungenau. Aus diesem Grunde wurden rekombinante MBP-HA-HC-Pro-Fusionsproteine aus Bakterien in den Gelshift-Analysen eingesetzt.

In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, in welchem Maße die Bindung des MBP-HA-HC-Pro-Proteins durch die Zugabe des *A. thaliana*-Proteinextrakts erhöht wird. Dazu wurden unterschiedliche Mengen des HC-Pro-Proteins (100-800 ng) in den Gelshift-Analysen verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit 800 ng des Proteins ohne zusätzlichen Faktor eine starke Bindung des siRNA-Doppelstrangs erfolgte; geringere Mengen des Proteins (100-200 ng) führten zu keiner Bindung. Nach der Zugabe des *A. thaliana*-Extrakts konnte bereits mit 200 ng des Proteins eine Bindung erzielt werden (Abb. 3.15 A).

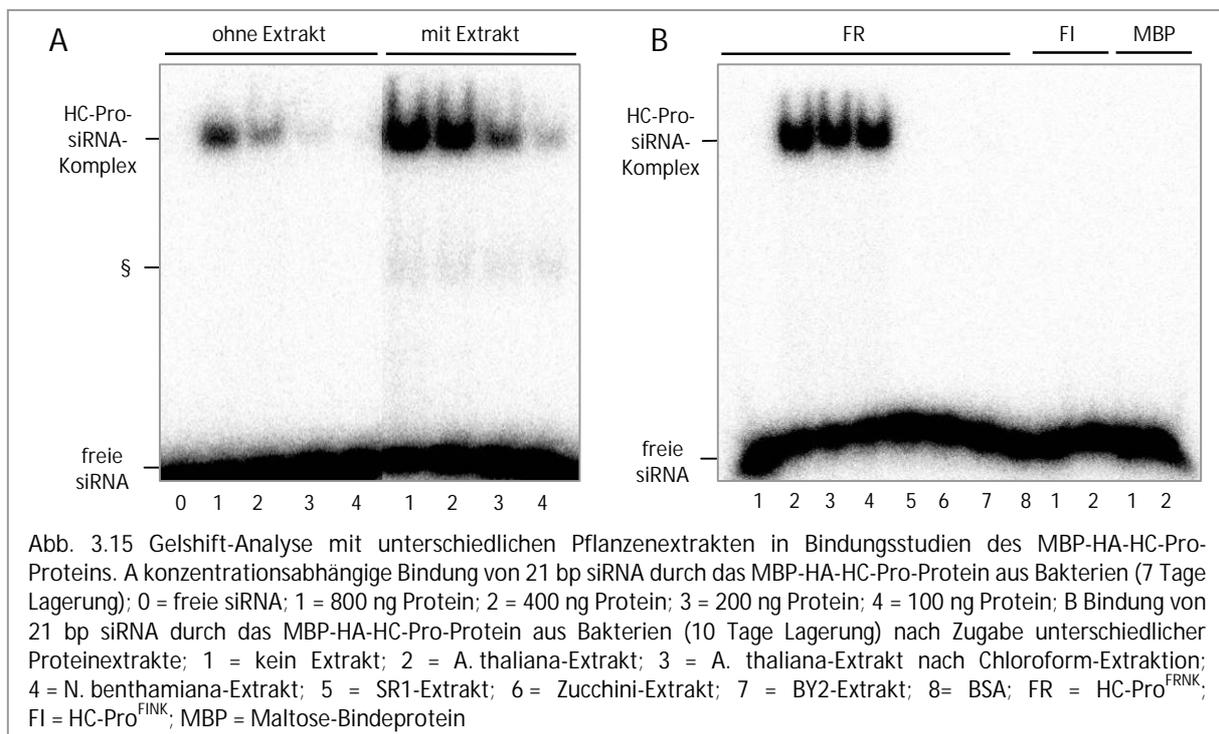
Ein Vergleich der konzentrationsabhängigen Bindung sowohl mit als auch ohne *A. thaliana*-Extrakt zeigt eine deutliche Verstärkung der Bindungskapazität des HC-Pro-Proteins, wobei die Bindungsstärke von 200 ng MBP-HA-HC-Pro nach Zugabe des Extrakts der Bindungsstärke von 800 ng des Proteins ohne Extrakt entsprachen (Abb. 3.15 A).

Dieser Effekt wird noch deutlicher, wenn die Zugabe des *A. thaliana*-Extrakts nach einer Lagerung des rekombinanten Proteins aus Bakterien erfolgt. Die Lagerung des Proteins bei -20°C führte bereits nach sieben Tagen zu einer verminderten Bindung (Abb. 3.15 A) und nach zehn Tagen zu einem vollständigen Verlust der Aktivität des Proteins (Abb. 3.15 B). Der Verlust der Bindungskapazität könnte durch eine Proteolyse des Proteins erklärt werden. Durch die Zugabe des *A. thaliana*-Extrakts zu den Gelshift-Analysen konnte die Bindung von 21 bp siRNA-Doppelsträngen durch die HC-Pro

wiederhergestellt werden, was einen Hinweis auf einen unterstützenden Einfluss durch das unbekannte Pflanzenprotein gibt (Abb. 3.15 B).

In den durchgeführten Bindungsstudien wurden bisher ausschließlich *A. thaliana*-Extrakte verwendet, um eine verstärkte Bindung von 21 bp siRNA-Doppelsträngen durch die HC-Pro zu erzielen. Um nachzuweisen, ob dieser Faktor auch in anderen Pflanzen, vor allem aber in den Wirtspflanzen des ZYMV wie Zucchini, vorhanden ist, wurden Proteinextrakte von *N. benthamiana*, *N. tabacum* (SR1), Zucchini bzw. aus der Tabakzelllinie *N. tabacum* cv. BY-2 hergestellt und für die Gelshift-Analysen mit dem rekombinanten MBP-HA-HC-Pro-Protein verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Bindung der 21 bp siRNA-Doppelstränge nur durch den *A. thaliana*-Extrakt und den *A. thaliana*-Extrakt nach erfolgter Chloroform-Extraktion wiederhergestellt wurde; das verwendete MBP-HA-HC-Pro-Protein ohne Extrakt wies dagegen keine Bindung auf (Abb. 3.15 B). Interessanterweise führte der Proteinextrakt aus *N. benthamiana*-Blättern ebenfalls zu einer verstärkten Bindung, die Extrakte aus *N. tabacum*, der Zelllinie BY-2 und aus der Wirtspflanze Zucchini jedoch nicht (Abb. 3.15 B). Als Negativkontrollen wurden BSA und das MBP verwendet.



Die Analyse des *A. thaliana*-Faktors zur Verstärkung der Aktivität von HC-Pro in den Gelshift-Analysen erforderte eine Fraktionierung des Proteinextrakts durch die Gelfiltrationschromatographie mit dem ÄKTAPrime plus System und der Auswertung mit der Software PrimeView 5.0. Die eingesetzte Säule

HiLoad 16/60 Superdex 200 pg ermöglichte die Auftrennung der Proteine nach deren MW im Bereich von 10-600 kDa.

Hierzu wurde ein Proteinextrakt aus 10 g Blättern von *A. thaliana* in 5 ml Proteinextraktionspuffer hergestellt und eine Chloroform-Extraktion durchgeführt, um eine Verstopfung der Säule durch Schwebeteilchen zu verhindern. Die Chromatographie verlief bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/Min. und die einzelnen Fraktionen (je 1 ml) wurden gesammelt. Mit Hilfe des UV-Detektors konnte ein Chromatogramm erstellt werden (Abb. 3.16), das Auskunft über den chromatographischen Trennprozess der insgesamt 240 gesammelten Fraktionen gab. Dazu wurde die gemessene Absorption [mAu] gegenüber der Zeit [Min.] aufgetragen. Bei 46,4; 69,9; 94,3; 149,9 und 185,5 Min. konnten minimale Peaks bei einer Absorption zwischen 30-70 mAu detektiert werden. Daneben wurden weitere Peaks nach 57,6 Min. bei 400 mAu; nach 120,1 Min. bei 750 mAu und ein sehr dominanter Peak nach 114,4 Min. bei über 2000 mAu erzielt (Abb. 3.16 #6). Die gesammelten Fraktionen wurden den einzelnen Peaks (#1-10) entsprechend zusammengefasst und mit Hilfe eines Dialyseschlauches, dessen Ausschluss 3,5 kDa betrug, auf PEG 20.000 zu einem Gesamtvolumen von 100 µl eingengt.

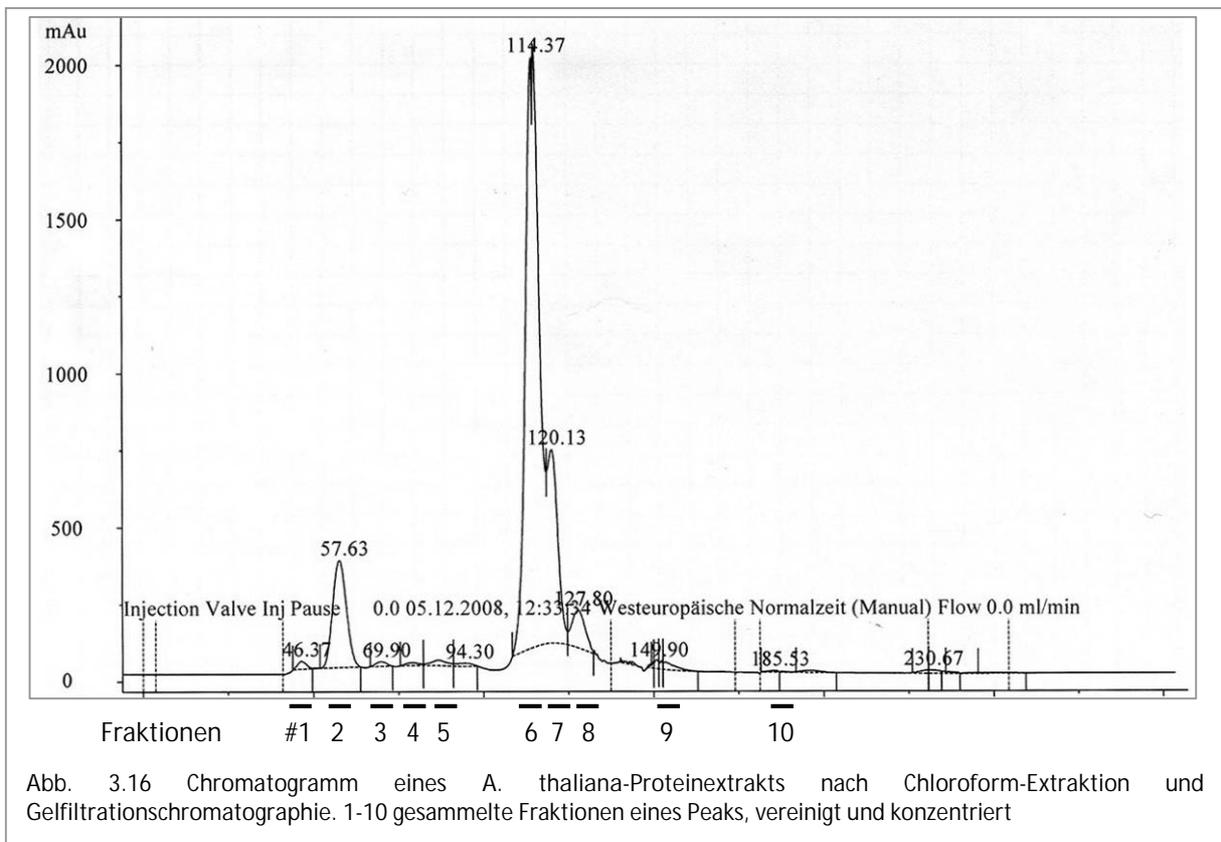


Abb. 3.16 Chromatogramm eines *A. thaliana*-Proteinextrakts nach Chloroform-Extraktion und Gelfiltrationschromatographie. 1-10 gesammelte Fraktionen eines Peaks, vereinigt und konzentriert

Zur Analyse der erhaltenen *A. thaliana*-Fraktionen wurden im Anschluss ergänzende Gelshift-Analysen durchgeführt, bei denen rekombinante MBP-HA-HC-Pro-Proteine aus Bakterien verwendet wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von synthetischen 21 bp siRNA-Doppelsträngen durch 300 ng des MBP-HA-HC-Pro-Proteins nach der Zugabe der Fraktionen teilweise verstärkt wurde (Abb. 3.17 A). Vor allem für die Fraktionen #7-10 wurde ein verstärkender Effekt beobachtet, der mit einer Bindungsstärke nach der Zugabe des *A. thaliana*-Proteinextrakts nach Chloroform-Extraktion vergleichbar war. Die Fraktionen #1, 2, 5 und 6 bewirkten eine Verminderung der Bindung, was durch die Aktivität und das Vorhandensein von pflanzlichen Proteasen oder durch den Effekt eines Proteins mit unbekannter Funktion erklärt werden könnte (Abb. 3.17 A).

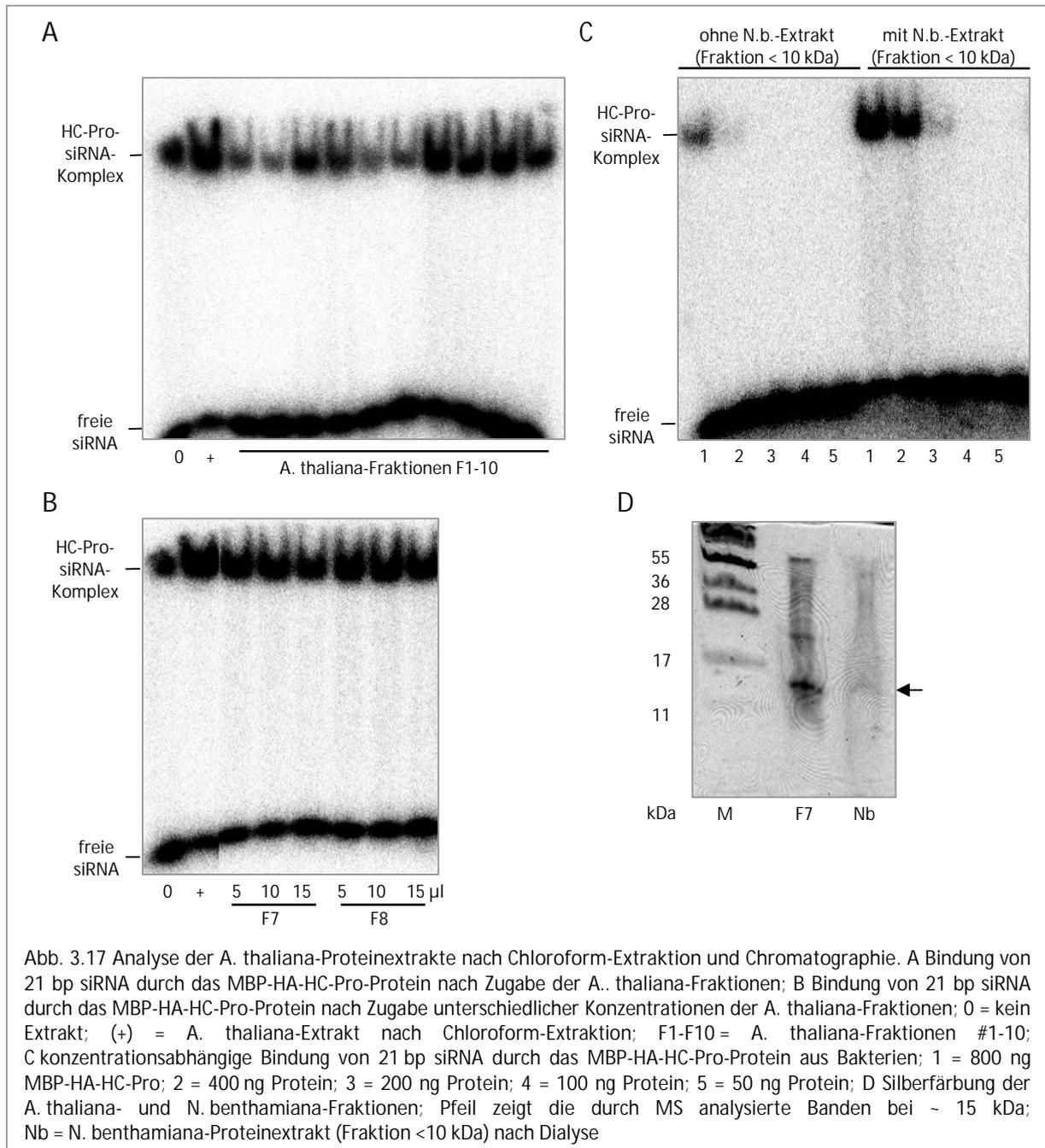
Zur Untersuchung eines konzentrationsabhängigen Effekts der *A. thaliana*-Fraktion wurden variierende Mengen der Fraktionen #7 und #8 verwendet. Die Ergebnisse zeigen jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Bindungsstärke (Abb. 3.17 B).

Die Analyse der Bindungs-verstärkenden Fraktion #7 nach einer Silberfärbung führte zu einer Proteinbande bei ~15 kDa (Abb. 3.17 D).

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass auch *N. benthamiana*-Proteinextrakte eine Verstärkung der Bindung bewirken (vgl. Abb. 3.15 B). Aus diesem Grunde wurde ein *N. benthamiana*-Extrakt hergestellt, bei dem mit Hilfe einer Vivaspin 2-Säule die meisten Proteine mit einem MW > 10 kDa entfernt wurden.

Im Anschluss wurden Gelshift-Analysen mit unterschiedlicher Konzentration der MBP-HA-HC-Pro durchgeführt. Die Bindung von 21 bp siRNA-Doppelsträngen erfolgte nur bei einer Menge von 800 ng MBP-HA-HC-Pro; bei gleichzeitiger Zugabe des *N. benthamiana*-Extrakts (Fraktion < 10 kDa) konnte auch bei 400 ng Protein eine starke Bindung nachgewiesen werden (Abb. 3.17 C). Entsprechende Ergebnisse wurden bereits nach Zugabe des *A. thaliana*-Extrakts erzielt (vgl. Abb. 3.14 A).

Vergleicht man die Proteine der *A. thaliana*-Fraktion #7 und die Proteine des *N. benthamiana*-Extrakts (Fraktion < 10 kDa), so konnte man nach der Silberfärbung in beiden Proben eine gemeinsame Bande bei ~ 15 kDa nachweisen (Abb. 3.17 D). Die stärker erscheinende Bande der *A. thaliana*-Fraktion #7 wurde aus dem Gel isoliert und für eine MALDI-TOFMS-Analyse zu der Firma Proteome Factory geschickt.



Die erzielten Daten der Massenspektroskopie wurden mit Hilfe der Mascot-Datenbank für die Identifizierung der Proteine analysiert. Die aus der Datenbanksuche erzielten Ergebnisse führten zur Untersuchung zweier Kandidaten, die einen möglichen Einfluss auf die Aktivität der HC-Pro ausüben könnten. In Abb. 3.18 sind die Aminosäuresequenzen dargestellt und die über die MS-Analyse ermittelten Peptidsequenzen hervorgehoben. Das MW der beiden Proteine liegt zwischen 12 und 15 kDa und stimmt mit dem MW der durch die Silberfärbung ermittelten Bande überein (Abb. 3.17 D; ~ 15 kDa Bande).

unbekanntes Protein (QP) (*A. thaliana*); RmlC-type Cupin Domäne; NP_192768;
14,9 kDa; Score = 88

1 MGCIGVVNVT SINPYLTRRS NKPYNRRPS SMAAAIRAES TEK**LGITIEK**
51 NPPESK**LTQL** **GVR**SWPKWGC PPSKFPWTYS AKETCYLLQG KVKVYPNGSD
101 EGVEIEAGDF VVFPKGMSC TWDVSVAVDKH YQFE

LP1 (unspezifisches Lipid Transfer Protein) (*A. thaliana*); Calmodulin-Bindung; NP_181388;
11,8 kDa; Score = 72

1 MAGVMKLACL LLACMIVAGP ITSNAALSCG SVNSNLAACI GYVLQGGVIP
51 PACCSGVKNL NSIAKTTPDR QQACNCIQGA AR**ALGSLNA** **GRAAGIPKAC**
101 GVNIPYKIST STNCKTVR

Abb. 3.18 Ergebnisse der Mascot-Datenbankanalyse mit Aminosäuresequenzen der putativen Kandidaten mit Einfluss auf die Bindung der HC-Pro in Gelshift-Assays. Übereinstimmende Peptidsequenzen wurden hervorgehoben.

Zur Analyse der beiden Proteine LP1 und QP sollten diese rekombinant in Bakterien erzeugt werden. Dazu wurde eine cDNA aus Blättern von *A. thaliana*-Pflanzen hergestellt und mit Hilfe von Gen-spezifischen Primern die entsprechenden kodierenden Sequenzen in das bakterielle Expressionsplasmid pET32a(+), wie in Abschnitt 2.2.4.8 bzw. 2.2.4.9 beschrieben, kloniert. Das pET32a(+)-Expressionsplasmid ermöglicht eine Expression der zu untersuchenden Proteine mit einem N-terminalen Thioredoxin-Protein (Trx-Tag) (LaVallie et al., 1993), durch das die Löslichkeit des Fusionspartners erhöht wird, einem S-Tag, eine Enterokinase-Schnittstelle sowie jeweils einen 6 x His-Tag am N- und C-Terminus zur Reinigung des Proteins über eine Ni-NTA-Matrix. Das MW des Trx-Proteins einschließlich der Tags beträgt 19,1 kDa.

Die Expression erfolgte in BL21 (DE3) codon plus-Zellen über Nacht bei 14°C. Es konnten jedoch keine ausreichenden Mengen des Trx-LP1-His-Proteins für die Gelshift-Analysen hergestellt werden.

Die Analyse des Trx-QP-His-Proteins über einen Western Blot mit dem Anti-His Antikörper führte zu starken Signalen, die bei 34 kDa lagen und dem MW des Proteins entsprachen (Abb. 3.19 A).

Die Reinigung der Proteine erfolgte mit Hilfe einer Ni-NTA-Agarose und anschließender Rückgewinnung von der Matrix mit Hilfe des MBP-Puffers und 250 mM Imidazol. Da das Imidazol einen störenden Einfluss auf die Aktivität des MBP-HA-HC-Pro-Proteins hatte, erfolgte eine Dialyse des Elutionspuffers mit einer Vivaspin 500-Säule (Daten nicht gezeigt).

