

Optimierung der *rolling circle amplification* für beet curly top Geminiviren und ihre defekten DNAs

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Judith Bach, geb. Horn

aus Püttlingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Holger Jeske

Mitberichter: PD Dr. Thomas Frischmuth

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 2011

Biologisches Institut der Universität Stuttgart

2011

I	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
II	ZUSAMMENFASSUNG	9
III	ABSTRACT	10
IV	EINLEITUNG	11
1.	Geminiviren	11
1.1	BCTV als Vertreter der Gattung <i>Curtovirus</i>	12
1.1.1	Zuckerrübe, der wichtigste Wirt von BCTV	12
1.1.2	Systematik der Curtoviren.....	15
1.1.3	Genetik der Curtoviren.....	16
1.1.4	Infektionskontrolle	21
2.	Diagnostik von Geminiviren.....	24
2.1	Verbreitete Nachweismethoden.....	24
2.1.1	PCR-basierte Methoden	25
2.1.2	<i>Rolling circle amplification (RCA)</i>	25
2.2	Microarraytechnologie	27
2.2.1	Die Entstehung der Microarraytechnologie.....	28
2.2.2	Formen von Microarrays	29
2.2.3	Nutzen der Microarraytechnologie für die Geminivirus-Diagnostik.....	30
3.	Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit	31
V	MATERIAL UND METHODEN	33
1.	Material.....	33
1.1	Chemikalien	33
1.2	Software/Programme	33
1.3	Pflanzenmaterial	34
1.4	Plasmide und Vektoren.....	35
1.5	Organismen	36
1.6	Oligonukleotide	37

1.7	Enzyme.....	38
1.8	Kits.....	38
2.	Methoden.....	39
2.1	Inokulation von Pflanzenmaterial.....	39
2.2	Pflanzenanzucht.....	39
2.3	Isolierung der Gesamtnukleinsäuren aus Pflanzenmaterial.....	40
2.3.1	CTAB-basierte Extraktion.....	40
2.3.2	Phenol/Chloroform-basierte Extraktion.....	40
2.4	Amplifikation viraler DNA.....	41
2.4.1	PCR zum Nachweis des Transgens.....	41
2.4.2	Standard-RCA-Protokoll (GE Healthcare Kit).....	42
2.4.3	Spezielle RCA-Protokolle (NEB Polymerase).....	42
2.5	Standardmethoden zur Analyse von DNA.....	46
2.5.1	Reinigung von DNA.....	46
2.5.2	Restriktionsspaltung viraler DNA.....	46
2.5.3	Agarosegelelektrophorese.....	47
2.5.4	Chloroquingelelektrophorese.....	47
2.5.5	<i>Southern blot</i> -Analyse: Immobilisierung von Nukleinsäuren auf Membranen.....	48
2.5.6	<i>Southern blot</i> -Analyse: Detektion immobilisierter Nukleinsäuren.....	49
2.6	Klonierung und Sequenzierung viraler DNA.....	51
2.6.1	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	51
2.6.2	Vektorpräparation.....	51
2.6.3	Ligation.....	51
2.6.4	Herstellung hitzekompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	52
2.6.5	Transformation.....	52
2.6.6	<i>Colony-RCA</i>	53
2.6.7	Sequenzierung.....	53
2.7	Statistische Auswertung.....	54

2.8	Microarray.....	55
2.8.1	Aldehydmodifizierte Glasobjektträger	55
2.8.2	Streptavidinmodifizierte magnetische Kügelchen	57
2.9	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie.....	60
VI	ERGEBNISSE	61
1.	Defekte DNAs von BCTV korrelieren unterschiedlich mit Symptomen in Zuckerrübe	61
1.1	DNA-Interferenz in transgenen Zuckerrüben.....	61
1.1.1	Symptomentwicklung.....	61
1.1.2	RCA/RFLP-Analyse der Einzelpflanzen.....	65
1.1.3	Korrelation von Symptomen und Replikation viraler DNA	72
1.2	Sequenzanalyse der D ₀ -DNA	79
1.3	Sequenzanalyse später D _n -DNAs.....	81
2.	Entwicklung eines Mikrochips zur Detektion von Geminiviren	96
2.1	Direkte Markierung von RCA-Produkten	96
2.2	Oberflächengebundene RCA.....	101
2.2.1	Aldehydmodifizierte Glasobjektträger	101
2.2.2	Streptavidinmodifizierte magnetische Kügelchen	102
3.	Geminivirale DNA-Formen als Matrizen für die RCA	111
VII	DISKUSSION	121
1.	Defekte DNAs von BCTV korrelieren unterschiedlich mit Symptomen in Zuckerrübe....	121
1.1	DNA-Interferenz in transgenen Zuckerrüben.....	121
1.2	Sequenzanalyse der D ₀ -DNA	125
1.3	Sequenzanalyse später D _n -DNAs.....	128
2.	Entwicklung eines Mikrochips zur Detektion von Geminiviren	134
2.1	Direkte Markierung von RCA-Produkten	134
2.2	Oberflächengebundene RCA.....	135
3.	Geminivirale DNA-Formen als Matrizen für die RCA	137

VIII	LITERATURVERZEICHNIS	143
IX	ANHANG.....	157
1.	Plasmide und Konstrukte.....	157
2.	Größenstandards.....	159
3.	Symptomdokumentation (Gesamtdaten).....	160
4.	RCA/RFLP-Analyse mit <i>SaI</i> und <i>NcoI</i> (Gesamtdaten)	165
5.	Sequenzen	172
5.1	Sequenzen der D _n -DNAs aus langzeitüberlebenden Zuckerrüben.....	172
5.1.1	Pflanze 2 (Linie 84124T, Pflanze 4, Experiment 1).....	172
5.1.2	Pflanze 8 (Linie 84124T, Pflanze 2, Experiment 2).....	172
5.1.3	Pflanze 9 (Linie 84124T, Pflanze 3, Experiment 2).....	175
5.1.4	Pflanze 11 (Linie 84124T, Pflanze 4, Experiment 2).....	178
5.1.5	Pflanze 17 (Linie 84111K, Pflanze 8, Experiment 2)	178
5.2	Sequenz der transgenen D ₀ -DNA.....	181
6.	<i>Dot plot</i> -Analyse der D _n -DNAs (Gesamtdaten).....	184
7.	Während dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen	185
X	DANKSAGUNG	186
XI	LEBENS LAUF	187

I Abkürzungsverzeichnis

\bar{x}	Mittelwert	D-DNA	bezeichnet defekte DNAs im Allgemeinen
Δ	Deletion	deion.	deionisiert
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
μg	Mikrogramm	DMSO	Dimethylsulfoxid
μl	Mikroliter	DNA	Desoxyribonukleinsäure
μM	Mikromolar	DNase	Desoxyribonuklease
μm	Mikrometer	D_n -DNA	defekte DNA, die <i>de novo</i> entstand; D_n -DNAs werden im Folgenden klar von D-DNAs im Allgemeinen und der transgenen D_0 -DNA unterschieden
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand)	dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	dpai	<i>days post agroinoculation/</i> Tage nach Agroinokulation
AbMV	abutilon mosaic virus	dsDNA	doppelsträngige DNA
ACMV	African cassava mosaic virus	DTT	Dithiothreitol
Amp	Ampicillin	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
Amp ^R	Resistenz gegen Ampicillin	dUTP	Desoxyuridintriphosphat
AP	Alkalische Phosphatase	EACMCV	East African cassava mosaic Cameroon virus
AS	Aminosäurerest	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>B. vulgaris</i>	<i>Beta vulgaris</i>	ECSV	eragrostis curvula streak virus
bp	Basenpaar(e)	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
BCTV	beet curly top virus	ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent</i> <i>assay</i>
BGMV	bean golden mosaic virus	EtOH	Ethanol
BSA	(Bovines) Rinderserumalbumin	F ₁ -Linie	Linie der ersten Filialgeneration
BYVMV	Bhendi yellow vein mosaic virus	FL	<i>full-length/gesamtgenomisch</i>
bzw.	beziehungsweise	forw/F	<i>forward-Primer</i>
CaLCuV	cabbage leaf curl virus	g	Gramm
cDNA	<i>complementary DNA</i>	G ₁ -Phase	G ₁ -Phase des Zellzyklus
CI	Chloroform-Isoamylalkohol	h	Stunde
CIP	<i>calf intestinal phosphorylase</i>	H ₂ O _{dd}	deionisiertes, destilliertes, autoklaviertes Wasser
CLCrV	cotton leaf crumple virus	H ₂ O _{deion.}	deionisiertes Wasser
cm	Zentimeter	HBV	hepatitis B virus
CMV	cucumber mosaic virus	HF	<i>high fidelity</i>
CP	<i>coat protein/Kapsidprotein</i>	HIV	<i>human immunodeficiency</i> <i>virus/menschliches</i> Immunschwächevirus
CSR	<i>complementary strand</i> <i>replication</i>		
CTAB	Cetyltrimethylammonium- bromid		
D_0 -DNA	transgene defekte DNA		
dATP	Desoxyadenosintriphosphat		
dCTP	Desoxycytidintriphosphat		

HS-DNA	Heringssperma-DNA	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / Polymerasekettenreaktion
ICMV	Indian cassava mosaic virus	PTGS	posttranskriptionelles Gen- <i>silencing</i>
IR	intergene Region	PYMV	potato yellow mosaic virus
Kan	Kanamycin	qPCR	quantitative PCR
kb	Kilobasen	RCA	<i>rolling circle amplification</i>
kbp	Kilobasenpaare	RCR	<i>rolling circle replication</i>
l	Liter	RDR	<i>recombination-dependent replication</i>
lat.	lateinisch	Rep	Replikations-Initiator Protein
LB	Luria-Bertani	rev/R	<i>reverse-Primer</i>
Lsg.	Lösung	RFLP	Restriktionsfragment
m	Meter		Längenpolymorphismus
M	Molar oder Methionin	RNA	Ribonukleinsäure
mA	Milliampere	RNase	Ribonuklease
MCS	multiple Klonierungsstelle	ROS	<i>reactive oxygen species</i> / reaktive Sauerstoffspezies
mg	Milligramm	rpm	<i>rotations per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
min	Minuten	RT	Raumtemperatur
Mio.	Million	s.	siehe
ml	Milliliter	s.o.	siehe oben
mm	Millimeter	s	Sekunde
mM	Millimolar	SDS	Natriumdodecylsulfat
MP	<i>movement protein</i>	SiGMCRV	sida golden mosaic Costa Rica virus
mRNA	<i>messenger RNA</i>	SiYVV	sida yellow vein virus
MYMV	mungbean yellow mosaic virus-Vigna	SLCV	squash leaf curl virus
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> (Muntju)	sog.	sogenannt
n.b.	nicht bestimmt	S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
n.d.	nicht definiert	ssDNA	einzelsträngige DNA
NaAc	Natriumacetat	TBE	Tris-Borat-EDTA
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
ng	Nanogramm	TE	Tris-EDTA
nm	Nanometer	TGMV(yv)	tomato golden mosaic virus (yellow vein)
nmol	Nanomol	Ti-Plasmid	<i>tumor inducing plasmid</i> / Tumorinduzierendes Plasmid
nt(s)	Nukleotid(e)	T _m	Schmelztemperatur
o.ä.	oder ähnlich(e)	TMV	tobacco mosaic virus
OD	optische Dichte	Tris	Tris(hydroxymethyl)- Aminomethan
ORF	<i>open reading frame</i> /offener Leserahmen		
ori	<i>origin of replication</i> / Replikationsursprung		
PCI	Phenol-Chloroform- Isoamylalkohol		

TYLCV	tomato yellow leaf curl virus
U	<i>unit</i> /Enzymeinheit
ü.N.	über Nacht
USA	<i>United States of America</i> /Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wpai	<i>weeks post agroinoculation</i> / Wochen nach Agroinokulation
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungen in Zusammenhang mit Sequenzen

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

II Zusammenfassung

Weltweit werden Erträge wichtiger Kulturpflanzen durch Infektionen mit Geminiviren gemindert. Daher sind schnelle und sensitive Diagnostikmethoden erforderlich, die erkrankte Pflanzen frühzeitig identifizieren. Alternativ könnte der Anbau resistenter Pflanzen Infektionen eindämmen.