Als Negativkontrolle für die Analyse wurde ein GFP-His-Protein verwendet, dessen Reinigung und Dialyse analog zum Trx-QP-His-Protein durchgeführt wurde.

Der Nachweis der Expression des Trx-QP-His-Proteins erfolgte mittels eines Western-Blot mit dem Anti-His Antikörper. Die Quantität und die Reinheit der isolierten Proteine wurden durch eine Coomassie-Färbung der Proteine analysiert.

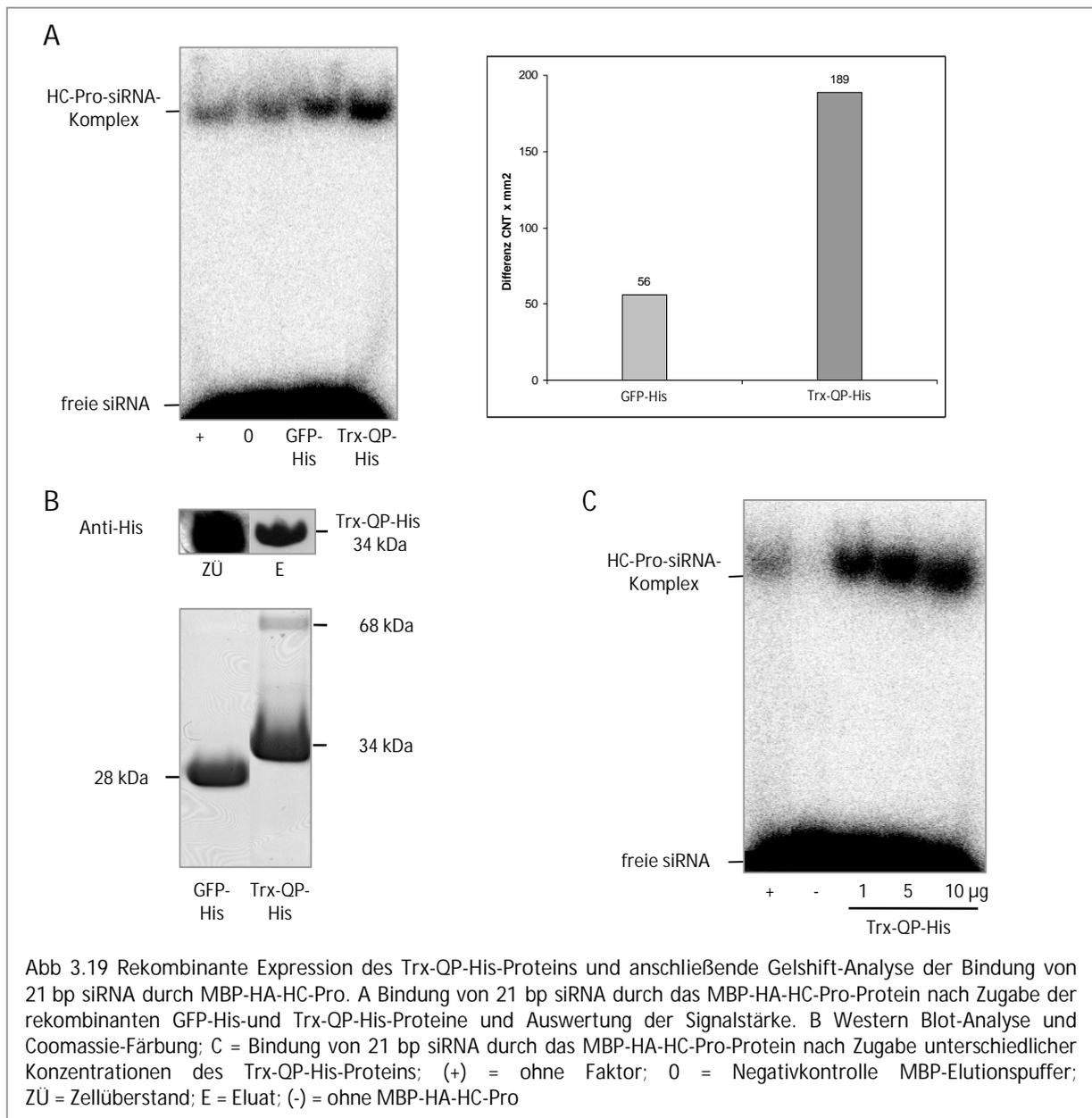
Die Ergebnisse zeigen, dass das Trx-QP-His-Protein unter den verwendeten Expressionsbedingungen stark exprimiert wurde und konnte als Signal bei 34 kDa im Western Blot nachgewiesen werden. Nach der Reinigung über den His-Tag lag das Protein sowohl als Monomer (34 kDa) als auch als Dimer (68 kDa) vor (Abb. 3.19 B).

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses auf die Bindung von siRNA-Doppelsträngen durch das MBP-HA-HC-Pro-Protein wurden Gelshift-Analysen mit den gereinigten Proteinen durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von 10 µg des gereinigten Trx-QP-His-Proteins zu einer verstärkten Bindung der 21 bp siRNA-Doppelstränge durch die MBP-HA-HC-Pro führt, daneben hatten vergleichbare Mengen des GFP-His-Proteins (vgl. Abb. 3.19 B) keinen signifikanten Einfluss auf die siRNA-Bindung (Abb. 3.19 A).

Die Analyse der Bindung erfolgte mit der Quantity One-Software anhand der Signalstärken der gebundenen siRNA-Doppelstränge. Dabei diente die Bindungsreaktion nach der Zugabe des MBP-Puffers als Hintergrundwert und wurde von den übrigen Signalen subtrahiert. Dadurch konnte eine dreifach stärkere Bindung der HC-Pro durch Zugabe des Trx-QP-His-Proteins im Vergleich zum GFP-His-Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.19 A).

Um den konzentrationsabhängigen Einfluss des Trx-QP-His-Proteins auf die Aktivität der MBP-HC-Pro zu analysieren, wurden geringere Mengen des Proteins verwendet. Die Verwendung von 1, 5 und 10 µg des Trx-QP-His-Proteins führte zu einem konzentrationsabhängigen Effekt der Bindungsstärke. Des Weiteren erfolgte keine Bindung der siRNA-Doppelstränge durch das Trx-QP-His-Protein (Abb. 3.19 C).



3.7 Untersuchung der autoproteolytischen Aktivität der HC-Pro aus ZYMV und Identifizierung der katalytischen Domäne

Das Genom der Potyviren besitzt ein offenes Leseraster und kodiert für ein 350 kDa großes Polyprotein (Riechmann et al., 1992; Riechmann et al., 1995). Dieses wird durch die Aktivität von drei Virus-kodierten Proteasen in „reife“ Proteine überführt. Neben der NIa-Protease, die die Spaltung des Polyproteins an unterschiedlichen Stellen in trans sowie an den eigenen C-Terminus durchführt, katalysieren die beiden zusätzlichen Proteasen P1 und HC-Pro die autoproteolytische Aktivität nur an den eigenen C-Termini und spalten sich damit aus dem Polyprotein (Carrington & Dougherty, 1987b, a; Carrington et al., 1989a; Verchot et al., 1991).

In dieser Arbeit sollte die proteolytisch aktive Domäne der ZYMV HC-Pro mit Hilfe von AS-Austauschen bzw. -Deletionen identifiziert werden.

Die autoproteolytische Aktivität der ZYMV HC-Pro sollte zunächst mit dem Fusionsprotein MBP-HA-HC-Pro-GFP analysiert werden. Dazu wurde das Plasmid pMAL.c2X:HA-HC-Pro-GFP wie in Abschnitt 2.2.4.5 beschrieben erzeugt. Über eine PCR mit dem pKB:biNLS-HA-HC-Pro-Vektor als Matrize wurde die HC-Pro-GFP kodierende Sequenz amplifiziert und über den 5'-Primer die HA-Tag kodierende Sequenz eingebracht und das Zwischenprodukt in den pJET1.2/blunt-Vektor kloniert. In einer zweiten PCR wurden zwei XbaI-Schnittstellen eingefügt und das PCR-Produkt im Anschluss in den mit XbaI linearisierten pMAL.c2X-Vektor kloniert.

Die Expression des MBP-HA-HC-Pro-GFP und der Mutanten erfolgte in BL21 (DE3) codon plus-Zellen bei 14°C über Nacht nach der Induktion mit 1 mM IPTG. Die Proteinextraktion wurde mit dem BugBuster Protein Extraction Reagent durchgeführt und anschließend wurden die Proteine aus dem Zellpellet bzw. aus dem Zellüberstand mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über einen Western Blot mit dem Anti-GFP Antikörper analysiert.

Die Ergebnisse des Western Blots mit dem Anti-GFP Antikörper zeigen, dass das MBP-HA-HC-Pro-GFP nur im Zellpellet als Gesamtlängenprotein mit einem MW von 126 kDa vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass dieses trotz des MBP und des GFP nicht löslich ist und dadurch unlösliche Aggregate bildet. Daneben konnten zusätzlichen Banden detektiert werden, diese stammen vermutlich von Abbauprodukten des HC-Pro-Proteins (Abb. 3.21 A, Spur 1). Die Analyse der löslichen Proteine zeigt eine Bande des GFP bei 28 kDa (Abb. 3.21 B, Spur 1), aber keine Bande für das Gesamtlängenprotein (Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrolle diente das GFP-His Protein mit einem MW von 28 kDa (Abb. 3.21 A & B, Spur 9).

Um einen Einfluss des N-terminalen Bereichs des HC-Pro-Proteins auf die autoproteolytische Aktivität auszuschließen, wurde eine Mutante generiert, der die ersten 93 AS im HC-Pro-Protein fehlen (mut N2). Die Mutante wurde wie in Abschnitt 2.2.4.6 beschrieben erzeugt und dabei wurde in die HA-HC-Pro kodierende Sequenz eine zusätzliche SacI-Schnittstelle eingebracht. Nach erfolgreichem Restriktionsverdau des pMAL.c2X:HA-HC-Pro-GFP-Vektors mit SacI konnte eine Bande bei 279 bp isoliert und der Vektor nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion wieder ligiert und somit das pMAL.c2X-HC-Pro mut N2-GFP-Konstrukt erzeugt werden. Das Fusionsprotein wird in Abb. 3.20 schematisch dargestellt.

Eine Studie mit der TEV HC-Pro zeigte, dass ein Austausch der Aminosäure Gly-459 (G) in P1-Position durch Lys-459 (K) zu einem vollständigen Verlust der autoproteolytischen Aktivität führt (Carrington & Herndon, 1992). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die C-terminalen Aminosäuren des ZYMV HC-Pro-Proteins, von denen die AS Tyr-453 (Y; P4-Position), Val-455 (V; P2-Position) und Gly-456 (G; P1-Position) innerhalb der Potyviren konserviert sind (Abb. 3.20), einen Einfluss auf die autoproteolytische Aktivität des Proteins haben.

Nach erfolgter Mutagenese, durch welche die AS Gly-456 der ZYMV HC-Pro mit der AS Lys-456 ersetzt wurde (Abb. 3.20, mut C1 G456K) und der anschließenden Expression des MBP-HA-HC-Pro mut C1-GFP in Bakterien wurde ein Western Blot durchgeführt.

Die Ergebnisse in Abb 3.21 zeigen, dass der Aminosäureaustausch in der Sequenz der ZYMV HC-Pro im Gegensatz zur TEV HC-Pro keinen Einfluss auf die autoproteolytische Aktivität hat. Die Analyse der löslichen Proteine durch einen Western Blot zeigen, dass das GFP vollständig abgespalten wird (Abb. 3.21 A, Spur 3) und nur im Zellpellet das Gesamtlängenprotein mit einem MW von 126 kDa nachweisbar ist (Abb. 3.21 B, Spur 3). Diese Daten deuten darauf hin, dass die ZYMV HC-Pro eine von der TEV HC-Pro abweichende proteolytische Domäne besitzt.

In Mutationsanalysen der TEV HC-Pro wurde gezeigt, dass es sich bei dieser um eine Cystein-Protease mit den AS Cys-345 oder His-418 in der proteolytisch aktiven Domäne handelt. Ein Aminosäureaustausch einer der beiden AS gegen ein Ser resultierte im Verlust der autoproteolytischen Aktivität (Oh & Carrington, 1989). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Mutanten erzeugt, bei denen entweder die konservierte AS His-415 durch die AS Ser-415 (mut C4 H415S) oder die AS Cys-342 durch die AS Ser-342 (mut C5 C342S) der ZYMV HC-Pro ausgetauscht wurden (Abb. 3.20).

Die Ergebnisse zeigen, dass auch der Austausch dieser Aminosäuren keinen Einfluss auf die autoproteolytische Aktivität der ZYMV HC-Pro hat. Das GFP wird vollständig abgespalten und liegt als lösliches Protein vor (Abb. 3.21 A, Spur 4 & 5), die Gesamtlängenproteine mit einem MW von 126 kDa konnten nur im Zellpellet nachgewiesen werden (Abb. 3.21 A, Spur 4 & 5). Die ZYMV HC-Pro besitzt daher eine von der TEV HC-Pro abweichende proteolytisch aktive Domäne.

Zur Analyse der proteolytisch aktiven Domäne der ZYMV HC-Pro wurden AS-Deletionen im C-terminalen Bereich des Proteins erzeugt und im Anschluss die autoproteolytische Aktivität der Proteine untersucht. Die Herstellung der Expressionsplasmide für die Expression in Bakterien erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4.6 beschrieben. Dazu wurden, ausgehend von dem pMAL:HA-HC-Pro-GFP-Vektor, durch gerichtete Mutagenesen zusätzliche NcoI-Schnittstellen in den Vektor eingebracht, um durch einen Restriktionsverdau die entsprechende Teilsequenz der HC-Pro kodierenden Sequenz zu entfernen. Anschließend erfolgte die Expression im

BL21 (DE3) codon plus-Stamm bei 14°C über Nacht nach einer Induktion mit 1 mM IPTG. Die Proteine wurden isoliert und mit Hilfe von Western Blot-Analysen mit dem Anti-GFP Antikörper analysiert. Zunächst erfolgte die Deletion der AS 322-456 (Abb. 3.20, mut C7 Δ 322-456), dies entsprach der vollständigen C-terminalen Region der ZYMV HC-Pro und sollte im Verlust der autoproteolytischen Aktivität resultieren.

Die Ergebnisse des Western Blots zeigen, dass das MBP-HA-HC-Pro mut C7-GFP Protein als unlösliches Protein mit einem MW von 111 kDa vorliegt (Abb. 3.21 A, Spur 6) und bei der Analyse der löslichen Proteine kein GFP und Gesamtlängenprotein detektiert werden konnte (Abb. 3.21 B, Spur 6). Dies weist darauf hin, dass die HC-Pro-Mutante keine autoproteolytische Aktivität besitzt und in Folge dessen vollständig in einer unlöslichen Form vorliegt.

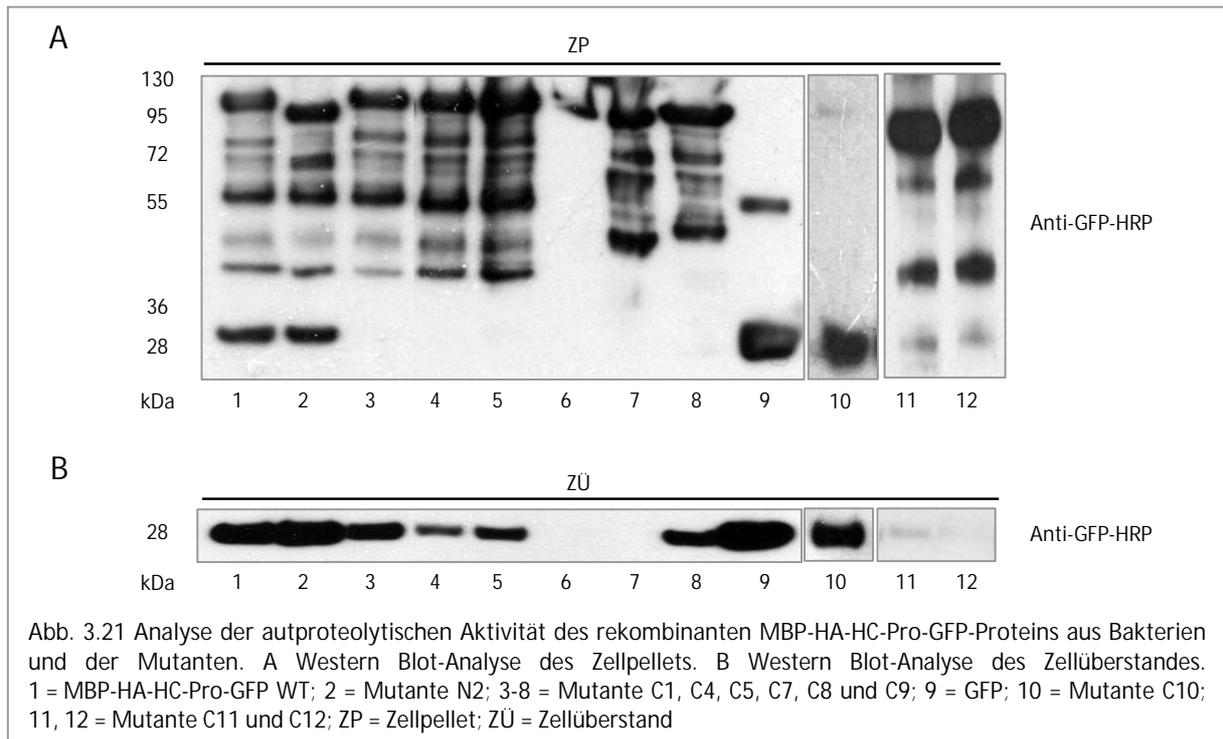
Mit Hilfe von drei zusätzlichen AS-Deletionen (Abb. 3.20, mut C8-C10) sollte die proteolytisch aktive Domäne weiter eingeschränkt werden. Die Ergebnisse veranschaulichen, dass die Spaltung des GFP vom Fusionsprotein nur bei dem MBP-HA-HC-Pro mut C8-GFP erfolgt, dem die AS 350-456 fehlen (Abb. 3.21 B, Spur 7). Die beiden zusätzlichen Proteine mit einer Deletion der AS 373-456 (mut C9 Δ 373-456) bzw. 359-456 (mut C10 Δ 359-456) besitzen weiterhin eine autoproteolytische Aktivität, durch die das GFP vollständig abgespalten wird (Abb. 3.21 B, Spur 8 & 10). Durch dieses Ergebnis konnte die proteolytisch aktive Domäne zwischen den AS 350 und 358 lokalisiert werden.

Von diesen AS der ZYMV HC-Pro sind innerhalb der Potyviren die AS Leu-351 (L), Asn-353 (N; mit Ausnahme von Asp in LMV) und Glu-356 (E) konserviert (Abb. 3.20).

Durch die Deletion der AS Asn-353 (mut C12 Δ N353) bzw. der AS Glu-356 (mut C11 Δ E356) sollte untersucht werden, ob diese konservierten AS eine Funktion bei der autoproteolytischen Aktivität der ZYMV HC-Pro einnehmen.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei beiden Mutanten keine autoproteolytische Aktivität nachweisbar ist. In der Western Blot-Analyse der löslichen Proteine konnte kein GFP und keine Gesamtlängenproteine detektiert werden (Abb. 3.21 B, Spur 11 & 12). Die Gesamtlängenproteine akkumulieren sehr stark als unlösliche Aggregate (Abb. 3.21 A, Spur 11 & 12).

Diese Daten lassen darauf schließen, dass die AS Asn-353 und Gln-356 die proteolytisch aktive Domäne der ZYMV HC-Pro bilden, welche sehr stark von der TEV HC-Pro abweicht. Es ist nicht auszuschließen, dass im Bereich der AS 350-358 weitere AS einen Einfluss auf die autoproteolytische Aktivität der ZYMV HC-Pro haben.



3.8 Bestimmung der kritischen Aminosäuren für die Spaltung der HC-Pro aus ZYMV durch eine bakterielle Protease

Nach der Expression der HC-Pro sowohl in Pflanzen als auch in Bakterien wurden neben dem vollständigen Protein auch Spaltprodukte in Western Blot-Analysen detektiert (vgl. Abb. 3.8 B), die Abbauprodukte in Folge einer Aktivität von pflanzlichen bzw. bakteriellen Proteasen darstellen könnten.

Ziel dieser Studie ist es durch den Austausch der Aminosäuren in der Schnittstelle die Spaltung des HC-Pro-Proteins zu verhindern, um dadurch hohe Mengen des Proteins bei der Expression zu erzielen und die Stabilität der HC-Pro während der Lagerung zu verbessern.

Bereits in vorausgehenden Studien konnte man zeigen, dass die HC-Pro aus LMV nach einer Trypsin-Behandlung gespalten wurde. Nach einer N-terminalen Sequenzierung des dabei entstehenden 32 kDa Peptids zeigte man, dass die LMV HC-Pro an den Aminosäuren Thr-170 oder Gly-176 gespalten wurde (Plisson et al., 2003).

Diese innerhalb der Potyviren konservierten Aminosäuren kommen jedoch nicht in der Sequenz der ZYMV HC-Pro vor (Abb. 3.22).

Die kritischen Aminosäuren sollten identifiziert und im Anschluss deletiert bzw. ausgetauscht werden, um dadurch ein stabiles Protein zu erhalten.

ZYMV	135	INKAL M KGSL	V TQDELDL L	KQL L EMTQWF	RNHMHLTGEE	174
TuMV	137	LNA L IKGAT	V TGEEFSQAT	KHL L EIARYL	KNRTENIEKG	176
TEV	138	VSEIL F KGNK	LTGADLEE A S	THM L EIARFL	NNRTENMRIG	177
PVY	135	LNN F LKGKE	NTAHEWQ V AQ	LSL L ELARFQ	KNRTDNIKKG	174
LMV	137	LNA I V I KGNQ	AT S DEMAQ A S	NHV L EIARYF	KNRTENIQKG	176
Konsensus		: . . : **	* : *	: ** : : : :	. * : .	