DNA-Interferenz wurde erfolgreich in *N. benthamiana* getestet (Frischmuth *et al.*, 1997a; Stanley *et al.*, 1990; Stenger, 1994). Transgene defekte DNAs (D-DNAs) wurden durch das Elternvirus mobilisiert und reduzierten dessen Replikation einhergehend mit einer Symptomabschwächung. In dieser Arbeit wurde die DNA-Interferenz im wichtigsten Wirt von beet curly top virus, der Zuckerrübe, untersucht. In zwei Infektionsreihen war die Transgen-Mobilisierung mit schweren Symptomen assoziiert. Nicht-transreplizierende Pflanzen oder solche mit spontan gebildeten D-DNAs (D_n -DNAs) wiesen milde Symptome auf. Das Transgen stimmte bis auf den Austausch $G_{2359}T$ mit der erwarteten Sequenz überein und der C4-ORF war funktionell. Da dieses Protein die Hauptdeterminante für Symptome ist, wurde es als Ursache für die starken Symptome in transgen-positiven Pflanzen vermutet.

20 D_n -DNAs aus fünf Pflanzen (14 bzw. 20 Monate nach Inokulation) wurden sequenziert. Die Moleküle (1340 bis 2810 Nukleotide) waren variabel hinsichtlich ihrer Deletionen. Bei Punktmutationen gab es die Präferenz für C:G→A:T (42 % der Austausche). Durchschnittlich betrug die Mutationsrate $3,3 \times 10^{-3}$ Austausche pro Nukleotid. In vier D_n -DNAs traten Inversionen auf, bei 50 % der Moleküle kam es zu Duplikationen.

Für eine schnellere Geminivirusdiagnostik wurden Versuche zur Entwicklung eines Mikrochips durchgeführt. Als geeignete Detektionsmethoden erwiesen sich der Einbau Biotin-markierten dUTPs während der Amplifikation und eine Anfärbung des Amplifikates mit SybrGold[®] und DAPI. Spezifische Oligonukleotide konnten auf planare und sphärische Oberflächen gebunden werden, Hybridisierung geminiviraler DNA und/oder deren Amplifikation auf der Oberfläche fanden jedoch nicht statt.

Es wurde gezeigt, dass die $\Phi 29$ -DNA-Polymerase einige geminivirale DNA-Formen als Matrize nutzen kann, ohne dass Primer in der Reaktionslösung enthalten sind. Vorbehandlungen der Gesamtnukleinsäuren mit zwei Exonukleasen und RNase H vor RCA erlaubten interessante Einblicke in die molekulare Struktur der replikativen Intermediate. Diese Analyse ergänzt die Charakterisierung der Replikation von Geminiviren durch zweidimensionale Gelelektrophorese und *Southern blot*-Analyse.

III Abstract

Geminiviruses reduce yields of important staple crops worldwide. This necessitates fast and sensitive diagnostics to identify infected plants, at an early stage. Alternatively, resistant plants could help to prevent infections.

DNA interference was tested successfully for some geminiviruses in *N. benthamiana* (Frischmuth *et al.*, 1997a; Stanley *et al.*, 1990; Stenger, 1994). Transgenic defective DNAs (D-DNAs) were mobilized through the parental virus and reduced its replication resulting in an attenuation of symptoms. In the scope of this thesis, DNA interference was investigated in the most important host of beet curly top virus, namely sugarbeet. Two infection series showed that the transgene-mobilization correlated with severe symptoms. Non-transreplicating plants or such with spontaneously formed D-DNAs (D_n -DNAs) developed mild symptoms. The sequence of the transgene was identical to the expected sequence except the nucleotide substitution $G_{2359}T$. Furthermore, the C4 ORF was functional. As this protein is the main determinant for symptoms, we postulated a correlation with the appearance of severe symptoms in transreplicating plants.

Twenty D_n -DNAs from five plants (14 or 20 months post inoculation) were sequenced. The molecules (1340 to 2810 nucleotides) were highly variable regarding their deletions. Amongst the pointmutations, $C:G \rightarrow A:T$ was predominant (42 % of all changes). The average mutation rate was 3.3×10^{-3} substitutions per nucleotide. Four D_n -DNAs showed inversions and 50 % of the molecules carried duplications.

Experiments were performed to develop a microchip for fast geminivirus diagnostics. Suitable detection methods turned out to be the integration of biotin labelled dUTP during amplification and staining of the amplificate with SybrGold[®] or DAPI. Specific oligonucleotides could be attached to planar or spherical surfaces. Hybridization of geminiviral DNA and/or its amplification on the surface were not successful.

It was shown that some geminiviral DNA forms were amplified by $\Phi 29$ DNA polymerase without addition of primers to the reaction. Pretreatments with two exonucleases and RNase H gave interesting insights into the molecular structure of replicative intermediates. This analysis provides additional information about the replication of geminiviruses in combination with twodimensional gelelectrophoresis and Southern blot analysis.

IV Einleitung

1. Geminiviren

Weltweit mindern Infektionen mit den phytopathogenen Geminiviren Ernteerträge wichtiger Kulturpflanzen wie Zuckerrübe, Kartoffel, Bohne, Mais und Tomate (Moffat, 1999). Das Curtovirus beet curly top virus (BCTV) z.B. tritt in den USA seit Anfang des 20ten Jahrhunderts immer wieder mit verheerenden Folgen für die Landwirtschaft in Erscheinung (Wintermantel, 2007; Wisler und Duffus, 2000). Im Jahre 2001 und den darauf folgenden Sommern waren signifikante Einbußen in den Ernten von Zuckerrübe, Tomate und Paprika zu verzeichnen (Wintermantel, 2007). Zudem infizieren BCTV und andere Geminiviren zahlreiche Beikräuter zum Teil asymptomatisch, womit diese fortan als Reservoir dienen können (Frischmuth *et al.*, 1997b; Jovel *et al.*, 2007; Wyant *et al.*, 2011).

Aufgrund der Lebensweise der Überträgerinsekten (Vektoren) treten Infektionen mit Geminiviren hauptsächlich in tropischen und subtropischen Gebieten auf. Während der natürliche Lebensraum der Vektoren der Begomoviren (*Bemisia tabaci*) auf diese Klimate beschränkt ist, sind Zwergzikaden, die Überträger von Mastre- und Curtoviren auch in gemäßigten Klimazonen heimisch. Zudem stellen Gewächshäuser in nichttropischen Gebieten einen idealen Lebensraum für Geminiviren dar (Cerkauskas *et al.*, 2004). Verstärkter globaler Handel sowie Änderungen der landwirtschaftlichen Methoden und ökologischen Bedingungen führten zu einer Ausbreitung von Geminiviren und insbesondere deren Insektenvektoren in andere Habitate (Mansoor *et al.*, 2003; Moffat, 1999).

Das namensgebende Charakteristikum der Geminiviren stellen ihre Zwillingspartikel (lat. *geminus*: Zwilling) von 18x30 nm Größe dar, die sich aus zwei unvollständigen Ikosaedern mit je elf Kapsomeren zusammensetzen (Böttcher *et al.*, 2004). Ihr Genom kann aus ein oder zwei zirkulären Komponenten bestehen (mono- bzw. bipartit), wobei die Moleküle getrennt voneinander verpackt werden. Das Genom der Geminiviren besteht aus einzelsträngiger DNA. Bei tierischen Viren ist dieser Genomaufbau bei *Anelloviridae* (Biagini, 2009), *Circoviridae* (Allan und Ellis, 2000; Hino, 2002; Marlier und Vindevogel, 2006) und *Parvoviridae* (Bergoin und Tijssen, 2000), unter Bakteriophagen bei den *Inoviridae* (Monjezi *et al.*, 2010) und *Micro-*

viridae (Wichman und Brown, 2010) zu finden. Außer den Parvoviren besitzen alle genannten Familien ein zirkuläres Genom. Bei Pflanzenviren besitzen neben den Geminiviren lediglich die *Nanoviridae* (Gronenborn, 2004) ein Genom aus einzelsträngiger DNA. Zusätzlich sind die Genomkomponenten der Nanoviren zirkulär.

Zusammen mit Wirtspflanzenspektrum und Insektenvektor hat die Genomstruktur Einfluss auf die Gliederung der Familie *Geminiviridae* in die vier Gattungen *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus* und *Topocuvirus* (vgl. Tabelle 1). BCTV, das den Fokus dieser Arbeit darstellt, wird der Gattung *Curtovirus* zugeordnet.

Tabelle 1: Gliederung der Familie *Geminiviridae* (Fauquet *et al.*, 2008).

Gattung	Genomorganisation	Wirtspflanzen	Vektoren
<i>Begomovirus</i>	mono- oder bipartit	Dikotyle	<i>Bemisia tabaci</i>
<i>Curtovirus</i>	monopartit	Dikotyle	<i>Cicadellidae</i>
<i>Mastrevirus</i>	monopartit	Mono- oder Dikotyle	<i>Cicadellidae</i>
<i>Topocuvirus</i>	monopartit	Dikotyle	<i>Membracidae</i>

1.1 BCTV als Vertreter der Gattung *Curtovirus*

Infektionen mit Curtoviren zeigen sich in typischen Symptomen wie Wachsminderung, Nekrose und Hyperplasie des abaxialen Phloems, die mit einem Anschwellen der Blattadern und aufwärtsgerichtetem Blattrollen und -kräuseln einhergeht (Bennett, 1967; Esau, 1976; Esau und Hoefert, 1978). Oft ist eine Verdunkelung der Blätter zu beobachten, die durch übermäßige Anthocyan-Einlagerung in infizierten Pflanzen bewirkt wird (Lee *et al.*, 1994). Die Viren werden durch die Zikade *Circulifer tenellus* (Baker) zirkulativ und nicht-propagativ übertragen und befallen mehr als 300 Pflanzenarten aus 44 unterschiedlichen Familien (Lam *et al.*, 2009), darunter bedeutende Nutzpflanzen wie Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.), Spinat (*Spinacia oleracea*), Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*), Paprika (*Capsicum annuum*) und Tomate (*Solanum lycopersicum*).

1.1.1 Zuckerrübe, der wichtigste Wirt von BCTV

Einer der wichtigsten Wirte von BCTV ist die Zuckerrübe, die in den letzten 200 Jahren an ökonomischer Bedeutung gewinnen konnte. Neben der Zuckergewinnung bietet sich diese Nutzpflanze auch für die Herstellung von Bioethanol an. Dieser Wirtschaftssektor wird derzeit aufgrund staatlich geförderter Programme von

den USA (Rohstoff: Mais) und Brasilien (Rohstoff: Zuckerrohr) dominiert. Klimaschutz und die Abhängigkeit von importiertem Rohöl werden die Bedeutung von Bioethanol zukünftig auch in Europa steigen lassen. Durch die langjährige Erfahrung und die hohe Produktivität des Anbaus von Zuckerrüben in Europa hat dieser Rohstoff ein großes Potential bei der Herstellung von Biokraftstoffen und wird auch bereits zu diesem Zweck verwendet (Schmitz *et al.*, 2003). Daneben werden auch Weizen und Roggen in Deutschland zur Produktion von Bioethanol eingesetzt (<http://www.bdbe.de/index.html>). Allerdings könnte Mais durch die Entwicklung und Zulassung neuer Sorten in Europa und vor allem Deutschland die Zuckerrübe von diesem Sektor verdrängen (Schmitz *et al.*, 2003).

In vielen Kulturen nehmen und nahmen Zucker und andere Süßstoffe eine wichtige Rolle in der Nahrungsmittelzubereitung ein. In frühen Zeiten konnte zur Süßung lediglich Honig verwendet werden (G.R.K., 1866). Zuckerrohr (*Saccharum Barberi* Jesw., *S. sinense* Roxb. und *S. officinarum*) wurde in der christlichen Welt erst durch die Kreuzzüge ab dem 12. Jahrhundert bekannt (<http://www.sugar-art.net/Geschichte.htm>) und stellte nach seiner Entdeckung für lange Zeit die einzige Quelle für kristallinen Zucker dar. Sein Anbau ist jedoch auf tropische und subtropische Regionen beschränkt (Parthasarathy, 1948). Vermutlich wurde es bereits vor Christi Geburt auf Neuguinea angebaut und später über Indien und China in den Mittelmeerraum transportiert, von wo aus es nach Mittel- und Südamerika bzw. Indonesien gelangte (Franke, 2007). In der Kolonialperiode war es aus finanziellen Gründen der europäischen Elite vorbehalten, diesen reinen Zucker aus Übersee-Plantagen zu importieren, und Zuckerrohr wurde lange Zeit als Luxusartikel in deutschen Apotheken vertrieben (Franke, 2007). Seit Ende des 17ten Jahrhunderts wurde zunehmend nach alternativen und günstigeren Zuckerquellen gesucht, die auch dem gemeinen Volk zugänglich wären.