Abb. 3.22 Aminosäure-Sequenzvergleich der HC-Pro-Proteine aus ZYMV, TuMV, TEV, PVY und LMV. Konservierte AS sind hervorgehoben und in der Konsensus-Sequenz als * markiert; mutierte AS in der Sequenz von ZYMV HC-Pro sind grau hinterlegt.

Zur Untersuchung der Abbauprodukte wurde ein MBP-HA-HC-Pro mut C7-GFP-His-Fusionsprotein verwendet (Abb. 3.23 C). Diese Variante des Proteins besaß keine autoproteolytische Aktivität, da die vollständige C-terminale Region des Proteins entfernt wurde, wodurch das GFP-His nicht abgespalten werden konnte und dadurch zum Nachweis und zur Aufreinigung des Spaltproduktes zur Verfügung stand (vgl. Abb. 3.21).

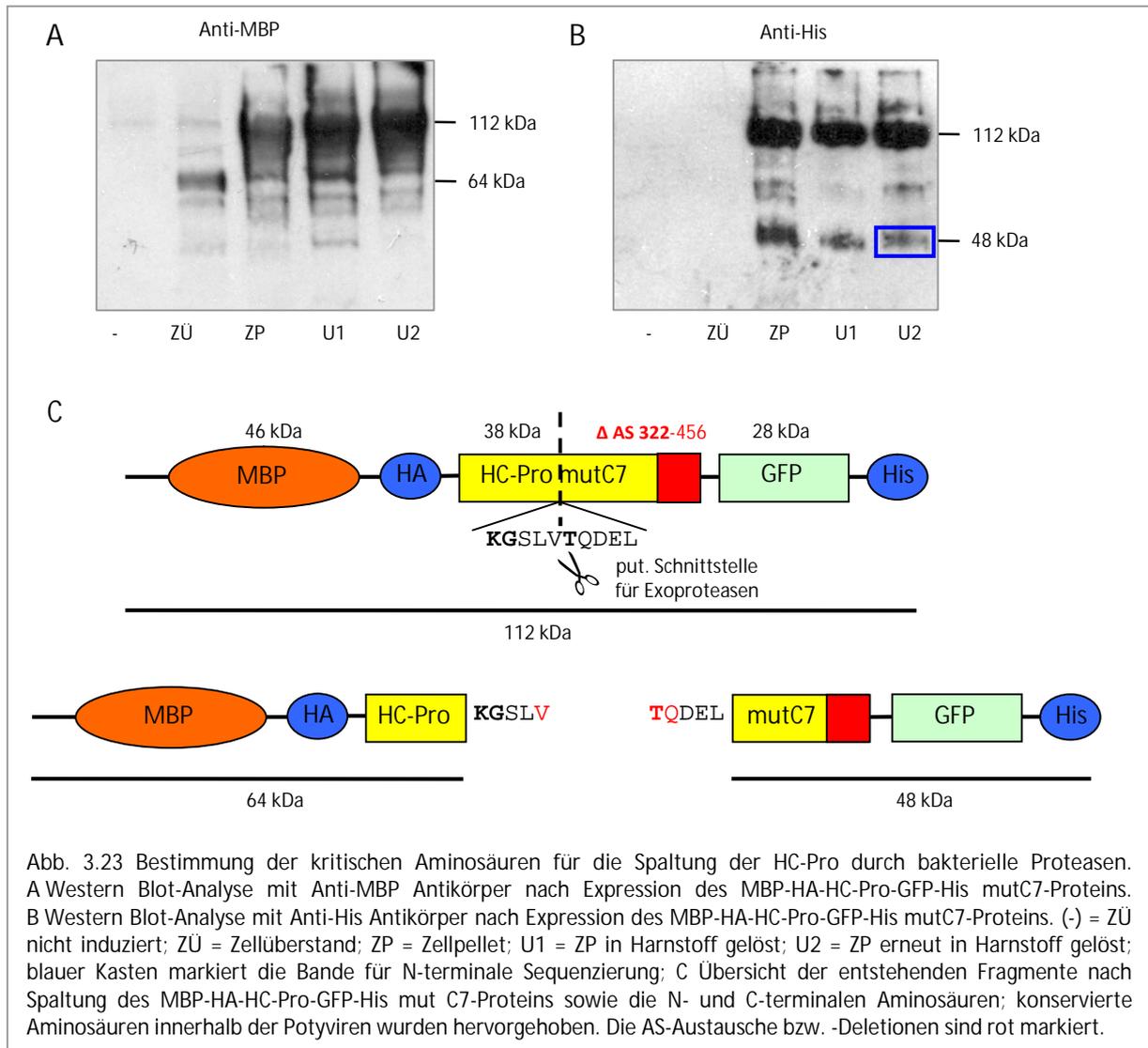
Die Herstellung des Expressionsplasmids wurde in Abschnitt 2.2.4.7 beschrieben. Die Expression erfolgte im E. coli-Stamm BL21 (DE3) codon plus über Nacht bei 14°C nach der Induktion mit 1 mM IPTG.

Durch Western Blot-Analysen mit dem Anti-MBP und dem Anti-His Antikörper sollten die Spaltprodukte analysiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass das vollständige MBP-HA-HC-Pro mut C7-GFP-His-Protein mit einem MW von 112 kDa in der Form von unlöslichen Aggregaten (inclusion bodies) vorliegt (Abb. 3.23 A & B). Die Behandlung der inclusion bodies mit 8 M Harnstoff führte nicht zu einer löslichen Form des Proteins, dies lag weiterhin als unlösliche Form im Pellet vor (Abb 3.23 A & B).

Zusätzlich wurde zu dem Signal bei 112 kDa eine weitere Bande bei ~ 64 kDa mit dem Anti-MBP Antikörper und eine Bande bei ~ 48 kDa mit dem Anti-His Antikörper nachgewiesen. Diese beiden Banden entsprachen der Größe des MBP-HA-HC-Pro- (64 kDa) und des HC-Pro-GFP-His-Fragments (48 kDa), von dem letzteres für die N-terminale Sequenzierung verwendet wurde (Abb. 3.23 C).

Nachdem das Protein mit Harnstoff nicht in eine lösliche Form gebracht werden konnte, wurde das Pellet in 10 % SDS gelöst und direkt über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine durch eine Coomassie-Färbung auf der Membran sichtbar gemacht. Die Bande bei 48 kDa (Abb. 3.23 B) wurde ausgeschnitten und für eine Edman-Sequenzierung zur Firma Proteome Factory geschickt.



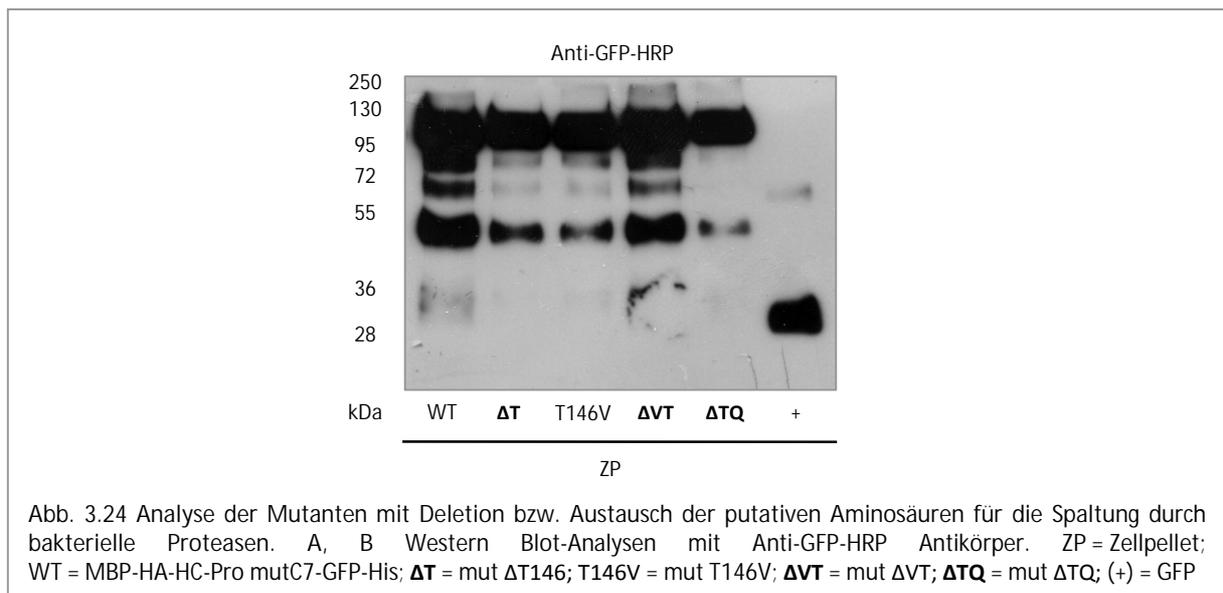
Die Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung zeigen, dass die Spaltung vor der Aminosäure Thr-146 oder Gln-147 erfolgte. Der Sequenzvergleich in Abb. 3.22 zeigt, dass die AS Thr-146 (T) innerhalb der Potyviren konserviert ist. Um zu überprüfen, ob diese AS einen Einfluss auf die Spaltung des HC-Pro-Proteins besitzt, sollte in weiteren Schritten durch eine Deletion ($\Delta T146$) bzw. einen Austausch (T146V) dieser konservierten Aminosäure sowie durch eine zusätzliche Deletion der benachbarten Aminosäuren Val-145 (ΔVT) und Gln-148 (ΔTQ) die Spaltung analysiert werden.

Die Western Blot-Analysen der rekombinanten Proteinextrakte nach der Expression im E. coli-Stamm BL21 (DE3) codon plus über Nacht bei 14°C zeigen, dass es zwischen dem MBP-HA-HC-Pro mut C7-GFP-His Protein und den erzeugten Mutanten keinen Unterschied bei der Spaltung gab.

Die Untersuchungen der unlöslichen Aggregate führte im Western Blot zu starken Signalen bei 112 kDa, welche den Gesamtlängenproteinen entsprechen. Darüber hinaus konnte eine zusätzliche

Bande bei ~ 48 kDa detektiert werden, die das C-terminale Fragment des gespaltenen Proteins darstellte (Abb. 3.24).

Die Ergebnisse der Western-Blot Analyse der löslichen Proteine zeigen, dass nur für das MBP-HA-HC-Pro mut C7-GFP-His-Protein ein starkes Signal des Gesamtlängenproteins mit einem MW von 112 kDa vorliegt. Die Analyse der Mutanten führte zu schwachen bzw. keinen Signalen für die Gesamtlängenproteine in der löslichen Form (Daten nicht gezeigt), diese lagen überwiegend in Form von unlöslichen Aggregaten vor (vgl. Abb 3.24).



4. Diskussion

4.1 ZYMV HC-Pro^{FRNK} und HC-Pro^{FINK} wirken als Suppressoren des RNA Silencing

Der natürlich vorkommende Austausch der AS Arg zu Ile an Position 180, innerhalb der in Potyviren konservierten FRNK-Box, der HC-Pro aus ZYMV führt zu abgeschwächten Symptomen in infizierten Wirtspflanzen. Neben den milden Symptomen in Kürbissen werden sowohl die Ausbreitung des Virus als auch die RSS-Aktivität nicht beeinflusst. Diese Mutation in anderen Vertretern der Potyviren TEV, TuMV und PVY führt dagegen zum vollständigen Verlust der RSS-Aktivität in Agrobacterium-vermittelten Infiltrationsversuchen von *N. benthamiana*-Pflanzen und verhindert die Ausbreitung der Viren in den Wirtspflanzen (Gal-On, 2000; Shibolet et al., 2007).

Die Funktionalität der pBIN-Vektoren, welche die HC-Pro kodierende Sequenz besitzen, wurde über die Agrobacterium-vermittelte Infiltration von Nb-16c, die das GFP konstitutiv exprimieren, untersucht. Das Agrobacterium-vermittelte transiente Expressionssystem dient zur effektiven Übertragung des Auslösers des RNA Silencing und der RSS-Konstrukte in intakte Pflanzenzellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die HC-Pro^{FRNK} als auch die Mutante HC-Pro^{FINK} starke RSS darstellen und die Mutation von Arg zu Ile diese Aktivität nicht beeinträchtigt (Abb. 3.1 A).

Die Zunahme der GFP-spezifischen siRNAs nach elf Tagen in den koinfiltrierten Blattbereichen deutet auf eine Stabilisierung bzw. Inaktivierung der siRNAs durch die HC-Pro-Proteine hin. Durch die Erhöhung der siRNA-Mengen wird verspätet das RNA Silencing etabliert, da die HC-Pro RSS-Aktivität nicht mehr ausreichend ist. In einem transienten Ansatz ist die maximale Expression der Proteine drei Tage nach der Infiltration erreicht und nimmt danach stetig ab (Voinnet et al., 2003), demzufolge könnten durch die Sättigung der HC-Pro-Bindung freie siRNAs das GFP Silencing induzieren.

Da für beide Proteine eine vergleichbare Menge an siRNAs detektiert werden konnte, die HC-Pro^{FINK}-Mutante aber eine verminderte Bindekapazität in vorherigen *in vitro* Bindungsstudien aufwies (Shibolet et al., 2007), stellt sich die Frage ob die HC-Pro zusätzliche Funktionen als RSS besitzt bzw. durch Interaktionen mit pflanzlichen Proteinen den RNA Silencing-Mechanismus blockiert.

Die Ergebnisse der Co-IP unterstützen diese Daten, da keine siRNAs mit der HC-Pro^{FINK} assoziieren (vgl. Abb. 3.1 D). Dies weist darauf hin, dass die Anreicherung der siRNAs nach elf Tagen auf die fehlende Umsetzung durch den RNA Silencing-Mechanismus zurückzuführen ist, da dieser durch HC-Pro blockiert wurde.

Aktuelle Studien zeigen eine Interaktion zwischen der TEV HC-Pro und dem Transkriptionsfaktor RAV2 aus *A. thaliana*. Es wird vermutet, dass durch diese Interaktion die Expression der endogenen RSS-Proteine FRY1 und CML38 erhöht und dadurch das RNA Silencing blockiert wird (Gy et al., 2007; Endres et al., 2010). Es ist durchaus möglich, dass auch die ZYMV HC-Pro über diesen oder einen

ähnlichen Mechanismus das RNA Silencing blockiert und die sRNA-Bindung nur eine unterstützende Funktion darstellt.

4.2 HC-Pro-Proteine haben keinen erkennbaren Einfluss auf die miRNA-Mengen in *N. benthamiana*

Eine wichtige Klasse von endogenen nicht-kodierenden sRNAs in Pflanzen stellen die miRNAs dar, die regulatorische Aufgaben von pflanzlichen Entwicklungsprozessen durch die Kontrolle der Expression von überwiegend Transkriptionsfaktoren auf posttranskriptioneller Ebene übernehmen (He & Hannon, 2004).

Zahlreiche Studien mit transgenen *N. tabacum*- und *A. thaliana*-Pflanzen, die das P1/HC-Pro als Transgen enthalten zeigen, dass die Anwesenheit des P1/HC-Pro-Proteins zu einer Erhöhung der miRNA-Mengen sowie der miRNA-Zielsequenzen führt. Die stabile Expression des RSS resultiert in Phänotypen, deren Stärke mit dem Grad der Expression des RSS korreliert (Mallory et al., 2002; Kasschau et al., 2003; Chapman et al., 2004; Dunoyer et al., 2004; Mlotshwa et al., 2005; Wu et al., 2010).

Diese Ergebnisse deuten auf eine Stabilisierung der miRNA-Doppelstränge hin, die nicht mehr in den RISC eingebaut werden und dadurch die Entwicklung der Pflanzen durch eine fehlende bzw. störende Regulation beeinflussen und dies zu Symptomen in Folge der Virusinfektion bzw. durch die Anwesenheit des RSS führt (Kasschau et al., 2003; Palatnik et al., 2003).

Auch in ZYMV^{FRNK}- und ZYMV-AG^{FINK}-infizierten Kürbispflanzen konnte ein Unterschied der miRNA-Mengen festgestellt werden, wobei die miR*-Mengen der ZYMV-AG^{FINK} dem Niveau von nicht-infizierten Pflanzen entsprachen (Shiboleth et al., 2007).

In dieser Arbeit sollte ein Zusammenhang zwischen der Struktur der miRNA-Doppelstränge auf die Bindekapazität der HC-Pro-Proteine sowie ein Einfluss des Aminosäureaustauschs der HC-Pro^{FINK} in einem Virus-freien System analysiert werden.

Durch die Anwesenheit der HC-Pro könnte der miRNA-Doppelstrang stabilisiert und der Einbau des miR-Stranges in den Effektor-Komplex verhindert werden, was eine Stabilisierung des miR*-Stranges zur Folge hätte.

In Folge des Aminosäureaustauschs der HC-Pro^{FINK} konnten teilweise verminderte Mengen an miR*-Strängen in Virus-infizierten Wirtspflanzen nachgewiesen werden (Shiboleth et al., 2007). Diesen Unterschied würde man auch in den mit HC-Pro^{FINK} infizierten Pflanzen im Vergleich zu den mit HC-Pro^{FRNK} infizierten Pflanzen erwarten.

Die Ergebnisse der miRNA-Northern Blot-Analysen in dieser Arbeit zeigen jedoch keinen signifikanten Unterschied der Mengen an untersuchten miR-Strängen in den mit HC-Pro^{FRNK}- und HC-Pro^{FINK}-infiltrierten Blattbereichen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.3 A).

Von den untersuchten miR*-Strängen konnten insgesamt nur zwei (miR166c* & miR396a*) in den sRNA-Northern Blot-Analysen nachgewiesen werden, wobei ein Unterschied der miR396a*-Signale zwischen den Kontrollpflanzen und den mit den RSS infiltrierten Pflanzen auftrat – zwischen den beiden RSS wurde jedoch kein Unterschied festgestellt (Abb. 3.3 B). Der Nachweis der miR166c* und miR396a*-Stränge könnte durch die Stabilisierung der miRNA durch die HC-Pro-Proteine erklärt werden.

Eine ZYMV-Infektion von Wirtspflanzen führt größtenteils zu einer Akkumulation des miR-Strangs und des korrespondierenden miR*-Strangs (Shiboleth et al., 2007). Die Ergebnisse der miRNA-Akkumulation der Northern Blot-Analysen weichen von den Untersuchungen in Virus-infizierten Wirtspflanzen ab. Ein Grund dafür könnte die Verwendung von unterschiedlichen Pflanzen darstellen, die eine Divergenz der miRNA-Mengen aufweisen (Ehrenreich & Purugganan, 2008). Darüber hinaus könnte durch eine Virusinfektion eine höhere Expression der HC-Pro-Proteine im Vergleich zu einem transienten System stattfinden; dies würde zu abweichenden Ergebnissen der miRNA-Akkumulation führen (Wagner et al., 2004).

Eine weitere Überlegung ist der Einfluss des P1-Proteins auf die Aktivität der HC-Pro. Es wurde bereits beschrieben, dass das P1-Protein in vivo einen verstärkenden Effekt auf die HC-Pro ausübt, wenn beide Proteine als Polyprotein exprimiert und durch die Proteaseaktivität von P1 in zwei reife Proteine überführt werden (Pruss et al., 1997; Rajamaki et al., 2005; Valli et al., 2006).

Dies könnte den starken Effekt der P1/HC-Pro-Proteine auf die miRNA-Anhäufung in den transgenen Pflanzen bzw. in den Virus-infizierten Pflanzen erklären, da zum einen das P1-Protein als verstärkender Faktor vorhanden ist und zum anderen das P1/HC-Pro als Polyprotein vorliegt und durch die P1-Aktivität die reifen Proteine prozessiert werden. Es ist möglich, dass das P1-Protein in diesen Systemen den Effekt der HC-Pro verstärkt und zu erhöhten miRNA-Mengen führt.

Es ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Infiltrationsstudien mit den HC-Pro-Proteinen und durch das Fehlen des P1-Proteins eine effiziente Stabilisierung des miR*-Stranges nicht erzielt werden könnte, da der Effekt des HC-Pro-Proteins allein nicht ausreichend ist, eine Änderung herbeizuführen.

Das Verhalten der HC-Pro^{FRNK}- und HC-Pro^{FINK}-Proteine bei der sRNA-Bindung wurde durch in vitro Gelshift-Analysen untersucht.

4.3 Die Punktmutation in HC-Pro^{FINK} führt zu einem vollständigen Verlust der in vitro Bindekapazität

Eine generelle Strategie der RSS ist die direkte Bindung von sRNA-Molekülen, um diese für den RISC unzugänglich zu machen. Diese Aktivität wurde bereits für die TEV HC-Pro mit Hilfe von in vitro Bindungsstudien nachgewiesen (Lakatos et al., 2006; Shibolet et al., 2007).