Der deutsche Chemiker Andreas Sigismund Marggraf konnte 1747 in der Mangold-Wurzel (*Beta vulgaris*) einen hohen Zuckergehalt feststellen (Frankfurter, 1912; Klein, 2004). Als Napoleon Bonaparte durch seine Kontinentalblockade von 1806 bis 1814 den Handel zwischen Großbritannien und Kontinentaleuropa unterband, löste dies einen zehnfachen Anstieg der Preise von Zucker und anderen Importprodukten aus (Rose, 1893). Die Preissteigerung, der Wunsch Preußens nach Autarkie und die

Untersuchungen von Marggraf lösten Züchtungsprogramme an der Mangold-Wurzel aus, um deren Zuckergehalt zu steigern (de Ternant, 1916). Im schlesischen Kunern wurde im Jahre 1802 durch Franz Karl Achard die erste Fabrik zur Gewinnung von Rübenzucker errichtet (Franke, 2007). Ebenezer Herrick Dyer folgte dem Vorbild 1879 mit dem ersten Betrieb auf US-amerikanischem Boden (<http://www.americansugarbeet.org/>). Trotzdem wurde in den folgenden Jahren diskutiert, ob die Zuckerrübe in den Vereinigten Staaten Fuß fassen kann (Taylor, 1903).

Nachdem allerdings die Aufhebung der Kontinental Sperre durch Napoleons Sturz einen Einbruch der deutschen Zuckerrübenindustrie bewirkte (Franke, 2007), dauerte es bis zum Jahre 1898, dass Deutschland mit 1 Mio. Tonnen zum größten Exporteur von Rübenzucker wurde (Taylor, 1903). Noch immer befindet es sich unter den drei größten Herstellern weltweit (in absteigender Reihenfolge: Frankreich, Deutschland und die USA; <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html>). Von weiterer Bedeutung des Zuckerrübenanbaus sind Nebenprodukte der Zuckerproduktion, die als Futtermittel in der Viehzucht verwendet werden. Zudem findet die Zuckerrübe wie bereits erwähnt als Grundlage für Bioethanol und Biokraftstoffe Verwendung (<http://www.zuckerwirtschaft.de/>). Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Kräusel-schopfkrankheit (*curly top disease*), welche seit Beginn des 20ten Jahrhunderts regelmäßig enorme Ernteverluste in den USA auslöst, einen zu beachtenden Faktor im Zuckerrübenanbau darstellt (Wisler und Duffus, 2000).

Infizierte Pflanzen zeigen die für Curtoviren typischen Symptome (s.o.) wie Blattrollen und Wachsminderung und sterben üblicherweise nach zwei bis vier Wochen ab, was zu massiven Ertragseinbußen führt. In den fünfziger Jahren des 20ten Jahrhunderts wurde als Auslöser der Krankheit das Geminivirus BCTV identifiziert (Bennett und Tanrisever, 1958), das neben Zuckerrübe auch andere Nutzpflanzen wie Tomate, Bohne und Kartoffel infiziert. In Kalifornien konnte eine saisonale Abhängigkeit zwischen Virusaufnahme und -übertragung beobachtet werden. Vermutlich erwerben die Zikaden das Virus im Nymphenstadium in den Gebirgsausläufern (sog. Vorberge) auf ein- und mehrjährigen infizierten Beikräutern, um als adulte Tiere in die landwirtschaftlich bedeutsamen Regionen (Kalifornisches Längstal = *California Central Valley*) zu ziehen. In der Wachstumsphase wechseln die Insekten ständig zwischen

Nutzpflanzen und Beikräutern, um schließlich im Spätherbst in die Vorberge zur Überwinterung zurückzukehren (Chen und Gilbertson, 2009).

1.1.2 Systematik der Curtoviren

Historisch wurden drei Stämme von BCTV in Bezug auf Infektionsstärke und Symptomatik unterschieden: Das California/Logan-Isolat, BCTV-CFH und BCTV-Worland. Entsprechend der aktuellen Systematik umfasst die Gattung *Curtovirus* die vier Arten beet curly top virus mit BCTV-A[US:Cal:85] und BCTV-B[US:Log:76], beet mild curly top virus mit BMCTV-[US:Wor] und BMCTV-[US:Wor4], beet severe curly top virus mit BSCTV-[US:Cfh] und BSCTV-[IR:86] und spinach curly top virus (SCTV).

Weiterhin wurde pepper yellow dwarf virus als neue Art vorgeschlagen (PYDV, Lam *et al.*, 2009). Dieses Virus stellt vermutlich eine Rekombinante aus BMCTV-[US:Wor4] und BSCTV-[US:Cfh] dar. Kürzlich wurden drei neue Isolate des sogenannten Iranian BCTV (IBCTV-K, IBCTV-S und IBCTV-Y) im Iran detektiert, die jedoch nur entfernt mit BCTV verwandt sind (Yazdi *et al.*, 2008). Des Weiteren wird das horseradish curly top virus (HrCTV, Klute *et al.*, 1996) zu den Curtoviren gezählt. Die Anordnung der komplementären ORFs (*open reading frame*, offener Leserahmen) des kürzlich charakterisierten turnip curly top virus (TCTV, Briddon *et al.*, 2010) stimmt mit der Genomorganisation der Curtoviren überein, statt drei sind jedoch nur zwei viral angeordnete Leserahmen vorhanden. Die Sequenzen der ORFs C1-C3 von Curtoviren und TCTV weisen geringe Identitäten auf. Für die C4-Proteinsequenz hingegen wurde eine Übereinstimmung von 70,6 % zwischen TCTV, den Nordamerikanischen Curtoviren und BMCTV errechnet. Das tomato pseudo curly top virus (TPCTV, Briddon *et al.*, 1996) wurde zunächst ebenfalls den Curtoviren zugeordnet, jedoch später als eigenständige Gattung *Topocuvirus* klassifiziert.