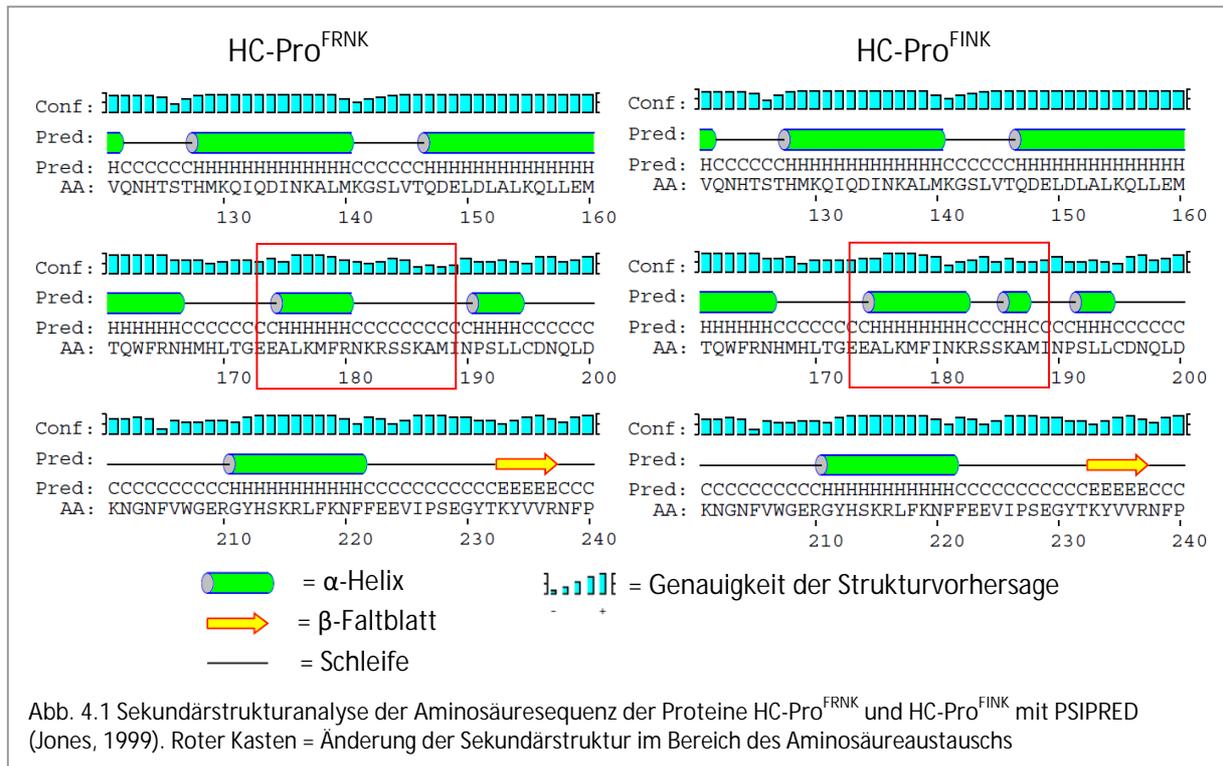
Zur Charakterisierung der Bindekapazität der HC-Pro^{FRNK}- und HC-Pro^{FINK}-Proteine aus ZYMV wurden diese rekombinant in *N. benthamiana*-Pflanzen hergestellt, über einen N-terminalen HA-Tag gereinigt und im Anschluss die in vitro Bindekapazität von synthetischen sRNA-Doppelsträngen analysiert.

Aufgrund der in vivo Ergebnisse könnte man erwarten, dass die HC-Pro^{FRNK} im Gegensatz zur HC-Pro^{FINK} sowohl siRNAs als auch miRNAs bindet und diese dadurch vor dem Abbau schützt.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass es zu einer starken Bindung des 21 bp siRNA-Doppelstrangs durch die HC-Pro^{FRNK} kommt, die Mutation in der HC-Pro^{FINK} jedoch zum Verlust der Bindungskapazität führt (Abb. 3.4).

Neuere Studien zeigen, dass die FRNK-Box nur ein Teil eines größeren konservierten Motivs FRNK(X)₁₂CDNQLD innerhalb der Potyviren darstellt, das bei der Symptomentwicklung und bei der Blockierung des RNA Silencing involviert ist (Desbiez et al., 2010).

Die Sekundärstrukturanalysen der Aminosäuresequenzen beider HC-Pro-Proteine aus ZYMV zeigen, dass der Aminosäureaustausch an Position 180 eine Veränderung der Sekundärstruktur des HC-Pro^{FINK}-Proteins bewirkt. Der Austausch von Arg-180 zu Ile-180 führt zur Ausbildung einer zusätzlichen α -Helix im Bereich der AS 174-194 und diese Konformationsänderung könnte einen Einfluss auf die Bindekapazität haben (Abb. 4.1).



Viele RNA-bindende Proteine besitzen eine Arginin-reiche Domäne, die für die RNA-Bindung ausschlaggebend ist, da die positiv-geladenen Seitenketten des Arginins mit dem Phosphat-Gerüst der RNA in Wechselwirkung treten (Burd & Dreyfuss, 1994). Dies wäre eine weitere Möglichkeit den Verlust der Bindung der HC-Pro^{FINK} zu erklären, da die positiv-geladene Seitenkette des Arg nicht mehr vorhanden ist.

In dieser Arbeit sollte die *in vitro* Bindung von unterschiedlichen miRNA-Doppelsträngen untersucht werden, da diese eine Funktion bei der pflanzlichen Entwicklung besitzen und in Folge der Störung des miRNA-Mechanismus durch die HC-Pro einen Einfluss auf die Symptomentwicklung auftreten könnte.

Bei den *in vivo* Versuchen wurden keine eindeutigen Daten über die Bindung von miRNAs durch die HC-Pro erzielt, aus diesem Grund wurden *in vitro* Gelshift-Analysen durchgeführt, um unterschiedliche miRNA-Doppelstränge zu analysieren.

Es besteht die Möglichkeit, dass die Anzahl und Lage der Basenfehlpaarungen sowie die variierende Länge der miRNAs die Bindekapazität der HC-Pro stark beeinflussen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die HC-Pro^{FINK}-Mutante neben den siRNA-Doppelsträngen auch keine miRNA-Doppelstränge bindet. Die HC-Pro^{FRNK} bindet dagegen beide untersuchten miRNAs mit unterschiedlicher Anzahl an Basenfehlpaarungen (Abb. 3.5).

Ein Vergleich der Mengen an nicht gebundenen siRNA- (Abb. 3.4) und miRNA-Doppelsträngen (Abb. 3.5 B) zeigt einen deutlichen Unterschied in der Bindekapazität der unterschiedlichen sRNA-Moleküle durch die HC-Pro^{FRNK} bei der Verwendung des Gesamtproteinextrakts. Diese Störung der HC-Pro-miRNA-Interaktionen könnte in Folge der Basenfehlpaarungen in den miRNA-Doppelsträngen hervorgerufen werden.

Ergänzende Gelshift-Analysen mit synthetischen hsa-miRNA-Doppelsträngen zeigen, dass miRNAs aus unterschiedlichen Organismen durch die HC-Pro^{FRNK} gebunden werden (Abb. 3.6). Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen der miRNA-Struktur bzw. -Länge und der Bindekapazität festgestellt werden, auch die Lage der Basenfehlpaarungen innerhalb des Doppelstranges scheint keinen Einfluss auf die Bindung durch die HC-Pro zu haben, vielmehr könnte hier die Sequenz der miRNAs ausschlaggebend sein oder die Stabilität des miRNA-Doppelstranges eine Rolle bei der Bindung durch die HC-Pro spielen (Khvorova et al., 2003).

Eine weitere Möglichkeit der unterschiedlichen Bindung von sRNA-Molekülen könnte durch das Vorhandensein einer flexiblen RNA-Bindedomäne im HC-Pro-Protein von ZYMV erklärt werden, wodurch ein gewisses Maß an sRNA-Strukturen toleriert wird. Ein Beispiel für den Einfluss der Flexibilität eines Proteins bei der RNA-Bindung stellt Dicer dar, dessen flexible Regionen entscheidend für die dsRNA-Bindung sind (Macrae et al., 2006).

Weitere Untersuchungen mit einer großen Anzahl an synthetischen miRNA-Doppelsträngen mit variierender Struktur sind notwendig, um genauere Aussagen über die Bindekapazität der HC-Pro treffen zu können. Daneben könnte eine Sequenz-spezifische Bindung von sRNA-Molekülen analysiert werden.

Die Fähigkeit der ZYMV HC-Pro zur Bindung von siRNAs unterschiedlicher Länge und der Bindung von miRNAs aus unterschiedlichen Organismen macht diese zu einem universellen Instrument zur Untersuchung der sRNA-Mechanismen in Pflanzen und Tieren.

4.4 Expression der ZYMV HC-Pro in Bakterien

Die Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen in *E. coli* ermöglicht eine schnelle und effiziente Methode zur Charakterisierung der entsprechenden Proteine. Durch die Herstellung von Fusionsproteinen mit spezifischen Affinitäts-Tags ist eine einfache Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins mit Hilfe von Affinitätschromatographie-Methoden möglich. Ausgehend von den benötigten Proteinmengen, der gewünschten Aufreinigungsmethode und Löslichkeit des Proteins stehen verschiedene Expressionsvektoren zur Verfügung. Man unterscheidet bei den Affinitäts-Tags zwischen kleinen Tags mit nur wenigen AS (His-Tag, HA-Tag, c-Myc-Tag, FLAG-Tag), die für eine Aufreinigung des Fusionsproteins eingesetzt werden und große Affinitäts-Tags (MBP und GST), die

die Löslichkeit des Fusionsproteins erhöhen, aber auch dessen funktionelle Eigenschaften beeinträchtigen können. Deshalb wurden in dieser Arbeit zum einen der pET28b(+)-Expressionsvektor verwendet, durch den die HC-Pro mit einem N-terminalen 6 x His-Tag exprimiert wurde und zum anderen der pMAL-c2X-Vektor, der die Expression der HC-Pro mit einem N-terminalen MBP ermöglichte.

Neben den beiden Expressionsvektoren wurden drei *E. coli*-Stämme für die Expression der Virus-spezifischen HC-Pro verwendet. Der BL21 (DE3)-Stamm ist ein Derivat von *E. coli* B, dem die beiden Proteasen Ion und OmpT fehlen. Des Weiteren besitzt dieser Stamm eine T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promoters, der durch IPTG induziert wird. Diese Anordnung wurde über das λ -Phagen-Genom (λ DE3) in das Genom des BL21-Stamms eingebracht. Der BL21 (DE3) codon plus-Stamm besitzt zusätzliche Kopien der *argU*-, *ileY*- und *leuW*-tRNA-Gene, mit deren Hilfe die Arginin-Codons AGA und AGG, das Isoleucin-Codon AUA sowie das Leucin-Codon CUA erkannt werden. Durch das Vorhandensein dieser zusätzlichen tRNA-Gene können die Schwierigkeiten bzw. Fehler der Codon-Nutzung bei der Expression von Proteinen aus Organismen mit AT-reichen Genomen behoben werden. Zusätzlich wurde der ArcticExpress (DE3)-Stamm verwendet, durch den eine erhöhte Löslichkeit der Proteine erzielt werden sollte. Dieser Stamm besitzt die beiden Chaperone Cpn10 und Cpn60 aus *Oleispira antarctica*, die eine korrekte Faltung der rekombinanten Proteine auch bei niedrigen Temperaturen ermöglicht.

Die Expression der His-HC-Pro^{FRNK} mit dem pET28b(+)-Expressionsvektor erfolgte in allen drei getesteten *E. coli*-Stämmen bei 37°C sowie bei 14°C. Dies resultierte in den BL21 (DE3)- und BL21 (DE3) codon plus-Stämmen überwiegend in der Bildung der unlöslichen Form der HC-Pro (Abb. 3.7 A). Die Bildung von unlöslichen Aggregaten (inclusion bodies) kann auf eine fehlerhafte Faltung oder falsche physiologische Bedingungen (Osmolarität, pH-Wert, Temperatur) zurückgeführt werden (Markossian & Kurganov, 2004).

In dem ArcticExpress (DE3)-Stamm wurde allerdings bei 37°C ein großer Anteil an löslichem HC-Pro-Protein nachgewiesen. Nach der Aufreinigung des Proteins über den N-terminalen 6x His-Tag mit Hilfe der Ni-NTA-Agarose konnte das Protein durch 250 mM Imidazol von der Matrix isoliert werden (Abb. 3.7 B).

In den durchgeführten Gelshift-Analysen mit 21 bp siRNA-Doppelsträngen konnte jedoch keine Bindung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Ein Grund dafür könnte sein, dass zum einen die gereinigten Proteinmengen für die Bindung nicht ausreichend sind und zum anderen die Aktivität der HC-Pro in Folge einer inkorrekten Faltung verloren ging oder die Aktivität durch das Vorhandensein des Imidazols im Elutionspuffer blockiert wurde.

Die Expression der HC-Pro mit einem N-terminalen MBP-Fusionsprotein wurde bereits für die PVY HC-Pro beschrieben (Maia & Bernardi, 1996) und erfolgte für die MBP-HC-Pro^{FRNK}- und MBP-HA-HC-Pro^{FINK}-Proteine bei 14°C über Nacht in BL21 (DE3) codon plus-Zellen. Dies führte teilweise zu löslichen Fusionsproteinen mit einem MW von 99 kDa. Darüber hinaus konnten zusätzliche Signale mit einem MW zwischen 55 und 72 kDa im Western Blot mit dem Anti-HA Antikörper detektiert werden. Diese stellen Abbauprodukte der HC-Pro dar, die in Folge der Aktivität von bakteriellen Proteasen entstanden sein könnten (Abb. 3.8).

Die Expression der MBP-HA-HC-Pro-Fusionsproteine unter diesen Bedingungen ermöglichte eine schnelle und einfache Methode zur Gewinnung von ausreichenden Mengen des rekombinanten Proteins für die in vitro Bindungsstudien. Diese Parameter konnten auch für die Expression der MBP-HA-HC-Pro-GFP-Proteine und den entsprechenden Mutanten verwendet werden.

Die Aufreinigung der MBP-HA-HC-Pro-Fusionsproteine erfolgte über Amylose-gekoppelte Magnetpartikel und anschließender Elution. Zur Kontrolle wurde der pMAL.c2X-Vektor verwendet, der keine zusätzliche Protein kodierende Sequenz besaß und mit dem man unter den gleichen Expressionsbedingungen ein MBP erhielt. Dies wurde zur Kontrolle für die nachfolgenden Studien eingesetzt. Nach der Aufreinigung über das N-terminale MBP-Fusionsprotein konnten die rekombinanten Proteine rein dargestellt werden.

4.5 Charakterisierung der sRNA-Bindekapazität der rekombinanten MBP-HA-HC-Pro-Proteine aus Bakterien

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Bindekapazität der ZYMV HC-Pro^{FRNK} und HC-Pro^{FINK} für sRNAs zu untersuchen, um den Einfluss der Punktmutation in der HC-Pro^{FINK}-Mutante auf den miRNA-Mechanismus sowie die RSS-Aktivität zu analysieren.

Die in vitro Bindungsstudien mit der in einem transienten System exprimierten HC-Pro aus *N. benthamiana* zeigen, dass die Punktmutation zu einem vollständigen Verlust der Bindekapazität führt.

Um diese Daten zu bestätigen, sollte die Aktivität der rekombinanten MBP-HA-HC-Pro-Proteine nach der Expression in Bakterien und anschließender Reinigung analysiert werden. Dazu wurden diese für in vitro Bindungsstudien mit unterschiedlichen synthetischen sRNA-Doppelsträngen verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die bakteriell exprimierte HC-Pro in aktiver Form vorliegt und 21 bp siRNA-Doppelstränge bindet. Eine unspezifische Bindung der sRNA in Folge der Fusion mit dem MBP konnte durch die Verwendung des gereinigten MBP ausgeschlossen werden. Des Weiteren konnte keine sRNA-Bindung durch das MBP-HA-HC-Pro^{FINK}-Fusionsprotein nachgewiesen werden, was auf einen vollständigen Verlust der Bindekapazität hindeutet (Abb. 3.10).

Zusätzliche Untersuchungen zeigen, dass die MBP-HA-HC-Pro^{FRNK} sowohl siRNAs mit unterschiedlicher Länge als auch miRNA-Doppelstränge bindet. Dabei ist eine Präferenz für 21 bp siRNA-Doppelstränge erkennbar, wenn man die nicht gebundenen siRNAs miteinander vergleicht (Abb. 3.11 A). Ein Grund für die unterschiedliche Bindung von sRNAs könnte deren Länge sowie die Anzahl bzw. Lage von Basenfehlpaarungen innerhalb der miRNAs sein.

Eine Analyse vergleichbarer Mengen der ZYMV HC-Pro und des rekombinanten p19-Proteins aus CIRV (NEB) führte zu einer nahezu vollständigen Bindung der getesteten sRNA-Doppelstränge durch das p19-Protein (Abb. 3.11 B). Das natürlich vorkommende p19-Protein hat eine hohe Spezifität für die Bindung von 21 bp sRNAs. Das rekombinante p19-Protein (NEB) zeigt hingegen eine deutlich geringere Spezifität in Bezug auf die Länge der sRNAs. Diese unspezifische Bindung von sRNAs könnte durch das Vorhandensein des Fusionsproteins erklärt werden, durch welches sich das rekombinante von dem nativen p19-Protein unterscheidet (Molnar A: persönliche Mitteilung. Universität Cambridge, UK, 2009).

Die Bindung von hsa-miRNAs durch die MBP-HA-HC-Pro^{FRNK} im Vergleich zu dem CIRV p19 Protein zeigt keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3.12). Die hsa-miRNA-Strukturen wurden so gewählt, dass diese eine variierende Anzahl an Basenfehlpaarungen besaßen.

Beide Proteine haben eine vergleichbare Bindekapazität für die miRNA-Doppelstränge. Ein Zusammenhang zwischen der Struktur der getesteten miRNAs und der Bindekapazität konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Lage und Anzahl der Basenfehlpaarungen möglicherweise keinen Einfluss auf die Bindung haben, sondern eher eine Sequenz-spezifische Bindung erfolgt.

Zusätzliche Gelshift-Konkurrenz-Analysen mit nicht-markierten siRNAs könnten Aufschluss darüber geben, ob die miRNAs durch die siRNAs verdrängt werden und dadurch deren Bindung weiter reduziert wird.

Die Analysen der N- bzw. C-terminal verkürzten MBP-HA-HC-Pro^{FRNK}-Proteine ergaben, dass diese die Fähigkeit zur Bindung von 21 bp siRNA-Doppelsträngen vollständig verloren zu haben schienen (Abb. 3.13). Dies lässt vermuten, dass beide Bereiche der HC-Pro für die RNA-Bindung essentiell sind. Die beiden RNA-Bindedomänen der HC-Pro befinden sich allerdings in der zentralen Domäne, es ist aber dennoch vorstellbar, dass benachbarte Bereiche für eine korrekte Faltung des Proteins und für die RNA-Bindung benötigt werden.

Die Gelshift-Analysen zeigen, dass der Aminosäureaustausch von Arg zu Ile in der HC-Pro^{FINK}-Mutante zum Verlust der *in vitro* Bindung von sRNA-Doppelsträngen führt.

Da die RSS-Aktivität weiterhin vorhanden ist, kann man davon ausgehen, dass die HC-Pro einen weiteren Mechanismus besitzt, um den pflanzlichen Abwehrmechanismus zu umgehen und das PTGS

bzw. VIGS zu blockieren. Eine Vielzahl an RSS-Proteinen interagieren mit unterschiedlichen Komponenten des RNA Silencing-Mechanismus, um diesen zu blockieren (Alvarado & Scholthof, 2009).

In vivo wurden für die TEV HC-Pro mindestens zwei RSS-Funktionen nachgewiesen. Eine von ihnen scheint die Methylierung von sRNA-Molekülen durch HEN1 zu beeinflussen (Lozsa et al., 2008). Die mögliche Inaktivierung von HEN1 durch HC-Pro könnte eine Erklärung dafür sein, dass die HC-Pro^{FINK}-Mutante weiterhin als RSS aktiv ist, obwohl diese die Fähigkeit verloren hat, sRNA-Moleküle zu binden. Die HC-Pro ist im Zytoplasma lokalisiert (Mlotshwa et al., 2002); HEN1 lokalisiert sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma (Fang & Spector, 2007). Da die HC-Pro die Methylierung der miRNAs im Nukleus durch die RNA-Methyltransferase HEN1 nicht unterbinden kann, werden diese weiterhin modifiziert und nach dem Export durch HST in das Zytoplasma von AGO1 gebunden. Die HC-Pro^{FINK} ist jedoch in der Lage, die miRNA-Doppelstränge im Zytoplasma zu binden und hält diese in einem inaktiven Zustand. Die Bildung des RISC wäre dadurch blockiert und auf Grund der fehlenden Steuerung der Entwicklungsprozesse in der Pflanze würde dies zur Symptomentwicklung in der Pflanze führen.

Durch den Verlust der sRNA-Bindekapazität der HC-Pro^{FINK}-Mutante erfolgt eine normale Entwicklung der Pflanze ohne Symptomentwicklung. Beide Proteine würden weiterhin als RSS aktiv sein, da diese die Methylierung der siRNAs durch HEN1 im Zytoplasma verhindern. Durch die fehlende Methylierung der siRNAs würden diese instabil und könnten in Folge dessen nicht mehr die Sequenz-spezifische Spaltung der RNA-Zielsequenzen durch den RISC vermitteln und das RNA Silencing wäre dadurch blockiert (Abb. 4.2).

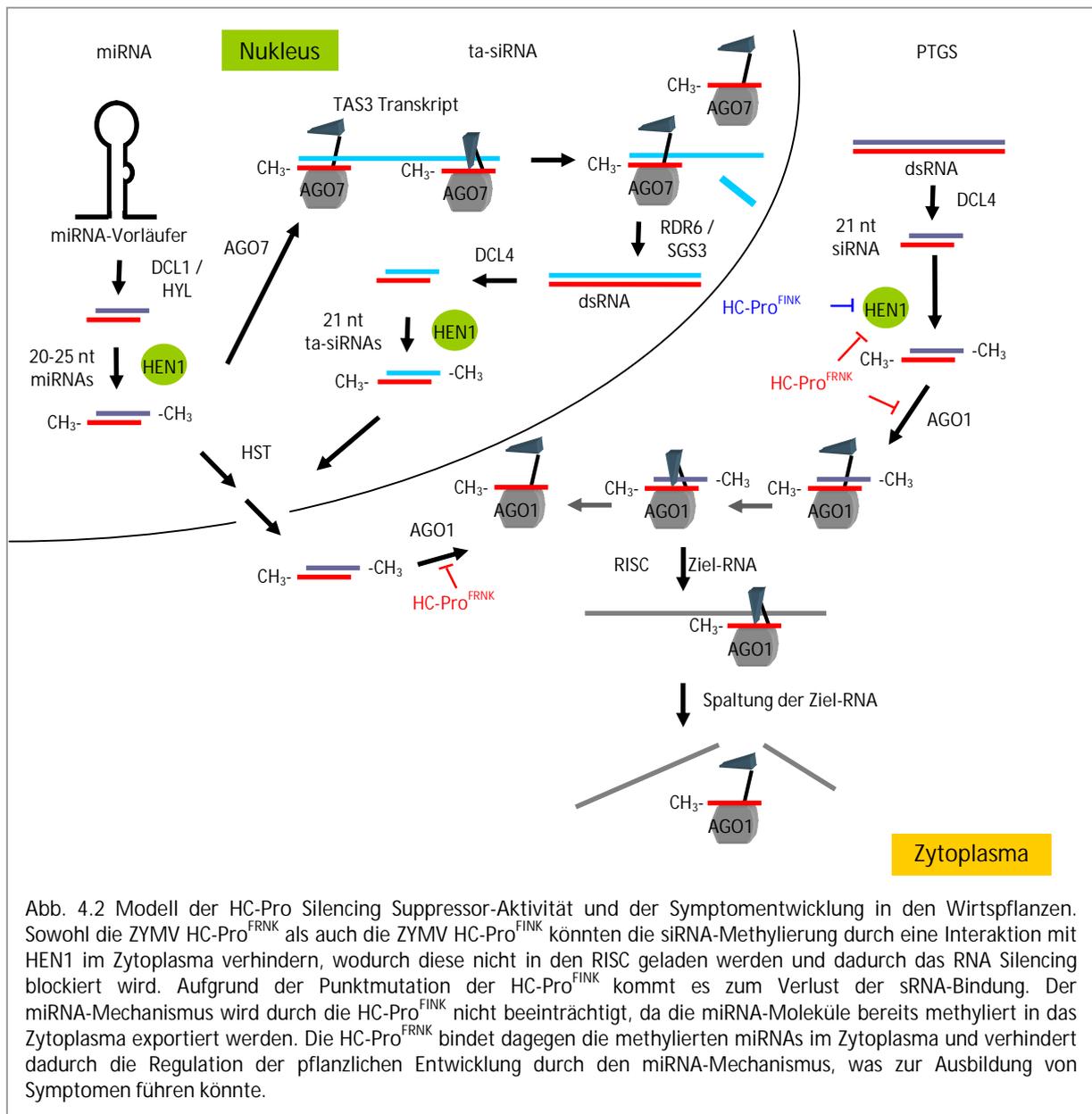


Abb. 4.2 Modell der HC-Pro Silencing Suppressor-Aktivität und der Symptomentwicklung in den Wirtspflanzen. Sowohl die ZYMV HC-Pro^{FRNK} als auch die ZYMV HC-Pro^{FINK} könnten die siRNA-Methylierung durch eine Interaktion mit HEN1 im Zytoplasma verhindern, wodurch diese nicht in den RISC geladen werden und dadurch das RNA Silencing blockiert wird. Aufgrund der Punktmutation der HC-Pro^{FINK} kommt es zum Verlust der sRNA-Bindung. Der miRNA-Mechanismus wird durch die HC-Pro^{FINK} nicht beeinträchtigt, da die miRNA-Moleküle bereits methyliert in das Zytoplasma exportiert werden. Die HC-Pro^{FRNK} bindet dagegen die methylierten miRNAs im Zytoplasma und verhindert dadurch die Regulation der pflanzlichen Entwicklung durch den miRNA-Mechanismus, was zur Ausbildung von Symptomen führen könnte.

4.6 Identifizierung eines pflanzlichen Proteins zur Erhöhung der in vitro Bindekapazität von HC-Pro

In vitro Bindungsstudien mit HC-Pro aus TEV zeigen, dass es zu einer verstärkten Bindung der sRNA-Moleküle nach Zugabe eines *A. thaliana*-Proteinextrakts kommt (Silhavy & Burgyan, 2004; Lakatos et al., 2006). Dieser Effekt deutet darauf hin, dass ein pflanzlicher Faktor die Bindung von sRNA-Molekülen durch die HC-Pro entweder durch eine direkte Interaktion oder als Kofaktor verstärkt.

Die Ergebnisse der in vitro Versuche dieser Arbeit zeigen, dass die Bindung von sRNA-Doppelsträngen durch die HA-Tag gereinigte ZYMV HC-Pro^{FRNK} nach der Zugabe eines *A. thaliana*-Proteinextrakts

verstärkt wurde. Diese verstärkte Bindung blieb auch nach einer Chloroform-Extraktion erhalten (Abb. 3.14).

Auch die Analyse der konzentrationsabhängigen Bindung durch das rekombinante MBP-HC-Pro-Fusionsprotein zeigte eine Verstärkung, dabei entsprach die Bindekapazität von 800 ng des Proteins ohne Extrakt in etwa 200 ng des Proteins nach der Zugabe des Extrakts (Abb. 3.15 A).

Die Verwendung von Proteinextrakten aus unterschiedlichen Pflanzen sollte Aufschluss darüber geben, ob dieser Faktor auch in anderen Pflanzen vorhanden ist. Neben dem Extrakt aus *A. thaliana* wurde auch nach der Zugabe eines *N. benthamiana*-Extrakts eine Verstärkung der *in vitro* Bindung erzielt. Die Zugabe eines Zucchini- bzw. *N. tabacum*-Extrakts hat jedoch keinen Effekt auf die Bindung von 21 bp siRNA-Doppelsträngen (Abb. 3.15 B).

Demnach ist dieser Faktor entweder in Zucchini- und *N. tabacum*-Pflanzen nicht vorhanden oder die Interaktion mit der HC-Pro aus unbekanntem Gründen gestört.

Zur Identifizierung des unbekanntem Faktors wurde eine Gelfiltrationschromatographie des *A. thaliana*-Proteinextrakts durchgeführt, die es ermöglichte die Proteine nach deren Größe aufzutrennen und anschließend die einzelnen Fraktionen in den *in vitro* Bindungsstudien zu verwenden. Das erhaltene Chromatogramm gab Aufschluss über den chromatographischen Trennprozess und die Zuordnung der Fraktionen zu den entsprechenden Peaks, die anschließend vereint und mit Hilfe einer Dialyse konzentriert wurden (Abb. 3.16).

Die Verwendung der erzielten Fraktionen in den Gelshift-Analysen zeigte eine Verstärkung der Bindung der eingesetzten 21 bp siRNA-Doppelstränge durch das MBP-HA-HC-Pro-Fusionsprotein für die Fraktionen #7-10. Nach Zugabe der Fraktionen #1, 2, 5 und 6 wurde eine Abnahme der Bindekapazität beobachtet, was auf die Anwesenheit von pflanzlichen Proteasen in den Fraktionen hindeutet. Eine Verstärkung der Bindung konnte auch für die Fraktionen # 3 und 4 nachgewiesen werden, die durch die Bildung von Dimeren des entsprechenden Proteins, die sich unter nativen Bedingungen in einer anderen Fraktion befinden, erklärt werden könnte (Abb. 3.17 A).

Ein konzentrationsabhängiger Effekt nach der Zugabe unterschiedlicher Mengen der entsprechenden Fraktionen #7 und 8 konnte im Bereich der gewählten Verdünnungsreihe nicht beobachtet werden (Abb. 3.17 B).

Interessanterweise zeigen die *N. benthamiana*-Extrakte (Fraktion <10 kDa) ebenfalls einen verstärkenden Effekt. Durch die Zugabe der *N. benthamiana* < 10 kDa Fraktion konnte die Menge des MBP-HA-HC-Pro-Proteins um die Hälfte verringert werden, um eine vergleichbare Bindungseffizienz zu erzielen (Abb. 3.17 C).

Nach der elektrophoretischen Auftrennung und anschließender Silberfärbung der *A. thaliana* Fraktionen #7 sowie der *N. benthamiana* < 10 kDa Fraktion wurde eine gemeinsame Bande bei ~ 15 kDa detektiert.

Die Bande der *A. thaliana*-Fraktion #7 wurde für eine MS-Analyse isoliert (Abb. 3.17 D).

Die Ergebnisse der MS-Analyse zeigten, dass zwei Proteine aus *A. thaliana* eine hohe Übereinstimmung mit den ermittelten Peptidsequenzen des isolierten Fragments besitzen (Abb. 3.18).

Das erste Protein, dessen Funktion in der Pflanze bislang unbekannt ist, besitzt ein MW von 15 kDa. Die Sequenz enthält eine konservierte Cupin-Domäne, die für eine Vielzahl von Funktionen in Pflanzen beschrieben wurde. Dazu zählen unter anderem Germin bzw. Germin-ähnliche Proteine aus höheren Pflanzen, die Funktionen bei der abiotischen Stressantwort, der Pathogenabwehr und der Auxinantwort übernehmen (Dunwell et al., 2001).

Das zweite Protein ist ein unspezifisches Lipid Transfer Protein (LP1) aus *A. thaliana* mit einem MW von 11,8 kDa. Neben der Funktion bei dem Transport von Lipiden ist das LP 1 in der Lage, Calmodulin zu binden und darüber die durch Calmodulin-regulierten Second Messenger-Systeme zu beeinflussen (Wang et al., 2005). Eine direkte Interaktion der HC-Pro aus TEV mit einem Calmodulin-verwandten Protein rgsCaM, das ein zellulärer Suppressor des PTGS darstellt, konnte bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen werden (Anandalakshmi et al., 2000).

Zur Untersuchung des Einflusses der beiden Proteine auf die siRNA-Bindekapazität der HC-Pro in den Gelshift-Analysen wurden die kodierenden Sequenzen des LP1 und des Proteins mit der Cupin-Domäne (QP) in den bakteriellen Expressionsvektor pET32a(+) kloniert, um anschließend rekombinante Proteine in Bakterien herzustellen.

Die Expression der Proteine erfolgte in BL21 (DE3) codon plus-Zellen über Nacht bei 14°C. Unter diesen Bedingungen konnten nur ausreichende Mengen des rekombinanten QP-Proteins produziert werden (Abb. 3.19 B), wogegen das LP1-Protein jedoch nicht rekombinant hergestellt werden konnte und somit nicht für die Gelshift-Analysen zur Verfügung stand. Das LP1-Protein besitzt ein 26 AS Signalpeptid am N-Terminus, wodurch das Protein aus der Zelle sekretiert wird und in Folge dessen nicht nachgewiesen werden konnte (Kader, 1996; Wang et al., 2005).

Nach erfolgter Reinigung des QP-Proteins über den 6 x His-Tag unter Verwendung der Ni-NTA-Agarose musste die Konzentration des Imidazols aus dem Elutionspuffer verringert werden, da dies die Bindungsreaktionen inhibiert. Hierzu wurde eine Vivaspin 500-Säule verwendet, mit der ein schneller Austausch des Puffers ermöglicht wurde. Zur Kontrolle wurde ein GFP-Protein mit einem C-terminalen 6 x His-Tag verwendet, das unter den gleichen Bedingungen wie das QP-Protein gereinigt wurde.

Der Effekt der gereinigten Proteine wurde in Gelshift-Analysen mit dem MBP-HA-HC-Pro-Fusionsprotein und einem synthetischen 21 bp siRNA-Doppelstrang analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass das Trx-QP-His-Protein eine starke Erhöhung der Bindekapazität des MBP-HA-HC-Pro-Proteins im Vergleich zum GFP-His-Protein bewirkt. Der minimale verstärkende

Effekt durch das gereinigte GFP-His-Protein könnte zusätzlich abhängig von hohen Proteinkonzentrationen im Reaktionsansatz sein, wodurch das MBP-HA-HC-Pro-Protein einen höheren Anteil an siRNA-Doppelsträngen bindet. Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass der Effekt des Trx-QP-His-Proteins im Vergleich zum GFP-His-Protein unter Verwendung gleicher Proteinkonzentrationen drei Mal stärker ausfällt (Abb. 3.19 A).

Zusätzliche Versuche mit unterschiedlichen Mengen des Trx-QP-His-Proteins lieferten einen konzentrationsabhängigen Effekt (Abb. 3.19 C). Eine direkte Interaktion zwischen dem MBP-HA-HC-Pro-Protein und dem Trx-QP-His konnte ausgeschlossen werden, da die Reaktion unter nativen Bedingungen verläuft und dabei kein Supershift nachgewiesen wurde.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte eine Verstärkung der *in vitro* Bindung von 21 bp siRNA-Doppelsträngen durch die HC-Pro beobachtet werden, die durch ein *A. thaliana*-Protein mit einer Cupin-Domäne (QP) bewirkt wurde. Die genaue Funktion des Proteins und der Mechanismus zur Erhöhung der Aktivität der HC-Pro ist unbekannt. Es wurde beschrieben, dass viele Dioxygenasen eine Monocupin-Domäne besitzen und dass zu dieser Gruppe die in Eukaryoten, Bakterien und verschiedenen Pflanzenviren weit verbreiteten Fe²⁺-abhängigen Oxygenasen zählen (Aravind & Koonin, 2001). Diese Proteine sind außerdem an der Modifikation von RNA-Molekülen beteiligt und katalysieren deren oxidative Demethylierung (Dunwell et al., 2004).

Eine Möglichkeit des QP-Proteins zur Verstärkung der Bindung von siRNA-Doppelsträngen durch die HC-Pro könnte eine Funktion als Carrier für Zn²⁺ oder andere Metallionen sein. Die Gelshift-Analysen des γ b-Proteins aus barley stripe mosaic virus (BSMV) zeigen, dass die Bindung von RNA-Molekülen durch die Anwesenheit von Zn²⁺ im Reaktionsansatz verstärkt wird (Rakitina et al., 2006). Untersuchungen von unterschiedlichen Proteinen mit einer Monocupin-Domäne zeigen, dass z. B. das Auxin-Bindeprotein aus *Zea mays* ein Zn²⁺ als Kofaktor besitzt (Dunwell et al., 2004).

Es sind weitere Versuche notwendig, um die Funktion des QP-Proteins bei der siRNA-Bindung der HC-Pro zu analysieren. Durch die Erzeugung von Cupin-Mutanten in Bakterien könnte die aktive Domäne des Proteins identifiziert werden, die für dessen Funktion bei der HC-Pro siRNA-Bindung essentiell sind. Die Erzeugung von *A. thaliana* QP-Mutanten und die Verwendung des Proteinextrakts in Gelshift-Analysen könnten den Einfluss des Proteins bestätigen. Das Vorkommen dieses Faktors in unterschiedlichen Pflanzen, vor allem in der Wirtspflanze des ZYMV, könnte mit Hilfe von Northern Blot-Analysen untersucht werden.

4.7 Analyse der autoproteolytischen Aktivität der HC-Pro aus ZYMV

Die HC-Pro aus TEV besitzt eine autoproteolytische Aktivität zur Spaltung aus dem Polyprotein. Durch Deletionsanalysen und Punktmutationen der AS Cys-344 und His-418 konnte die proteolytisch aktive Domäne im C-terminalen Bereich des Proteins ermittelt werden (Oh & Carrington, 1989). Eine N-terminale Sequenzierung der Spaltprodukte ergab, dass die Spaltung durch die HC-Pro zwischen dem konservierten Gly-Gly-Peptid am Übergang der HC-Pro zum P3-Protein stattfindet. Die N-terminale Freisetzung der HC-Pro aus dem Polyprotein erfolgt dagegen durch die Aktivität des P1-Proteins (Carrington et al., 1989b).

In dieser Arbeit sollte die proteolytisch aktive Domäne der HC-Pro aus ZYMV identifiziert werden. Die Expression des MBP-HA-HC-Pro-GFP-Fusionsproteins in *E. coli* resultierte in der Spaltung des GFP vom C-Terminus der HC-Pro, das als Signal bei 28 kDa nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.21). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Protease-Aktivität der HC-Pro unabhängig von einem Wirtsfaktor oder anderen viralen Proteinen erfolgt. Die vollständige Spaltung des GFP-Proteins von der HC-Pro konnte darüber hinaus auch in Pflanzen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe von Deletionsmutanten und durch Austausch von konservierten AS im C-terminalen Bereich der HC-Pro sollte die proteolytisch aktive Domäne analysiert werden (Abb. 3.20).

Bereits 1992 konnte gezeigt werden, dass der Austausch von AS an den Positionen P4, P2, P1 am C-terminalen Ende des HC-Pro-Proteins und P1' am N-terminalen Ende des Fusionsproteins zu einer Verringerung bzw. zum vollständigen Verlust der autoproteolytischen Aktivität der TEV HC-Pro führte (Carrington & Herndon, 1992).

Ein Austausch der AS in Position P1 Gly-456 gegen ein Lys-456 in der ZYMV HC-Pro (mut C1) führte zu keiner Verringerung der autoproteolytischen Aktivität. Die Spaltung durch die HC-Pro aus ZYMV scheint daher unabhängig von der Sequenz, sondern vielmehr abhängig von der Position der Schnittstelle zu sein.

Darüber hinaus wird das Gly-Met-Dipeptid anstelle des Gly-Gly-Dipeptids im ZYMV Polyprotein als Übergang zwischen der HC-Pro und dem GFP ebenfalls als Schnittstelle erkannt, was darauf hindeutet, dass die Spaltung unabhängig vom Fusionsprotein erfolgt. Ähnliche Ergebnisse wurden in Studien mit dem P1-Protein aus RYMV und der N1a-Protease des TEV erzielt, bei der ebenfalls eine Sequenz-unabhängige Spaltung im Bereich der Schnittstelle erfolgte (Rorrer et al., 1992; Weinheimer et al., 2009).

Die Protease-Domäne der HC-Pro aus TEV wurde als eine Cystein-Protease mit den AS Cys-344 und His-417 im katalytischen Zentrum identifiziert (Oh & Carrington, 1989). Der Austausch dieser konservierten AS in ZYMV HC-Pro führte allerdings zu keiner Veränderung der Protease-Aktivität; das GFP wurde weiterhin vollständig abgespalten (Abb. 3.21).

Um den Einfluss des N-terminalen Bereichs auf die autoproteolytische Aktivität der HC-Pro aus ZYMV zu analysieren, der z. B. in Folge einer Interaktion des N-terminalen Bereichs der HC-Pro mit der Schnittstelle erfolgt, wurden die ersten 93 AS entfernt. Das N-terminal verkürzte Protein wies aber weiterhin eine unveränderte Protease-Aktivität, die in der Abspaltung des GFP resultierte, auf.

Dies zeigt, dass der N-terminale Bereich zumindest keinen signifikanten Einfluss auf die Protease-Aktivität hat.

Zur Analyse der proteolytisch aktiven Domäne der ZYMV HC-Pro wurden mehrere Deletionsmutanten untersucht, bei denen entweder der vollständige C-terminale Bereich direkt nach der RNA-Bindedomäne B (mut C7 Δ 322-456) oder kürzere Abschnitte deletiert wurden (mut C8-10). Die Ergebnisse zeigen, dass die Deletion des vollständigen C-terminalen Bereichs (mut C7) einen Verlust der autoproteolytischen Aktivität bewirkte und sich die proteolytisch aktive Domäne im C-terminalen Bereich befinden musste (Abb. 3.21). Durch die Mutationen C8 und C10 konnte der Bereich des putativen katalytischen Zentrums auf die AS 350-358 der HC-Pro aus ZYMV eingeschränkt werden.

Die Abbildung 3.20 zeigt, dass innerhalb des ermittelten Aminosäuren-Bereichs die drei AS Leu-351, Asn-353 und Glu-356 der ZYMV HC-Pro innerhalb der Vertreter der Potyviren konserviert sind. Die AS Asn ist häufig im aktiven Zentrum von Cysteinproteasen zu finden und bildet zusammen mit den AS His und Cys eine katalytische Triade, die typisch für Papain-artige Cysteinproteasen ist (Vernet et al., 1995).

Die Deletion der konservierten Aminosäuren Asn-353 (mut C12 Δ N353) oder Glu-356 (mut C11 Δ E356) führte zum Verlust der autoproteolytischen Aktivität der HC-Pro. Das GFP wurde nicht mehr abgespalten und die Gesamtlängenproteine mit einem MW von 112 kDa akkumulierten als unlösliche Aggregate (Abb. 3.21).

Die Ergebnisse zeigen, dass die HC-Pro aus ZYMV eine von der HC-Pro aus TEV abweichende Domäne für die autoproteolytische Aktivität besitzt.

Eine weitere Möglichkeit könnte die Aktivität der HC-Pro in Form eines Dimers, Tetramers bzw. Multimers darstellen. Hierbei würde eine HC-Pro-Untereinheit die Spaltung einer anderen Untereinheit katalysieren. Die Ausbildung von HC-Pro-Multimeren wurde bereits in vorherigen Studien beschrieben und zeigt, dass sich die für die Interaktion benötigte Domäne innerhalb der ~ 130 C-terminalen AS des Proteins befindet (Guo et al., 1999; Plisson et al., 2003). Weitere Studien sind erforderlich, um eine mögliche Funktion der identifizierten AS als Interaktionsdomäne zu bestätigen und eine Spaltung der HC-Pro-Untereinheiten untereinander zu überprüfen.

4.8 Spaltung der HC-Pro durch eine bakterielle Protease

Die Expression der HC-Pro aus ZYMV in Pflanzen und in Bakterien resultierte in einer Spaltung des Proteins. Aus diesem Grunde sollten die in Folge der Spaltung gebildeten Fragmente weiter untersucht und die potentielle Erkennungssequenz analysiert werden.

Zur Unterscheidung einer autoproteolytischen Aktivität und einer bakteriellen Proteaseaktivität wurde eine Mutante ohne autoproteolytische Aktivität (mut C7) in dieser Studien verwendet.

Die mit dem Anti-MBP Antikörper erzielten Signale entsprachen dem Gesamtlängenprotein mit einem MW von 112 kDa in Form von unlöslichen Aggregaten und einem Fragment mit einer Größe von ~ 64 kDa, das in der löslichen Form vorlag (Abb. 3.23 A).

Es ist anzunehmen, dass die Proteolyse des Proteins bereits während der Expression stattfindet und ein Fragment von 64 kDa gebildet wird. Dieses Fragment setzt sich aus dem MBP als Fusionsprotein und dem N-terminalen Bereich der HC-Pro zusammen, das aufgrund des MBP in der löslichen Form vorliegt.

Die Spaltung des MBP-HA-HC-Pro mut C7-GFP-His-Proteins, welches keine autoproteolytische Aktivität besitzt (vgl. Abschnitt 4.7), führt zur Bildung von zwei Fragmenten mit einer Größe von ~ 48 und 64 kDa (vgl. Abb. 3.23 C). Zur Analyse der Spaltprodukte wurde ein Western Blot mit dem Anti-His Antikörper durchgeführt. Dabei konnten keine Proteine in der löslichen Form detektiert werden. Die erhaltenen Signale in den unlöslichen Aggregaten entsprachen dem Gesamtlängenprotein und einem Fragment mit einem MW von ~ 48 kDa, wobei es sich um das C-terminale Ende des Proteins handelte (Abb. 3.23 B). Da eine autoproteolytisch-inaktive HC-Pro-Mutante verwendet wurde, deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die Spaltung durch eine bakterielle Protease erfolgte. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die HC-Pro eine weitere bisher unbekannte Proteaseaktivität besitzt.