Es besteht Uneinigkeit bezüglich des geographischen Ursprungs von BCTV bzw. der Curtoviren generell. Bennett und Tanrisever (1967; 1957) zeigten durch ihre Studien, dass BCTV seinen Ursprung im Mittelmeerraum oder Mittleren Osten hatte und durch Pflanzentransport in die Neue Welt gelangte. Des Weiteren hat BSCTV-[US:Cfh] aus den USA eine sehr hohe Sequenzübereinstimmungen mit BSCTV-[IR:86] aus dem Iran (Briddon *et al.*, 1998), was auf ein gemeinsames Vorgängervirus deutet. Im Nahen Osten und dem Mittelmeerraum konnten außerdem wilde Rübenarten gefunden werden, die offensichtlich Resistenz gegen BCTV erworben haben

(Bennett, 1971), was für eine längere Koevolution von Wirt und Virus durch den Ursprung in diesem Gebiet spricht. Andererseits wurde als Argument für einen Ursprung in der Neuen Welt die dortige hohe Diversität der Curtoviren (fünf Arten) angeführt, während in der Alten Welt lediglich ein Curtovirus (BSCTV-[IR:86]) beschrieben wurde (Fauquet *et al.*, 2008). Aufgrund der kürzlich charakterisierten Isolate von IBCTV und des Curtovirus-ähnlichen TCTV wird zurzeit der Ursprung in der Alten Welt favorisiert (Briddon *et al.*, 2010), letztendlich können aber nur die weitere intensive Suche nach Curtoviren auf allen Kontinenten und die abschließende phylogenetische Beurteilung Antwort auf die Herkunftsfrage geben.

1.1.3 Genetik der Curtoviren

BCTV-A[US:Cal:85], dessen Genom 2993 bp umfasst (Hormuzdi und Bisaro, 1993; Stanley *et al.*, 1986), besitzt die typische curtovirale Genomstruktur mit drei viral und vier komplementär angeordneten ORFs (vgl. Abbildung 1). Ausnahmen hiervon sind HrCTV mit drei und die Iranischen Isolate mit zwei komplementär orientierten ORFs. Die intergene Region (IR), die in allen Geminiviren zu finden ist, beinhaltet den Replikationsursprung (*ori*) und zwei bidirektional angeordnete Promotoren, die jeweils die Transkription der V- bzw. C-Gene steuern. Innerhalb der IR befindet sich eine Haarnadelschleife, die das Nonanukleotid TAATATTAC enthält (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999) (s. Abbildung 1). Dieses Motiv ist innerhalb der Familie der Geminiviren hochkonserviert, bei IBCTV und ECSV konnte jedoch die Sequenz TAAGATTCC (abweichende Nukleotide unterstrichen) gefunden werden (Varsani *et al.*, 2009; Yazdi *et al.*, 2008).

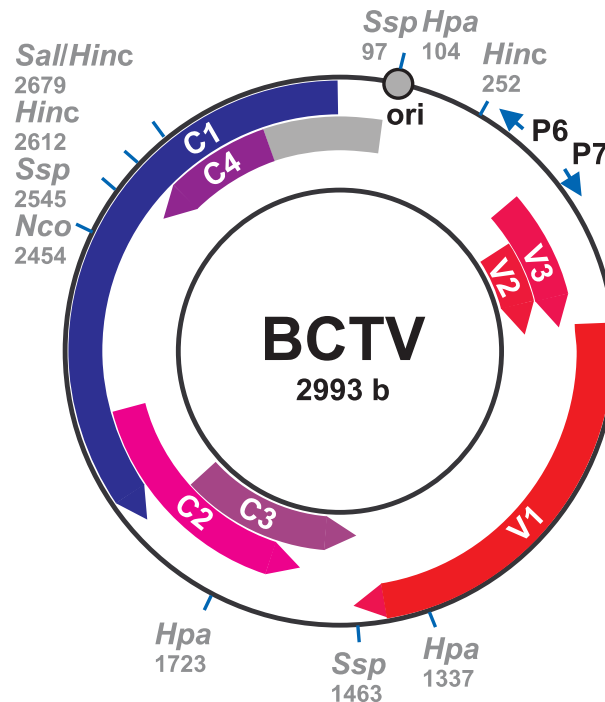


Abbildung 1: Genomorganisation von BCTV-A[US:Cal:85]. Dieser Genomaufbau entspricht den zurzeit bekannten Mitgliedern der Gattung *Curtovirus*, die alle eine Genomgröße von ca. 3 kb besitzen. Als Ausnahme gelten HrCTV mit drei und die iranischen Isolate mit zwei komplementär orientierten ORFs. Die Pfeile kennzeichnen die offenen Leserahmen (V = viral, C = komplementär), wobei der potentiell verlängerte ORF von C4 als graue Verlängerung dargestellt ist. Der Kreis stellt den ori mit der Haarnadelschleife dar. An dieser Stelle sei erwähnt, dass nachfolgend alle Nukleotide von BCTV nach Stanley *et al.* (1986) nummeriert wurden.

Der ORF V1 kodiert wie in allen Geminiviren für das Kapsidprotein (Bridson *et al.*, 1989; Bridson *et al.*, 1990), während das V2-Protein wohl für Symptomentwicklung von Bedeutung ist und wie V3 eine Funktion bei der systemischen Ausbreitung in *B. vulgaris* L. (Zuckerrübe) übernimmt (Hormuzdi und Bisaro, 1993; Stanley *et al.*, 1992). Wie alle Geminiviren sind auch die Curtoviren in ihrer Replikation auf die Wirtszelle angewiesen, da sie mit ORF C1 lediglich für ein Replikations-Initiator-Protein (Rep), jedoch nicht für eine Polymerase kodieren. Rep initiiert die *rolling circle replication* (RCR, Laufs *et al.*, 1995). Für AC1 aus TGMV wurde zudem eine Induktion der Replikationsmaschinerie durch Interaktion mit Homologen des Zellzyklus-Regulatorproteins Retinoblastoma gezeigt (Arguello-Astorga *et al.*, 2004). C2 erhöht die Empfindlichkeit der Pflanze gegenüber einer Infektion (Sunter *et al.*, 2001), was auf die Inaktivierung der SNF1-Kinase und Suppression des RNA-*silencings* zurückgeführt wurde (Hao *et al.*, 2003). Die Expression von C3 bewirkt eine Akkumulation der geminiviralen DNA und beeinflusst die Symptomstärke (Stanley *et al.*, 1992).

Für C4 konnten Latham *et al.* (1997) eine Induktion der Zellteilung im infizierten Gewebe zeigen, was sich in Hyperplasie des Phloems und des umgebenden Parenchyms auf der Blattunterseite mit dem typischen aufwärts gerichteten Blattrollen und Anschwellen der Blattadern äußert (Esau und Hoefert, 1978). Dies wurde in der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) für BSCTV auf eine Induktion des Zellzyklusregulators RKP zurückgeführt, die zu einem Übergang von G₁- nach S-Phase führt (Lai *et al.*, 2009). C4 interagiert zudem mit der Proteinkinase AtSK η von *A. thaliana*, die eine wichtige Funktion im Brassinosteroidsignalweg einnimmt (Piroux *et al.*, 2007). Durch Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren BES1 und BZR1 durch AtSK η werden diese zur Degradation freigegeben. Bei Bindung von Brassinosteroid an den membrangebundenen Rezeptor BRI1 wird jedoch dieser Schritt gehemmt (Wang *et al.*, 2006). Brassinosteroide induzieren eine Vielzahl an zellulären Antworten wie Wachstum von Sprossachse und Pollenschlauch, Blattbiegung, Hemmung des Wurzelwachstums und Regulation der Expression einiger Gene (Li und Chory, 1999). Überexpression von C4 bewirkte in *A. thaliana* den Verlust geordneter Zellschichten und eines definierten Gefäßsystems, eine verstärkte Zellteilung in allen Gewebetypen und die Veränderung des Wurzelwachstums, nach Gabe von Brassinosteroid oder Abscisinsäure erholten sich die Pflanzen, während sie hypersensitiv auf Gibberellinsäure bzw. Kinetin reagierten (Mills-Lujan und Deom, 2010). Um den Zusammenhang zwischen C4 und der Brassinosteroidantwort genauer darstellen zu können, müssen die Versuche von Piroux *et al.* (2007) bzw. Mills-Lujan und Deom (2010) ergänzt werden. Eine Beteiligung von C4 am viralen Transport wurde bei Curtoviren bis vor kurzem nicht berichtet. Neueste Arbeiten weisen allerdings darauf hin, dass C4 von BSCTV eine Rolle in diesem Prozess zukommen kann (Teng *et al.*, 2010). Es wurde gezeigt, dass verkürzte Konstrukte von C4 keinen Einfluss auf die Virusreplikation hatten, sich allerdings keine systemische Infektion in *Nicotiana benthamiana* und *A. thaliana* ausbilden konnte. Die transgene Expression von C4 konnte die systemische Ausbreitung nach Infektion mit C4-Mutanten retten. Weiterhin zeigten Lokalisationsversuche eine mögliche Rolle im Transport zwischen Zellkern und Zytosol. Da eine unspezifische Bindung von ss und dsDNA ermittelt wurde, ist nicht geklärt, ob C4 in den direkten Transport von viraler DNA integriert ist oder durch den Transport von Wirts-DNA einen anderen Einfluss auf die systemische Ausbreitung hat. Die Arbeiten von Teng *et al.* (2010)

lassen vermuten, dass C4 in Curtoviren die Funktionen von *movement protein* und *nuclear shuttle protein* bipartiter Geminiviren vereint und zudem die bereits beschriebenen Einflüsse auf die Symptome hat. Chen *et al.* (2010) fanden einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von *Isb1/gdu3* in *A. thaliana*-Mutanten und einer verminderten Infektiosität von BSCTV. Weiterhin war die Expression von *acd6*, *wak1* und *Isb1* nach Inokulation von *A. thaliana* mit BSCTV erhöht. Diese Proteine sind an der Salicylsäurekaskade beteiligt und tragen somit wohl zur Bekämpfung von Geminiviren bei. Park *et al.* (2010) untersuchten zudem die Symptome in Wurzeln BSCTV-infizierter *A. thaliana* (Col-0), die von Verkürzung über Deformation bis schwerem Kräuseln reichten. Daneben fand die Arbeitsgruppe in infizierten Wurzeln eine leicht höhere Konzentration an viraler DNA als in anderen Organen. Nach Expression von C4 in *A. thaliana* wurde eine Erhöhung der Expression von CYCs, CDKs und PCNA bzw. eine Erniedrigung der ICK1- und RBR1-Expression festgestellt werden.

Auch bei monopartiten Begomoviren existiert ein Zusammenhang zwischen C4 und Symptomen. Für BYVMV wurde eine Aktivität des Proteins als *silencing*-Suppressor erwiesen (Gopal *et al.*, 2007). Für AC4 des bipartiten Begomovirus EACMCV konnte durch *in silico*-Analyse gezeigt werden, dass ein konserviertes N-terminales Myristylierungsmotiv vorhanden ist, welches möglicherweise Einfluss auf Membranlokalisierung und Pathogenität hat (Consensus-Sequenz: MGNLISTCSSSSKANTSARI, Fondong *et al.*, 2007). Myristylierungen geschehen ausschließlich an N-terminalen Glycinresten und sind bei vielen Viren essentiell für die Infektiosität. Dies wurde durch Mutationsstudien am Myristylierungsmotiv retroviraler *gag* Proteine gezeigt. Die Viren konnten ohne Proteinmodifikation nicht in den Infektionszyklus eintreten (Boutin, 1997). Dies betrifft vor allem die Zusammenlagerung der Partikel und/oder die Einlagerung in die Plasmamembran. Bei EACMCV und anderen Geminiviren befindet sich an zweiter Position des Proteins ein Glycin, das möglicherweise myristyliert wird. In der Proteinsequenz von AC4 von EACMCV folgt auf das Glycin ein Cystein, das wahrscheinlich durch die Verknüpfung mit Palmitinsäure modifiziert wird (Fondong *et al.*, 2007). Beide Modifikationen wurden jedoch nicht experimentell nachgewiesen. Eine Palmitylierung oder eine Folge basischer Aminosäuren in der Nähe der *N*-Myristylierung sind nach dem Zwei-Signal-Modell notwendig, um die Membranbindung des Proteins zu ermöglichen, da die Energie der Myristylierung

dazu alleine nicht ausreicht (Resh, 1999). Fondong und Kollegen (2007) konnten zudem zeigen, das AC4 des EACMCV das systemische RNA-*silencing* supprimiert, vermutlich indem es siRNAs bindet. AC4 des kamerunischen Stammes von ACMV besitzt ebenfalls eine Rolle bei der Suppression des posttranskriptionellen Gen-*silencings* (Vanitharani *et al.*, 2004).