Eine N-terminale Sequenzierung des 48 kDa-Peptids zeigt, dass die Spaltung zwischen den AS Val-145, Thr-146 und Gln-147 stattfindet (Abb. 3.23 C). Von diesen AS ist nur das Thr-146 innerhalb der Mitglieder der Potyviren konserviert. Es wurden vier Mutanten erzeugt, bei denen entweder das Thr-146 deletiert oder gegen ein Val ausgetauscht wurde und zusätzlich die flankierenden AS des Thr-146 deletiert wurden (ΔVT ; ΔTQ)(Abb. 3.22).

Der Großteil der Proteine lag in Form von unlöslichen Aggregaten vor, wobei kein Unterschied zwischen dem MBP-HA-HC-Pro mut C7-GFP-His und den Mutanten durch die im Western Blot erzielten Signalen festgestellt werden konnte. Die Mutationen scheinen keine Auswirkung auf die Spaltung der HC-Pro zu haben, da für alle analysierten Proben Signale des Gesamtlängenproteins sowie der Spaltprodukte detektiert wurden (Abb. 3.24).

Es ist davon auszugehen, dass die putative Erkennungssequenz der angenommenen bakteriellen Protease von der Schnittstelle abweicht und eine Mutation in der Schnittstelle keinen Einfluss auf die

Spaltung des Proteins hat.

Weitere Mutationen sind notwendig, um die Erkennungssequenz der bakteriellen Proteasen zu bestimmen, um dadurch ein stabiles Protein in Bakterien zu erzeugen, das anschließend in Form eines sRNA-Bindekits zur Isolation von sRNA-Molekülen aus Gesamt-RNA zum Einsatz kommen könnte.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Punktmutation der ZYMV HC-Pro^{FINK} auf die RSS-Aktivität und die miRNA-Akkumulation in *N. benthamiana*-Pflanzen untersucht. Dabei konnte eine RSS-Aktivität der HC-Pro^{FINK} nachgewiesen werden. Sowohl die HC-Pro^{FRNK} als auch die HC-Pro^{FINK} zeigten in vivo keinen Einfluss auf die Änderung der miRNA-Mengen in *N. benthamiana*-Pflanzen.

Untersuchungen der in vitro sRNA-Bindung mit rekombinanten HC-Pro-Proteinen aus Pflanzen führte zu einer Bindung von 21 bp siRNAs und miRNAs durch die HC-Pro^{FRNK}, wobei kein Einfluss zwischen der Anzahl und Lage der Basenfehlpaarungen der miRNAs und der Bindungskapazität identifiziert werden konnte. Diese Bindung ist vermutlich abhängig von der Sequenz der miRNAs. Die Mutation von HC-Pro^{FRNK} zu HC-Pro^{FINK} bewirkte dagegen den Verlust der Bindung von sRNA-Molekülen.

Die HC-Pro Proteine konnten rekombinant mit einem N-terminalen Fusionsprotein exprimiert und gereinigt werden. Die funktionelle Analyse des MBP-HA-HC-Pro^{FRNK}-Proteins wies eine längenspezifische Bindung von 21 bp siRNAs auf. Die Analyse der in vitro Bindung von unterschiedlichen miRNAs aus *A. thaliana* und Mensch durch das rekombinante HC-Pro^{FRNK}-Protein aus Bakterien zeigte keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl und Lage der Basenfehlpaarungen in den miRNAs und der Bindekapazität. Die Mutation im MBP-HA-HC-Pro^{FINK}-Protein führte zum Verlust der sRNA-Bindung. Diese Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen der Gelshift-Analysen mit den rekombinanten HC-Pro-Proteinen aus Pflanzen.

Durch die Fraktionierung eines *A. thaliana*-Proteinextrakts konnte ein nicht näher beschriebenes Protein unbekannter Funktion, welches eine Cupin-Domäne (QP) besitzt, identifiziert werden. Dies hat einen Einfluss auf die in vitro Bindung von sRNA-Molekülen durch die HC-Pro.

Eine funktionelle Analyse des Trx-QP-His-Proteins mit Hilfe von Gelshift-Analysen nach der Expression in Bakterien und Reinigung zeigte einen konzentrationsabhängigen verstärkenden Effekt der siRNA-Bindung durch das rekombinante MBP-HA-HC-Pro-Protein.

Die Zugabe eines fraktionierten *N. benthamiana*-Proteinextrakts zur in vitro Bindungsreaktion führte ebenfalls zu einer verstärkten siRNA-Bindung durch die HC-Pro; Proteinextrakte von *N. tabacum* und der ZYMV Wirtspflanze Zucchini zeigten jedoch keinen Effekt.

Die ZYMV HC-Pro besitzt eine von der TEV HC-Pro abweichende proteolytisch aktive Domäne. Durch eine rekombinante Expression des MBP-HA-HC-Pro-GFP-Fusionsproteins in Bakterien und Deletionsanalysen konnten zwei kritische Aminosäuren im C-terminalen Bereich der HC-Pro identifiziert werden. Eine Deletion der AS Asn-353 oder Glu-356 führte zum vollständigen Verlust der

autoproteolytischen Aktivität des Proteins. Ein Austausch der AS Gly-456 innerhalb der Schnittstelle sowie eine N-terminale Deletion von 93 AS der HC-Pro hatten dagegen keinen Einfluss auf die autoproteolytische Aktivität.

Mit Hilfe einer N-terminalen Sequenzierung des C-terminalen Spaltproduktes des MBP-HC-Pro mut C7-GFP, welches vermutlich in Folge einer Spaltung durch bakterielle Proteasen entsteht, sollten durch Deletionsmutanten die kritischen Aminosäuren für die Spaltung untersucht werden. Eine Deletion der konservierten AS Thr-146 von ZYMV HC-Pro sowie der flankierenden AS Val-145 bzw. Gln-147 hatte jedoch keinen Einfluss auf die Spaltung der HC-Pro. Dies deutet darauf hin, dass die Schnittstelle der Protease von deren Erkennungssequenz abweicht.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass die ZYMV HC-Pro neben der sRNA-Bindung einen weiteren Mechanismus besitzt, um die Funktion als RSS auszuüben. Weitere Analysen sind nötig, um die Interaktion mit pflanzlichen Komponenten zu identifizieren und den Einfluss auf den RNA Silencing-Mechanismus aufzuklären.

6. Literatur

- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M. & Carrington, J.C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121, 207-221.
- Alvarado, V. & Scholthof, H.B. (2009). Plant responses against invasive nucleic acids: RNA silencing and its suppression by plant viral pathogens. *Semin Cell Dev Biol* 20, 1032-1040.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H. & 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, J.M., Jr., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L. & Vance, V.B. (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 290, 142-144.
- Aravind, L. & Koonin, E.V. (2001). The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and Ipreca define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome biology* 2, RESEARCH0007.
- Axtell, M.J., Jan, C., Rajagopalan, R. & Bartel, D.P. (2006). A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell* 127, 565-577.
- Ballut, L., Drucker, M., Pugniere, M., Cambon, F., Blanc, S., Roquet, F., Candresse, T., Schmid, H.P., Nicolas, P., Gall, O.L. & Badaoui, S. (2005). HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities. *J Gen Virol* 86, 2595-2603.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-1211.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Baumberger, N. & 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.
- Baumberger, N., Tsai, C.H., Lie, M., Havecker, E. & Baulcombe, D.C. (2007). The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* 17, 1609-1614.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. & Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.
- Blanc, S., Lopez-Moya, J.J., Wang, R., Garcia-Lampasona, S., Thornbury, D.W. & Pirone, T.P. (1997). A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* 231, 141-147.
- Blanc, S., Ammar, E.D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J. & Pirone, T.P. (1998). Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J Gen Virol* 79 (Pt 12), 3119-3122.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. & Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *Embo J* 17, 170-180.
- Boonrod, K., Moser, M. & Krczal, G. (2005). Chloroform phase partitioning for purification of plant-expressed proteins. *Analytical biochemistry* 344, 150-151.
- Boonrod, K., Galetzka, D., Nagy, P.D., Conrad, U. & Krczal, G. (2004). Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance. *Nature biotechnology* 22, 856-862.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R. & Zhu, J.K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* 123, 1279-1291.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P. & Ziegler-Graff, V. (2007). The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* 17, 1615-1621.

- Bragg, J.N., Lawrence, D.M. & Jackson, A.O. (2004). The N-terminal 85 amino acids of the barley stripe mosaic virus gamma pathogenesis protein contain three zinc-binding motifs. *J Virol* 78, 7379-7391.
- Brenner, S., Johnson, M., Bridgham, J., Golda, G., Lloyd, D.H., Johnson, D., Luo, S., McCurdy, S., Foy, M., Ewan, M., Roth, R., George, D., Eletr, S., Albrecht, G., Vermaas, E., Williams, S.R., Moon, K., Burcham, T., Pallas, M., DuBridge, R.B., Kirchner, J., Fearon, K., Mao, J. & Corcoran, K. (2000). Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature biotechnology* 18, 630-634.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. & Baulcombe, D.C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Embo J* 17, 6739-6746.
- Brodersen, P. & Voinnet, O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* 22, 268-280.
- Burd, C.G. & Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science (New York, N.Y)* 265, 615-621.
- Burgyan, J. (2008). Role of silencing suppressor proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* 451, 69-79.
- Carrington, J.C. & Dougherty, W.G. (1987a). Small Nuclear Inclusion Protein Encoded by a Plant Potyvirus Genome Is a Protease. *Journal of virology* 61, 2540-2548.
- Carrington, J.C. & Dougherty, W.G. (1987b). Processing of the tobacco etch virus 49K protease requires autoproteolysis. *Virology* 160, 355-362.
- Carrington, J.C. & Herndon, K.L. (1992). Characterization of the potyviral HC-pro autoproteolytic cleavage site. *Virology* 187, 308-315.
- Carrington, J.C., Freed, D.D. & Sanders, T.C. (1989a). Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. *J Virol* 63, 4459-4463.
- Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D. & Dougherty, W.G. (1989b). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *Embo J* 8, 365-370.
- Cerutti, H. & Casas-Mollano, J.A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet* 50, 81-99.
- Chan, S.W., Henderson, I.R. & Jacobsen, S.E. (2005). Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet* 6, 351-360.
- Chapman, E.J. & Carrington, J.C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet* 8, 884-896.
- Chapman, E.J., Prokhnevsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V. & Carrington, J.C. (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 18, 1179-1186.
- Chellappan, 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.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162, 156-159.
- Chuang, C.F. & 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, 4985-4990.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M.C. & Carrington, J.C. (1995). Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *The Plant cell* 7, 549-559.
- Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T. & Burgyan, J. (2007). The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J Virol* 81, 11768-11780.

- Cuellar, W.J., Kreuze, J.F., Rajamaki, M.L., Cruzado, K.R., Untiveros, M. & Valkonen, J.P. (2009). Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 10354-10358.
- Dalakouras, A., Moser, M., Zwiebel, M., Krczal, G., Hell, R. & Wassenegger, M. (2009). A hairpin RNA construct residing in an intron efficiently triggered RNA-directed DNA methylation in tobacco. *Plant J* 60, 840-851.
- Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H. & Baulcombe, D.C. (2001). SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Embo J* 20, 2069-2078.
- de Haan, P., Gielen, J.J., Prins, M., Wijkamp, I.G., van Schepen, A., Peters, D., van Grinsven, M.Q. & Goldbach, R. (1992). Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. *Biotechnology (N Y)* 10, 1133-1137.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. & Voinnet, O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68-71.
- Desbiez, C., Girard, M. & Lecoq, H. (2010). A novel natural mutation in HC-Pro responsible for mild symptomatology of Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus) in cucurbits. *Arch Virol*.
- di Guan, C., Li, P., Riggs, P.D. & Inouye, H. (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* 67, 21-30.
- Diaz-Pendon, J.A. & Ding, S.W. (2008). Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annual review of phytopathology* 46, 303-326.
- Diaz-Pendon, J.A., Li, F., Li, W.X. & Ding, S.W. (2007). Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *The Plant cell* 19, 2053-2063.
- Ding, S.W. & Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426.
- Dolja, V.V., Herndon, K.L., Pirone, T.P. & Carrington, J.C. (1993). Spontaneous mutagenesis of a plant potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *J Virol* 67, 5968-5975.
- Du, T. & Zamore, P.D. (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132, 4645-4652.
- Duchaine, T.F., Wohlschlegel, J.A., Kennedy, S., Bei, Y., Conte, D., Jr., Pang, K., Brownell, D.R., Harding, S., Mitani, S., Ruvkun, G., Yates, J.R., 3rd & Mello, C.C. (2006). Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell* 124, 343-354.
- Dunoyer, P. & Voinnet, O. (2008). Mixing and matching: the essence of plant systemic silencing? *Trends Genet* 24, 151-154.
- Dunoyer, P., Himber, C. & Voinnet, O. (2005). DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat Genet* 37, 1356-1360.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C. & Voinnet, O. (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *The Plant cell* 16, 1235-1250.
- Dunoyer, P., Pfeffer, S., Fritsch, C., Hemmer, O., Voinnet, O. & Richards, K.E. (2002). Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J* 29, 555-567.
- Dunwell, J.M., Purvis, A. & Khuri, S. (2004). Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* 65, 7-17.
- Dunwell, J.M., Culham, A., Carter, C.E., Sosa-Aguirre, C.R. & Goodenough, P.W. (2001). Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends in biochemical sciences* 26, 740-746.
- Ehrenreich, I.M. & Purugganan, M. (2008). MicroRNAs in plants: Possible contributions to phenotypic diversity. *Plant signaling & behavior* 3, 829-830.

- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Endres, M.W., Gregory, B.D., Gao, Z., Foreman, A.W., Mlotshwa, S., Ge, X., Pruss, G.J., Ecker, J.R., Bowman, L.H. & Vance, V. (2010). Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS pathogens* 6, e1000729.
- English, J.J., Mueller, E. & Baulcombe, D.C. (1996). Suppression of Virus Accumulation in Transgenic Plants Exhibiting Silencing of Nuclear Genes. *The Plant cell* 8, 179-188.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C. & Vaucheret, H. (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11650-11654.
- Fahlgren, N., Montgomery, T.A., Howell, M.D., Allen, E., Dvorak, S.K., Alexander, A.L. & Carrington, J.C. (2006). Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in Arabidopsis. *Curr Biol* 16, 939-944.
- Fang, Y. & Spector, D.L. (2007). Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Curr Biol* 17, 818-823.
- Finnegan, E.J., Margis, R. & Waterhouse, P.M. (2003). Posttranscriptional gene silencing is not compromised in the Arabidopsis CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of Dicer-1 from Drosophila. *Curr Biol* 13, 236-240.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fukunaga, R. & Doudna, J.A. (2009). dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *Embo J* 28, 545-555.
- Gal-On, A. (2000). A Point Mutation in the FRNK Motif of the Potyvirus Helper Component-Protease Gene Alters Symptom Expression in Cucurbits and Elicits Protection Against the Severe Homologous Virus. *Phytopathology* 90, 467-473.
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A. & Raccach, B. (1991). Infectious in vitro RNA transcripts derived from cloned cDNA of the cucurbit potyvirus, zucchini yellow mosaic virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 11), 2639-2643.
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A. & Raccach, B. (1992). A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *J Gen Virol* 73 (Pt 9), 2183-2187.
- Gascioli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P. & Vaucheret, H. (2005). Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr Biol* 15, 1494-1500.
- Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D. & Sablowski, R. (2004). A link between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis. *Science* 306, 1046-1048.
- Ghazala, W., Waltermann, A., Pilot, R., Winter, S. & Varrelmann, M. (2008). Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of tobacco rattle virus. *J Gen Virol* 89, 1748-1758.
- Gitlin, L. & Andino, R. (2003). Nucleic acid-based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing. *J Virol* 77, 7159-7165.
- Glazov, E., Phillips, K., Budziszewski, G.J., Schob, H., Meins, F., Jr. & Levin, J.Z. (2003). A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in Arabidopsis. *Plant J* 35, 342-349.
- Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V. & Gafni, Y. (2008). Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 157-161.

- Granier, F., Durand-Tardif, M., Casse-Delbart, F., Lecoq, H. & Robaglia, C. (1993). Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. *J Gen Virol* 74 (Pt 12), 2737-2742.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S. & Enright, A.J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research* 36, D154-158.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A. & Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research* 34, D140-144.
- Guo, D., Merits, A. & Saarma, M. (1999). Self-association and mapping of interaction domains of helper component-proteinase of potato A potyvirus. *The Journal of general virology* 80 (Pt 5), 1127-1131.
- Guo, D., Spetz, C., Saarma, M. & Valkonen, J.P. (2003). Two potato proteins, including a novel RING finger protein (HIP1), interact with the potyviral multifunctional protein HCpro. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 405-410.
- Gustafson, A.M., Allen, E., Givan, S., Smith, D., Carrington, J.C. & Kasschau, K.D. (2005). ASRP: the Arabidopsis Small RNA Project Database. *Nucleic Acids Res* 33, D637-640.
- Gy, I., Gasciolli, V., Laressergues, D., Morel, J.B., Gombert, J., Proux, F., Proux, C., Vaucheret, H. & Mallory, A.C. (2007). Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. *The Plant cell* 19, 3451-3461.
- Haas, G., Azevedo, J., Moissiard, G., Geldreich, A., Himber, C., Bureau, M., Fukuhara, T., Keller, M. & Voinnet, O. (2008). Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *Embo J* 27, 2102-2112.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J* 21, 4671-4679.
- Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- He, L. & Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews* 5, 522-531.
- Hemmes, H., Lakatos, L., Goldbach, R., Burgyan, J. & Prins, M. (2007). The NS3 protein of Rice hoja blanca tenuivirus suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *Rna* 13, 1079-1089.
- Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J. & Jacobsen, S.E. (2006). Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat Genet* 38, 721-725.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. & Voinnet, O. (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *Embo J* 22, 4523-4533.
- Howell, M.D., Fahlgren, N., Chapman, E.J., Cumbie, J.S., Sullivan, C.M., Givan, S.A., Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. (2007). Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in Arabidopsis reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting. *The Plant cell* 19, 926-942.
- Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H. & Raccach, B. (1994). Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J Gen Virol* 75 (Pt 6), 1407-1414.
- Jin, Y., Ma, D., Dong, J., Li, D., Deng, C., Jin, J. & Wang, T. (2007a). The HC-pro protein of potato virus Y interacts with NtMinD of tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 1505-1511.
- Jin, Y., Ma, D., Dong, J., Jin, J., Li, D., Deng, C. & Wang, T. (2007b). HC-Pro protein of Potato virus Y can interact with three Arabidopsis 20S proteasome subunits in planta. *J Virol* 81, 12881-12888.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. & Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57, 19-53.

- Jones, D.T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of molecular biology* 292, 195-202.
- Kader, J.C. (1996). Lipid-Transfer Proteins in Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 47, 627-654.
- Kalantidis, K., Schumacher, H.T., Alexiadis, T. & Helm, J.M. (2008). RNA silencing movement in plants. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 100, 13-26.
- Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. (1995). Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. *Virology* 209, 268-273.
- Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95, 461-470.
- Kasschau, K.D., Cronin, S. & 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., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A. & Carrington, J.C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA uncton. *Dev Cell* 4, 205-217.
- Kasschau, K.D., Fahlgren, N., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumbie, J.S., Givan, S.A. & Carrington, J.C. (2007). Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biol* 5, e57.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Jr., Zhu, J.K., Staskawicz, B.J. & Jin, H. (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18002-18007.
- Kennerdell, J.R. & Carthew, R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017-1026.
- Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.
- Kirino, Y. & Mourelatos, Z. (2007). The mouse homolog of HEN1 is a potential methylase for Piwi-interacting RNAs. *RNA (New York, N.Y)* 13, 1397-1401.
- Kreuze, J.F., Savenkov, E.I., Cuellar, W., Li, X. & Valkonen, J.P. (2005). Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *J Virol* 79, 7227-7238.
- Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A. & Meshi, T. (2003). Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 77, 11016-11026.
- Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R. & Watanabe, Y. (2009). SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Lett* 583, 1261-1266.
- Kurihara, Y. & 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.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D. & Burgyan, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *Embo J* 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. & Burgyan, J. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *Embo J* 25, 2768-2780.
- Langenberg, W.G. & Zhang, L. (1997). Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *J Struct Biol* 118, 243-247.
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. & McCoy, J.M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 11, 187-193.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. & Kim, V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.

- Levy, A., Dafny-Yelin, M. & Tzfira, T. (2008). Attacking the defenders: plant viruses fight back. *Trends Microbiol* 16, 194-197.
- Li, C.F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I.R., Bernatavichute, Y.V., Chan, S.W., Lagrange, T., Pikaard, C.S. & Jacobsen, S.E. (2006). An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 126, 93-106.
- Li, H., Li, W.X. & 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. & Chen, X. (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 15, 1501-1507.
- Li, W.X. & Ding, S.W. (2001). Viral suppressors of RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol* 12, 150-154.
- Lindbo, J.A. & Dougherty, W.G. (1992). Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189, 725-733.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M. & Dougherty, W.G. (1993). Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *The Plant cell* 5, 1749-1759.
- Llave, C., Kasschau, K.D. & 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, 13401-13406.
- Lozsa, R., Csorba, T., Lakatos, L. & Burgyan, J. (2008). Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. *Nucleic Acids Res* 36, 4099-4107.
- Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D. & Doudna, J.A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311, 195-198.
- Maia, I.G. & Bernardi, F. (1996). Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed potato virus Y helper component-proteinase. *J Gen Virol* 77 (Pt 5), 869-877.
- Mallory, A.C. & Vaucheret, H. (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet* 38 Suppl, S31-36.
- Mallory, A.C. & Bouche, N. (2008). MicroRNA-directed regulation: to cleave or not to cleave. *Trends Plant Sci* 13, 359-367.
- Mallory, A.C., Elmayan, T. & Vaucheret, H. (2008). MicroRNA maturation and action--the expanding roles of ARGONAUTES. *Curr Opin Plant Biol* 11, 560-566.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Bartel, D., Vance, V.B. & Bowman, L.H. (2002). A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and microRNAs in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15228-15233.
- Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. & Vance, V.B. (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *The Plant cell* 13, 571-583.
- Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., Watson, J.M., Finnegan, E.J. & Waterhouse, P.M. (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett* 580, 2442-2450.
- Markossian, K.A. & Kurganov, B.I. (2004). Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggresomes. *Biochemistry (Mosc)* 69, 971-984.
- Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B. & Matzke, A.J. (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current opinion in cell biology* 21, 367-376.
- Matzke, M.A., Primig, M., Trnovsky, J. & Matzke, A.J. (1989). Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *Embo J* 8, 643-649.
- Merai, Z., Kerényi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L. & Silhavy, D. (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 80, 5747-5756.

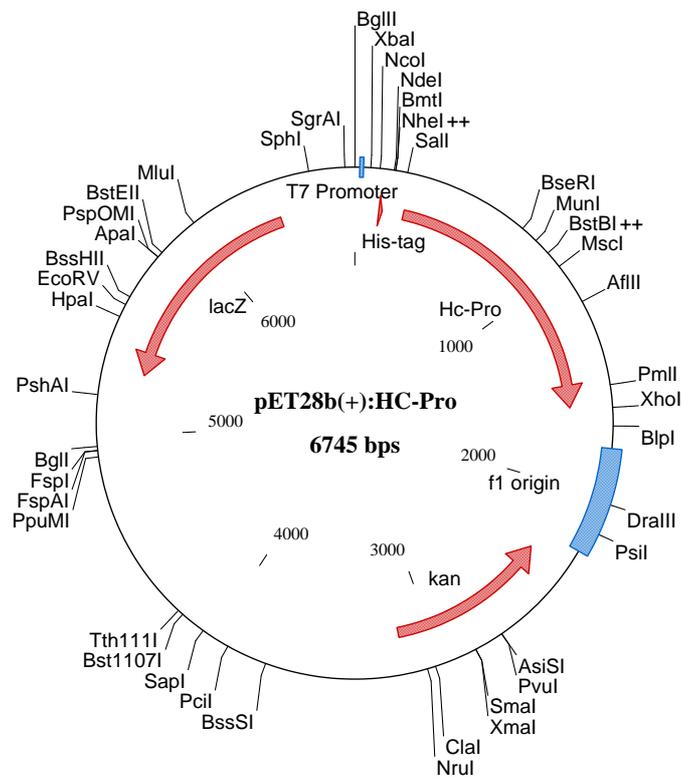
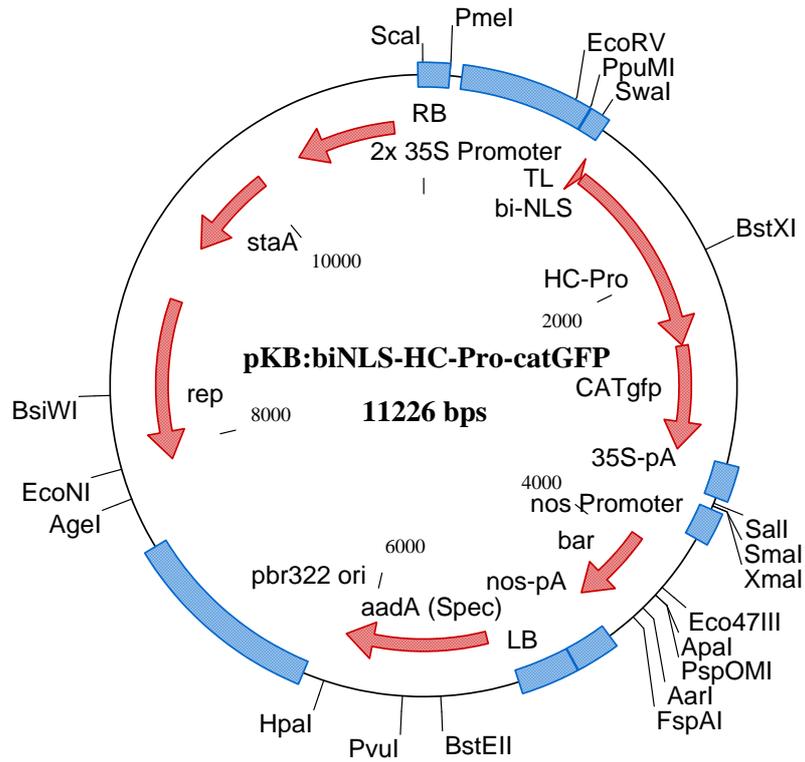
- Merai, Z., Kerenyi, Z., Molnar, A., Barta, E., Valoczi, A., Bisztray, G., Havelda, Z., Burgyan, J. & Silhavy, D. (2005). Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J Virol* 79, 7217-7226.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G.J. & Qi, Y. (2008). Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133, 116-127.
- Mlotshwa, S., Verver, J., Sithole-Niang, I., Gopinath, K., Carette, J., van Kammen, A. & Wellink, J. (2002). Subcellular location of the helper component-proteinase of Cowpea aphid-borne mosaic virus. *Virus genes* 25, 207-216.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Peragine, A., Endres, M.W., Li, J., Chen, X., Poethig, R.S., Bowman, L.H. & Vance, V. (2008). DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in Arabidopsis. *PLoS One* 3, e1755.
- Mlotshwa, S., Schauer, S.E., Smith, T.H., Mallory, A.C., Herr, J.M., Jr., Roth, B., Merchant, D.S., Ray, A., Bowman, L.H. & Vance, V.B. (2005). Ectopic DICER-LIKE1 expression in P1/HC-Pro Arabidopsis rescues phenotypic anomalies but not defects in microRNA and silencing pathways. *The Plant cell* 17, 2873-2885.
- Moissiard, G., Parizotto, E.A., Himber, C. & Voinnet, O. (2007). Transitivity in Arabidopsis can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *Rna* 13, 1268-1278.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E. & Carrington, J.C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133, 128-141.
- Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F. & Vaucheret, H. (2002). Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *The Plant cell* 14, 629-639.
- Muangsan, N., Beclin, C., Vaucheret, H. & 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 J* 38, 1004-1014.
- Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell* 2, 279-289.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K. & Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 14687-14692.
- Oh, C.S. & Carrington, J.C. (1989). Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-Pro by site-directed mutagenesis. *Virology* 173, 692-699.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. & Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425, 257-263.
- Papp, I., Mette, M.F., Aufsatz, W., Daxinger, L., Schauer, S.E., Ray, A., van der Winden, J., Matzke, M. & Matzke, A.J. (2003). Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol* 132, 1382-1390.
- Peng, Y.H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y. & Raccach, B. (1998). Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *J Gen Virol* 79 (Pt 4), 897-904.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L. & Poethig, R.S. (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev* 18, 2368-2379.
- Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K.E., Jonard, G. & Ziegler-Graff, V. (2002). PO of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 76, 6815-6824.
- Pikaard, C.S., Haag, J.R., Ream, T. & Wierzbicki, A.T. (2008). Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends in plant science* 13, 390-397.

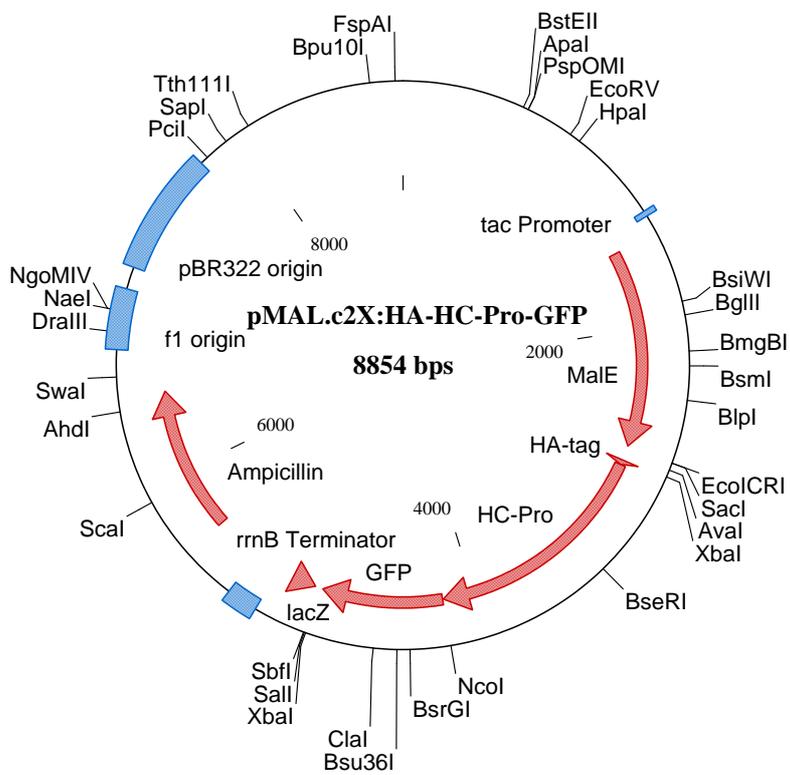
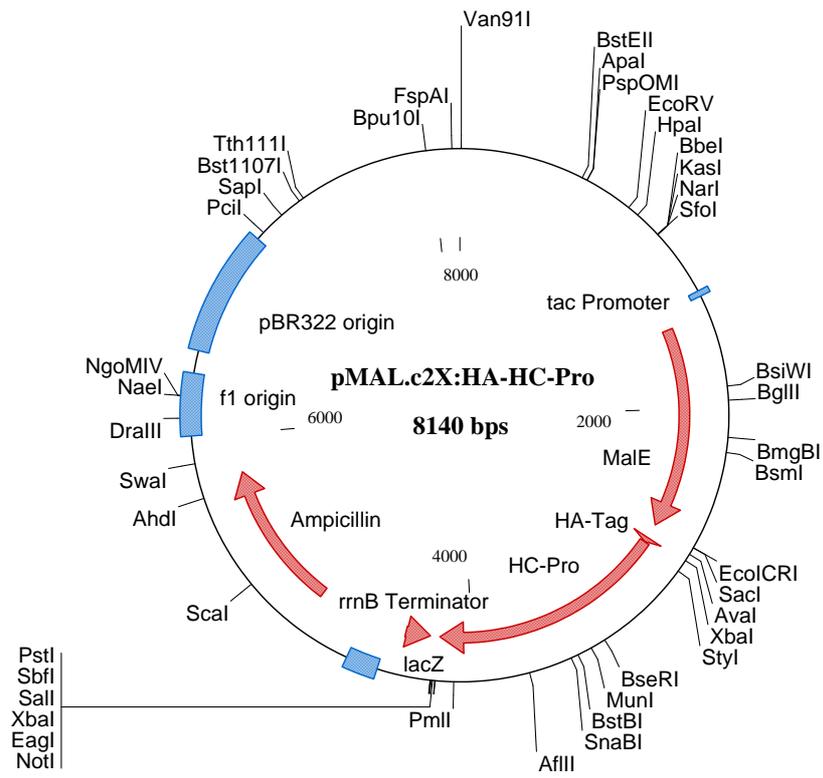
- Plisson, C., Drucker, M., Blanc, S., German-Retana, S., Le Gall, O., Thomas, D. & Bron, P. (2003). Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *J Biol Chem* 278, 23753-23761.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. & Bowman Vance, V. (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *The Plant cell* 9, 859-868.
- Qu, F., Ren, T. & Morris, T.J. (2003). The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J Virol* 77, 511-522.
- Raja, P., Sanville, B.C., Buchmann, R.C. & Bisaro, D.M. (2008). Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J Virol* 82, 8997-9007.
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J. & Bartel, D.P. (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 20, 3407-3425.
- Rajamaki, M.L., Kelloniemi, J., Alminaitte, A., Kekarainen, T., Rabenstein, F. & Valkonen, J.P. (2005). A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. *Virology* 342, 88-101.
- Rakitina, D.V., Yelina, N.E. & Kalinina, N.O. (2006). Zinc ions stimulate the cooperative RNA binding of hordeiviral gammab protein. *FEBS letters* 580, 5077-5083.
- Ratcliff, F., Harrison, B.D. & Baulcombe, D.C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276, 1558-1560.
- Reed, J.C., Kasschau, K.D., Prokhnovsky, A.I., Gopinath, K., Pogue, G.P., Carrington, J.C. & Dolja, V.V. (2003). Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellows virus. *Virology* 306, 203-209.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. & Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16, 1616-1626.
- Riechmann, J.L., Lain, S. & Garcia, J.A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *The Journal of general virology* 73 (Pt 1), 1-16.
- Riechmann, J.L., Cervera, M.T. & Garcia, J.A. (1995). Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *J Gen Virol* 76 (Pt 4), 951-956.
- Rorrer, K., Parks, T.D., Scheffler, B., Bevan, M. & Dougherty, W.G. (1992). Autocatalytic activity of the tobacco etch virus Nla proteinase in viral and foreign protein sequences. *The Journal of general virology* 73 (Pt 4), 775-783.
- Ruiz-Ferrer, V. & Voinnet, O. (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu Rev Plant Biol* 60, 485-510.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O. & Baulcombe, D.C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant cell* 10, 937-946.
- Saito, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Siomi, H. & Siomi, M.C. (2007). Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi- interacting RNAs at their 3' ends. *Genes & development* 21, 1603-1608.
- Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W. & Ray, A. (2002). DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci* 7, 487-491.
- Shi, X.M., Miller, H., Verchot, J., Carrington, J.C. & 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, 35-42.
- Shiboleth, Y.M., Haronsky, E., Leibman, D., Arazi, T., Wassenegger, M., Whitham, S.A., Gaba, V. & Gal-On, A. (2007). The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *J Virol* 81, 13135-13148.
- Silhavy, D. & Burgyan, J. (2004). Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci* 9, 76-83.
- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M. & Burgyan, J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *Embo J* 21, 3070-3080.

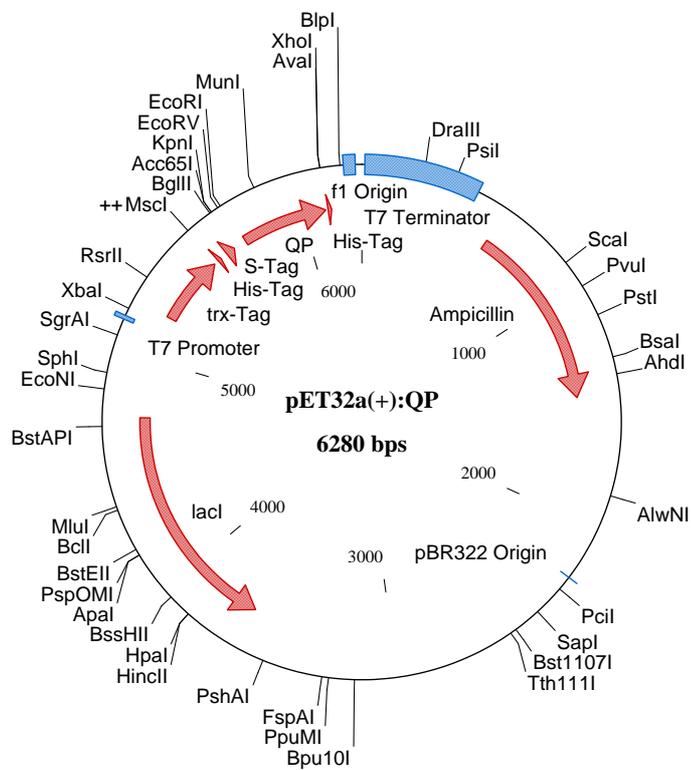
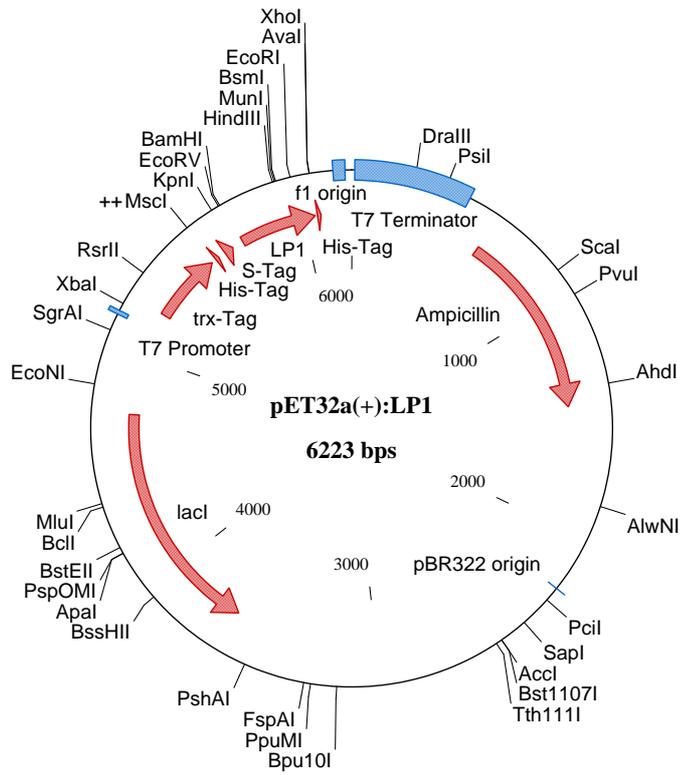
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G. & Waterhouse, P.M. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407, 319-320.
- Sunkar, R. & Zhu, J.K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant cell* 16, 2001-2019.
- Szittyá, G., Molnár, A., Silhavy, D., Hornyik, C. & Burgyan, J. (2002). Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *The Plant cell* 14, 359-372.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M. & Watanabe, Y. (2008). The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol* 49, 493-500.
- Temin, H.M. & Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213.
- Thomas, C.L., Leh, V., Lederer, C. & Maule, A.J. (2003). Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 306, 33-41.
- Thornbury, D.W., Hellmann, G.M., Rhoads, R.E. & Pirone, T.P. (1985). Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology* 144, 260-267.
- Urcuqui-Inchima, S., Maia, I.G., Arruda, P., Haenni, A.L. & Bernardi, F. (2000). Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology* 268, 104-111.
- Valli, A., Dujovny, G. & Garcia, J.A. (2008). Protease activity, self interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor p1b from cucumber vein yellowing ipomovirus. *Journal of virology* 82, 974-986.
- Valli, A., Martín-Hernández, A.M., López-Moya, J.J. & Garcia, 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. *J Virol* 80, 10055-10063.
- van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N. & Stuitje, A.R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant cell* 2, 291-299.
- van der Vlugt, R.A., Ruiters, R.K. & Goldbach, R. (1992). Evidence for sense RNA-mediated protection to PVYN in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Mol Biol* 20, 631-639.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyan, J. & Hall, T.M. (2003). Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115, 799-811.
- Vaucheret, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev* 20, 759-771.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P. & Bartel, D.P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* 18, 1187-1197.
- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A.C., Hilbert, J.L., Bartel, D.P. & Crete, P. (2004). Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Mol Cell* 16, 69-79.
- Verchot, J. & Carrington, J.C. (1995). Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J Virol* 69, 3668-3674.
- Verchot, J., Koonin, E.V. & 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.
- Vernet, T., Tessier, D.C., Chatellier, J., Plouffe, C., Lee, T.S., Thomas, D.Y., Storer, A.C. & Menard, R. (1995). Structural and functional roles of asparagine 175 in the cysteine protease papain. *The Journal of biological chemistry* 270, 16645-16652.
- Vogler, H., Akbergenov, R., Shivaprasad, P.V., Dang, V., Fasler, M., Kwon, M.O., Zhanybekova, S., Hohn, T. & Heinlein, M. (2007). Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein. *J Virol* 81, 10379-10388.

- Voinnet, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* 17, 449-459.
- Voinnet, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* 6, 206-220.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M. & Baulcombe, D.C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14147-14152.
- Voinnet, O., Lederer, C. & 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. & 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 J* 33, 949-956.
- Wagner, B., Fuchs, H., Adhami, F., Ma, Y., Scheiner, O. & Breiteneder, H. (2004). Plant virus expression systems for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*. *Methods (San Diego, Calif)* 32, 227-234.
- Wang, M.B. & Metzloff, M. (2005). RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8, 216-222.
- Wang, R.Y. & Pirone, T.P. (1999). Purification and characterization of turnip mosaic virus helper component protein. *Phytopathology* 89, 564-567.
- Wang, Y., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P. & Gal-On, A. (2002). Characterization of Synergy Between Cucumber mosaic virus and Potyviruses in Cucurbit Hosts. *Phytopathology* 92, 51-58.
- Wang, Z., Xie, W., Chi, F. & Li, C. (2005). Identification of non-specific lipid transfer protein-1 as a calmodulin-binding protein in *Arabidopsis*. *FEBS letters* 579, 1683-1687.
- Ward, C.W. & Shukla, D.D. (1991). Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology* 32, 269-296.
- Wassenegger, M. & Krczal, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci* 11, 142-151.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. & Sanger, H.L. (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76, 567-576.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W. & Wang, M.B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13959-13964.
- Weiner, M.P., Costa, G.L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. & Bauer, J.C. (1994). Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* 151, 119-123.
- Weinheimer, I., Boonrod, K., Moser, M., Zwiebel, M., Fullgrabe, M., Krczal, G. & Wassenegger, M. (2009). Analysis of an auto-proteolytic activity of rice yellow mottle virus silencing suppressor P1. *Biol Chem*.
- Wu, H.W., Lin, S.S., Chen, K.C., Yeh, S.D. & Chua, N.H. (2010). Discriminating Mutations of HC-Pro of Zucchini yellow mosaic virus with Differential Effects on Small RNA Pathways Involved in Viral Pathogenicity and Symptom Development. *Mol Plant Microbe Interact* 23, 17-28.
- Xie, Z., Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. (2003). Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol* 13, 784-789.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. & Carrington, J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2, E104.
- Xiong, R., Wu, J., Zhou, Y. & Zhou, X. (2009). Characterization and subcellular localization of an RNA silencing suppressor encoded by Rice stripe tenuivirus. *Virology* 387, 29-40.
- Yaegashi, H., Tamura, A., Isogai, M. & Yoshikawa, N. (2008). Inhibition of long-distance movement of RNA silencing signals in *Nicotiana benthamiana* by Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein. *Virology* 382, 199-206.

- Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B. & Chen, X. (2006). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic acids research* 34, 667-675.
- Yelina, N.E., Savenkov, E.I., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y. & Valkonen, J.P. (2002). Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. *J Virol* 76, 12981-12991.
- Yigit, E., Batista, P.J., Bei, Y., Pang, K.M., Chen, C.C., Tolia, N.H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M.J. & Mello, C.C. (2006). Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* 127, 747-757.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M.Y. & Poethig, R.S. (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 19, 2164-2175.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R. & Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307, 932-935.
- Yu, B., Bi, L., Zheng, B., Ji, L., Chevalier, D., Agarwal, M., Ramachandran, V., Li, W., Lagrange, T., Walker, J.C. & Chen, X. (2008). The FHA domain proteins DAWDLE in *Arabidopsis* and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10073-10078.
- Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J. & Chua, N.H. (2006). Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 20, 3255-3268.
- Zilberman, D., Cao, X. & Jacobsen, S.E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299, 716-719.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* 31, 3406-3415.







7.2 Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

μl , ml, l	Mikroliter, Milliliter, Liter
μM , mM, M	mikromolar, millimolar, molar
^{32}P	Phosphor-32
6 x His	sechsfach Histidin-Tag
A_{600}	Absorption bei 600 nm
Abb.	Abbildung
abRNA	fehlerhafte RNA (aberrant RNA)
ACLSV	apple chlorotic leaf spot virus
ACMV	african cassava mosaic virus
Ag, Ag^{2+}	Silber, Silberionen
AGO	argonaute
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
ATPase	Adenosintri-phosphatase
BaYMV	barley yellow mosaic virus
BCTV	beet curly top virus
BMYV	beet mild yellowing virus
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
BWYV	beet western yellow virus
BYV	beet yellows virus
c	Konzentration
CaCl_2	Calciumchlorid
CaMV	cauliflower mosaic virus
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CHS	Chalconsynthase
CI	cylindrical inclusion protein
CML38	calcium ion binding
CMV	cucumber mosaic virus
Co-IP	co-immunoprecipitation
CP	Hüllprotein (coat protein)
CVYV	cucumber vein yellowing virus

CymRSV	cymbidium ringspot virus
DCL	dicer-like
DCR	dicer
DDL	dawdle
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8
DMS3	defective in meristem silencing 3
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dpi	Tage nach der Infiltration (days post infiltration)
DRD1	defective in rna-directed dna methylation 1
DRM2	domains rearranged methylase 2
dsRBD	dsRNA-Bindedomäne
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
DUF283	domain of unknown function 283
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
EtBr	Ethidiumbromid
g_{av}	Zentrifugalbeschleunigung bei mittlerem Abstand von der Rotorachse
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GUS	(beta)-Glucuronidase
H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
HA-Tag	Hämagglutinin-Tag
HC-Pro	helper-component proteinase
HEN1	hua enhancer 1
HST	hasty
HYL1	hyponastic leaves 1
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR-PTGS	inverted repeat-PTGS
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid

lacZ	β-Galaktosidase
LB	luria bertani
LP1	Lipid Transfer Protein 1
MBP	Maltose-Bindeprotein
MCS	multiple cloning site
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Min.	Minute(n)
miRNA	micro RNA
mJ	Millijoule
mm, cm, cm ²	Millimeter, Zentimeter, Quadratzentimeter
MnCl ₂	Mangan-(II)-chlorid
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MS	Murashige & Skoog
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
N ₂	Stickstoff (nitrogen)
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nat-siRNA	natural-antisense siRNA
ng, µg, mg, g	Nanogramm, Mikrogramm, Milligramm, Gramm
Nla	nuclear inclusion proteinase
Nlb	nuclear inclusion polymerase
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal)
nm	Nanometer
nos	Nopalinsynthase
Npt	Neomycin Phosphotransferase
NRPD1	nuclear rna polymerase d1
nt	Nukleotide
OH-Gruppe	Hydroxyl-Gruppe
p.a.	pro analysi

P1	proteinase 1
P3	proteinase 3
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDR	pathogen-derived resistance
Pfu	Pyrococcus furiosus
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethan-sulfonsäure)
piRNA	Piwi-interacting RNA
PIWI	P-element induced wimpy testis
PK-Puffer	Proteinase K-Puffer
pmol	pikomolar
Pol	RNA Polymerase
PoLV	potatos latent virus
pri-miRNA	miRNA-Vorläufer
PSTVd	potato spindle tuber viroid
PTGS	post-transcriptional gene silencing
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVX	potato virus X
PVY	potato virus Y
QP	Cupin (RmIC-Typ)-Protein
RAV2	regulator of the ATPase of the vacuolar membrane
RdDM	RNA-directed DNA methylation
rDNA	ribosomale DNA
RDR	RNA-directed RNA polymerase
rgsCaM	regulator of gene silencing calmodulin-like protein
RHBV	rice hoja blanca virus
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RSS	RNA Silencing Suppressor
RSV	rice stripe virus

RT	Raumtemperatur
RYMV	rice yellow mottle virus
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SCF	SKP1-Cullin-F box
SDE3	silencing defective 3
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	serrate
Sek.	Sekunde(n)
SGS3	suppressor of gene silencing 3
siRNA	short-interfering RNA
SPCSV	sweet potato chlorotic stunt virus
S-PTGS	sense-PTGS
sRNA	kleine RNA-Moleküle (small RNA)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat (sodium chloride /sodium citrate)
ssDNA	einzelsträngige DNA (single-stranded DNA)
ssRNA	einzelsträngige RNA (single-stranded RNA)
Std.	Stunde(n)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
ta-siRNA	trans-acting siRNA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBSV	tomato bushy stunt virus
TCV	turnip crinkle virus
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TEV	tobacco etch virus
TGMV	tomato golden mosaic virus
TGS	transcriptional gene silencing
TMV	tobacco mosaic virus
Tris (Base)	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
Trx	Thioredoxin

TuMV	turnip mosaic virus
TYLCV	tomato yellow leaf curl virus
U	Unit(s)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume
VIGS	virus-induced gene silencing
vir-Gene	Virulenzgene
Vol.	Volumen
VPg	viral protein, genome-linked
v-siRNA	virale siRNA
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight
WEX	werner syndrome-like exonuclease
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
XRN4	Exoribonuklease 4
ZYMV	zucchini yellow mosaic virus
β -ME	β -Mercaptoethanol
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient

Nukleotide

A	Adenosin
ATP	Adenosin-Triphosphat
C	Cytidin
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
G	Guanosin
T	Thymidin
U	Uridin

Aminosäuren

Ala	Alanin	A
Arg	Arginin	R
Asn	Asparagin	N
Asp	Asparaginäure	D
Cys	Cystein	C
Gln	Glutamin	Q
Glu	Glutaminsäure	E
Gly	Glycin	G
His	Histidin	H
Ile	Isoleucin	I
Leu	Leucin	L
Lys	Lysin	K
Met	Methionin	M
Phe	Phenylalanin	F
Pro	Prolin	P
Ser	Serin	S
Thr	Threonin	T
Trp	Tryptophan	W
Tyr	Tyrosin	Y
Val	Valin	V

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Das erste RNA Silencing Modell (Lindbo et al., 1993).	2
Abb. 1.2	Vereinfachtes Modell des RNA Silencing in Pflanzen (Brodersen & Voinnet, 2006; Mallory et al., 2008).	9
Abb. 1.3	Übersicht der sRNA-Mechanismen in Pflanzen (Chapman & Carrington, 2007; Mallory & Bouche, 2008; Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009).	13
Abb. 1.4	Genom der Potyviren (Potyviridae).	19
Abb. 1.5	Eine Punktmutation in HC-Pro führt zu abgeschwächten Symptomen (Shiboleth et al., 2007).	22
Abb. 2.1	Übersicht der Migration des GeneRuler DNA-Ladder Mix in einem 1 % Agarosegel.	38
Abb. 2.2	BSA-Eichgerade.	46
Abb. 2.3	Übersicht der Migration des PageRuler™ Prestained Protein Ladder, des Magic Mark XP und des Benchmark His bei der SDS-PAGE.	49
Abb. 2.4	Schematische Übersicht des pET28b(+)-Konstrukts.	58
Abb. 2.5	Schematische Übersicht des pMAL.c2X:HA-HC-Pro Konstrukts.	59
Abb. 2.6	Schematische Übersicht des pKB:biNLS-HC-Pro-GFP Konstrukts.	60
Abb. 2.7	Schematische Übersicht des pMAL.c2X:HA-HC-Pro Konstrukts.	60
Abb. 2.8	Schematische Übersicht der Mutagenese-Konstrukte.	62
Abb. 2.9	Schematische Übersicht des pET32a(+):LP1 Konstrukts.	63
Abb. 2.10	Schematische Übersicht des pET32a(+):QP Konstrukts.	64
Abb. 3.1	RNA Silencing Suppressor-Aktivität der HC-Pro-Proteine in infiltrierten Nb-16c nach 3, 6 und 11 Tagen.	67
Abb. 3.2	Struktur von „reifen“ miRNA-Doppelsträngen aus <i>A. thaliana</i> .	69
Abb. 3.3	miRNA-Akkumulation in infiltrierten Blattbereichen von <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen (WT).	70
Abb. 3.4	In vitro Bindung von 21 bp siRNA-Doppelsträngen durch HC-Pro.	71
Abb. 3.5	Gelshift-Analyse der Bindung von synthetischen miRNA-Doppelsträngen durch HC-Pro.	72
Abb. 3.6	Gelshift-Analyse der Bindung von verschiedenen synthetischen miRNA-Doppelsträngen aus <i>Homo sapiens</i> (hsa) durch die HC-Pro.	73
Abb. 3.7	Überexpression der HC-Pro mit N-terminalen His-Tag in Bakterien.	75
Abb. 3.8	Rekombinante Expression des MBP-HA-HC-Pro-Proteins in unterschiedlichen Bakterienstämmen und Temperaturen.	76

Abb. 3.9	Expression und Aufreinigung der MBP-Fusionsproteine.	77
Abb. 3.10	Gelshift-Analyse der Bindekapazität von synthetischen sRNA-Doppelsträngen durch rekombinantes MBP-HA-HC-Pro ^{FRNK} und MBP-HA-HC-Pro ^{FINK} aus Bakterien.	78
Abb. 3.11	Gelshift-Analyse der Bindekapazität von unterschiedlichen synthetischen sRNA-Doppelsträngen durch rekombinantes MBP-HA-HC-Pro ^{FRNK} und MBP-HA-HC-Pro ^{FINK} aus Bakterien.	80
Abb. 3.12	Gelshift-Analyse der Bindung unterschiedlicher synthetischer sRNA-Doppelstränge durch rekombinantes HC-Pro aus Bakterien im Vergleich mit rekombinantem p19-Protein.	81
Abb. 3.13	Expression und Analyse der Bindung von 21 bp siRNA-Doppelstränge durch die MBP-deltaN-HC-Pro und MBP-deltaC-HC-Pro-Proteine.	82
Abb. 3.14	Bindung von 21 bp siRNAs durch gereinigtes HC-Pro aus Pflanzen nach Zugabe eines Proteinextrakts aus <i>A. thaliana</i> .	84
Abb. 3.15	Gelshift-Analyse mit unterschiedlichen Pflanzenextrakten in Bindungsstudien des MBP-HA-HC-Pro-Proteins	85
Abb. 3.16	Chromatogramm eines <i>A. thaliana</i> -Proteinextrakts nach Chloroform-Extraktion und Gelfiltrationschromatographie.	86
Abb. 3.17	Analyse der <i>A. thaliana</i> -Proteinextrakte nach Chloroform-Extraktion und Chromatographie.	88
Abb. 3.18	Ergebnisse der Mascot-Datenbankanalyse mit Aminosäuresequenzen der putativen Kandidaten mit Einfluss auf die Bindung der HC-Pro in Gelshift-Assays.	89
Abb. 3.19	Rekombinante Expression des Trx-QP-His-Proteins und anschließende Gelshift-Analyse der Bindung von 21 bp siRNA durch MBP-HA-HC-Pro.	91
Abb. 3.20	Aminosäure-Sequenzvergleich des C-terminalen Bereichs der HC-Pro-Proteine aus ZYMV, TuMV, TEV, PVY und LMV.	93
Abb. 3.21	Analyse der autproteolytischen Aktivität des rekombinanten MBP-HA-HC-Pro-Proteins aus Bakterien und der Mutanten.	96
Abb. 3.22	Aminosäure-Sequenzvergleich der HC-Pro-Proteine aus ZYMV, TuMV, TEV, PVY und LMV.	97
Abb. 3.23	Bestimmung der kritischen Aminosäuren für die Spaltung der HC-Pro durch bakterielle Proteasen.	98
Abb. 3.24	Analyse der Mutanten mit Deletion bzw. Austausch der putativen Aminosäuren für die Spaltung durch bakterielle Proteasen.	99

- Abb. 4.1 Sekundärstrukturanalyse der Aminosäuresequenz der Proteine HC-Pro^{FRNK} und HC-Pro^{FINK} mit PSIPRED (Jones, 1999). 105
- Abb. 4.2 Modell der HC-Pro Silencing Suppressor-Aktivität und der Symptomentwicklung in den Wirtspflanzen. 111

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Übersicht der kleinen RNA-Moleküle.	5
Tab. 1.2	Übersicht der RSS-Proteine von Pflanzenviren und deren Interaktion mit dem pflanzlichen Abwehrmechanismus.	18
Tab. 2.1	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme, deren Genotyp und Bezugsquellen.	25
Tab. 2.2	Übersicht und Beschreibung der verwendeten Pflanzen.	25
Tab. 2.3	Auflistung der verwendeten Enzyme zur Modifikation von Nucleinsäuren, deren Klassifizierung, Pufferzusammensetzungen und Bezugsquellen.	25
Tab. 2.4	Auflistung der verwendeten Polymerasen, deren Klassifizierung, Pufferzusammensetzungen und Bezugsquellen.	26
Tab. 2.5	Auflistung aller weiteren verwendeten Enzyme, deren Funktionen, Pufferzusammensetzungen und Bezugsquellen.	26
Tab. 2.6	Übersicht der verwendeten Kits und deren Bezugsquellen.	26
Tab. 2.7	Auflistung der verwendeten Antikörper, deren Herkunft, eingesetzte Verdünnungen und Bezugsquellen.	27
Tab. 2.8	Übersicht und Sequenzen der verwendeten RNA-Oligonukleotide	27
Tab. 2.9	Übersicht und Sequenzen der verwendeten DNA-Oligonukleotide.	28
Tab. 2.10	Übersicht der verwendeten Vektoren und Ausgangsplasmide.	29
Tab. 2.11	Auflistung der verwendeten Geräte mit Typenbezeichnung und Herkunft.	30
Tab. 2.12	Übersicht der verwendeten Programme und Bezugsquellen.	31
Tab. 2.13	Übersicht der verwendeten Antibiotika zur Selektion rekombinanter Klone, deren Endkonzentrationen, Abkürzungen und die jeweiligen Resistenzgene.	33
Tab. 2.14	Übersicht der Reaktionsansätze für einen Kontrollverdau und für Klonierungen.	35
Tab. 2.15	Übersicht eines Reaktionsansatzes für eine Ligation.	38
Tab. 2.16	Übersicht eines Reaktionsansatzes für eine 5'-Endmarkierung.	39
Tab. 2.17	Übersicht der Reaktionsansätze für die unterschiedlichen DNA-Polymerasen.	41
Tab. 2.18	Übersicht der Temperaturprogramme für die unterschiedlichen DNA-Polymerasen.	41
Tab. 2.19	Übersicht des Reaktionsansatzes der gerichteten Mutagenese.	42
Tab. 2.20	Übersicht des Temperaturprogrammes für die gerichtete Mutagenese.	42
Tab. 2.21	Übersicht des Reaktionsansatzes einer reversen Transkription.	43

Tab. 2.22	Übersicht der Gelzusammensetzung für Polyacrylamidgele mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration.	48
Tab. 2.23	Übersicht des Reaktionsansatzes einer radioaktiven Endmarkierung von RNA-Oligonukleotiden.	53
Tab. 2.24	Übersicht des Reaktionsansatzes einer Endmarkierung von RNA-Oligonukleotiden.	53
Tab. 2.25	Übersicht der Gelzusammensetzung für TBE Polyacrylamidgele mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration.	54
Tab. 2.26	Übersicht der verwendeten Antibiotika zur Selektion rekombinanter Klone, deren Endkonzentrationen, Abkürzungen und die jeweiligen Resistenzgene.	56
Tab. 2.27	Übersicht der durch Mutagenese erzeugten Plasmide sowie deren Ausgangsvektoren, verwendete Primerpaare, Änderungen der AS und neue Restriktionsschnittstellen.	61

8. Danksagung

Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.

Johann Wolfgang von Goethe

Ich danke Herrn Dr. habil. Michael Wassenegger für das mir entgegengebrachte Vertrauen beim Überlassen des Themas dieser Arbeit. Seine immerwährende freundliche Betreuung und seine kritischen Denkanstöße unterstützten ein erfolgreiches Umsetzen des Projektes.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Herbert Zimmermann möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung dieser Arbeit im Rahmen des Fachbereichs Biowissenschaften an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt und für das Erstellen des Gutachtens bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Kajohn Boonrod, der mich in allen Belangen wissenschaftlich, moralisch und energetisch unterstützt hat. Für die Durchführung dieser Arbeit stellte dies eine große Hilfe dar.

Bei Frau Dr. Gabi Krczal bedanke ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit am Institut AIPlanta.

Ich danke Rana Jamous, Mirko Moser und Athanasios Dalakouras für die Anregungen und den Gedankenaustausch.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Epigenetik und des Instituts sei für das gute Arbeitsklima und die Zusammenarbeit gedankt.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie. Sie hielten mir über Jahre hinweg in jeder Beziehung den Rücken frei. Ihre große Unterstützung in guten wie auch in schwierigen Zeiten war eine sehr wichtige Voraussetzung für ein erfolgreiches Studium mit anschließender Promotion. Nicht vergessen möchte ich alle Freunde, auf deren Toleranz und Unterstützung ich mich die ganze Zeit verlassen konnte.

9. Lebenslauf

Marc Füllgrabe

Geburtsdatum: 08.06.1981
 Familienstand: verheiratet, keine Kinder



Beruflicher Werdegang

01/2007-02/2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der RLP AgroScience GmbH, Abt. Epigenetik
 Dr. habil. Wassenegger, Neustadt a.d. Weinstraße
 Beginn der Promotion mit dem Thema: „Funktionelle Analyse der
 Helper Component Proteinase (HC-Pro) aus Zucchini Yellow Mosaic Virus“

04/2005-12/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am MPI für Psychiatrie München
 im Zentralinstitut für seelische Gesundheit Mannheim, Abt. Molekulare
 Pharmakologie Prof. Gebicke-Haerter
 Mitarbeit am BMBF-Projekt „Einfluss des CRH/CRH-R1-Signalweges auf die
 Alkoholabhängigkeit“

10/2002-03/2004 Betreuung der Erstsemesterpraktika „Struktur und Funktion von Organismen“
 an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt

Berufliche Fortbildungen

09/2009 SIROCCO sRNA cloning workshop in Cambridge, Großbritannien

02/2008 Forschungsaufenthalt am Agricultural Biotechnology Centre in Gödöllő,
 Ungarn

11/2007 Teilnahme am SIROCCO annual meeting in Berlin, Deutschland

11/2007 Teilnahme am 5th Colmar symposium „The New RNA Frontiers“ in Colmar,
 Frankreich

10/2005 Erfolgreiche Teilnahme an dem Kurs „Versuchstierkunde und
 tierexperimentelle Methoden“ (GV-SOLAS; FELASA, Kat. B)

Schulbildung und Studium

10/2000-03/2005 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt;
 Hauptfach: Zell- und Entwicklungsbiologie; Nebenfächer: Genetik und
 Pflanzenphysiologie
 Thema der Diplomarbeit: „Charakterisierung von P2-Rezeptoren in
 Neurosphären aus Nagerhirn“ Betreuer Prof. H. Zimmermann
 in der Abteilung Neurochemie
 Abschluss: Diplom-Biologe; Note: 1,8

Lebenslauf

07/1991- 07/2000	Wolfgang Ernst Gymnasium in Büdingen Abschluss: Abitur; Note: 2,7
06/1987- 06/1991	Grundschule in Büdingen

Publikationen

1. Weinheimer I., Boonrod K., Zwiebel M., Füllgrabe M., Krczal G., Wassenegger M. (2009) Analysis of an auto-proteolytic activity of rice yellow mottle virus silencing suppressor P1. *Biol Chem*
2. Füllgrabe M.W., Vengeliene V., Spanagel R. (2007) Influence of age at drinking onset on the alcohol deprivation effect and stress-induced drinking in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 86(2):320-6.
3. Mishra S.K., Braun N., Shukla V., Füllgrabe M., Schomerus C., Korf H.W., Gachet C., Ikehara Y., Seigny J., Robson S.C., Zimmermann H. (2006) Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development* 133(4):675-84.

Technische Fähigkeiten und Kompetenzen

molekularbiol. Methoden	Klonierungen, DNA-/RNA-Extraktion; Northern Blots, Southern Blots, PCR-Techniken (RT-PCR, Real-Time PCR, Mutagenese PCR), Herstellung von cDNA-Bibliotheken, Microarray-Analysen, miRNA-Klonierung / Profiling
proteinbiochem. Methoden	Isolierung von Zellorganellen und Proteinen aus pflanzlichen Zellextrakten, Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus E. coli und Pflanzen, Protein-Interaktionsstudien, electrophoretic mobility shift assay (Gelretardationsassay), Gelfiltration mit dem Chromatographie Systems ÄktaPrime Plus, Blue-native PAGE, SDS-PAGE, Immunoblots
zellbiologische Techniken	Generierung transgener Pflanzen (Arabidopsis, Tabak), pflanzliche Zell- und Gewebekultur, Isolierung von Protoplasten

Weitere Kenntnisse

Sprachen	sehr gute Englischkenntnisse gute Grundkenntnisse in Französisch
EDV-Kenntnisse	fundierte Kenntnisse der Programme MS Word, MS Access, MS Excel, MS PowerPoint, Adobe PhotoShop CS, Quantity One, EndNote, VectorNTI, Statistica, TEX

Neustadt an der Weinstraße, 16. März 2010

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Neustadt an der Weinstraße, den 16.03.2010

Marc Füllgrabe

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

„Funktionelle Analyse der
Helper-Component Proteinase (HC-Pro)
aus Zucchini Yellow Mosaic Virus“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Neustadt an der Weinstraße, den 16.03.2010

Marc Füllgrabe