Für C4 des BCTV existiert ein Kernbereich (*core*), der die letzten 85 Aminosäuren beinhaltet und zwischen einigen Geminiviren (ACMV, SLCV, TGMV, BGMV, AbMV, TYLCV und PYMV) hohe Sequenzübereinstimmung aufweist (Stanley und Latham, 1992; Stanley *et al.*, 1992). Durch Mutationsexperimente zeigten Stanley *et al.*, dass diese *core*-Region essentiell für die Ausbildung der typischen Symptome ist. Eine gerichtete Mutation zur Einführung früher Stoppcodons resultierte in symptomfreien Infektionen in *B. vulgaris* L. und veränderten Symptomen in *N. benthamiana*.

Bei der Infektion von Pflanzen mit Geminiviren folgt nach Eindringen der Virionen in die Zelle auf die Entpackung der Partikel die Umwandlung der ssDNA in dsDNA (Jeske, 2009). Da Geminiviren keine eigene Polymerase kodieren, nutzen sie Wirtspolymerasen für ihre Replikation (Jeske, 2009). Hierzu besitzen sie Proteine, die ausdifferenzierte Wirtszellen in die S-Phase des Zellzyklus überführen, woraufhin die entsprechenden Polymerasen synthetisiert werden (Nagar *et al.*, 2002; Nagar *et al.*, 1995). Nach der *de novo*-Synthese von RNA-Primern und Auffüllen des Zweitstranges, werden dessen freie Enden ligiert, und Topoisomerasen vermitteln die Spiralisierung der DNA zur Wicklung um Nukleosomen (Jeske, 2009). Diese viralen Minichromosomen (Pilartz und Jeske, 1992, 2003) dienen als Matrizen für Transkription, Replikation und Bildung von ssDNA, die erneut verpackt werden kann. Für Geminiviren wurden drei Strategien zur Replikation beschrieben (Jeske *et al.*, 2001; Preiss und Jeske, 2003): die Komplementärstrangreplikation (*complementary strand replication*, CSR), welche die beschriebene Zweitstrangsynthese darstellt, die RCR, die der Replikation von Bakteriophagen in Form eines rollenden Kreises gleicht (Baas, 1985) und ein rekombinationsabhängiger Mechanismus (*recombination-dependent replication*, RDR). Bei der RDR dringen freie 3'-Enden von ssDNA oder ssDNA-Überhänge von dsDNA in überspiralisierte DNA an homologen Bereichen ein, wodurch die Replikation ausgelöst werden kann (Jeske, 2009). Dieser Mechanismus kann zudem zu Rekombination zwischen (teilweise) verwandten Geminiviren führen.

Der Start der RCR wird durch einen Rep-vermittelten Einzelstrangbruch in der viralen dsDNA am Nonanukleotid TAATATT|AC (| = Schnittstelle) ausgelöst. Rep bindet anschließend kovalent an das neuentstandene 5'-Ende. Nach einer oder mehreren Replikationsrunden verbindet Rep das 5'-Ende mit dem 3'-Ende und bildet eine neue zirkuläre ssDNA (*nicking-closing*-Aktivität).

1.1.4 Infektionskontrolle

Aufgrund der möglichen ökologischen und ökonomischen Schäden stellt BCTV ein interessantes und bedeutendes Forschungsobjekt dar. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gelingt eine Eindämmung dieses aggressiven Geminivirus nur durch strenge Quarantänevorschriften (<http://www.eppo.org>). Zu Beginn des 20ten Jahrhunderts wurde in Kalifornien ein Züchtungsprogramm gestartet, um gegen BCTV resistente Zuckerrübenlinien zu erhalten. In der Tat wurde 1933 die erste resistente Sorte erzeugt. Wenn jedoch sehr junge Pflanzen virustragenden Zikaden exponiert wurden, konnte weiterhin eine Infektion stattfinden. Später wurden die ersten multigermen Inzuchtlinien mit monogermen Hybriden gekreuzt (Draycott, 2006). Seit 1943 wird die Ausbreitung des Vektors durch das Insektizid Malathion kontrolliert. In den 1960er Jahren wurde gezeigt, dass Kammquecke (*Agropyron cristatum*) die Fortpflanzung der Zikaden eindämmen kann, wenn sie um Zuckerrübenfelder gepflanzt wird (Wisler und Duffus, 2000).

Zurzeit ist nicht viel über natürliche Resistenz gegen BCTV bekannt. In *A. thaliana* wurde ein rezessiver Genort gefunden, der für Resistenz gegen den Logan-Stamm verantwortlich ist (Lee *et al.*, 1994). In der Gartenbohne (*P. vulgaris*) wurde das dominante Allel *bct* gefunden, das Resistenz auslöst (Larsen und Miklas, 2004). Durch genetische Manipulation wurden bereits resistente Pflanzen für einige Geminiviren erhalten (Vanderschuren *et al.*, 2007). Dies zeigt das Potential dieser Strategie zur Kontrolle von Infektionen mit BCTV. Der Begriff des *genetic engineering* umfasst dabei pathogenbasierte Wege wie RNA-Interferenz (Bonfim *et al.*, 2007; Vanderschuren *et al.*, 2009), DNA-Interferenz (Stanley *et al.*, 1990) oder transgene Expression viraler (verkürzter) Proteine (Abel *et al.*, 1986; Noris *et al.*, 1996). Aber auch die Expression anderer Proteine wie rekombinanter Antikörper (Safarnejad *et al.*, 2009) oder Peptidaptamere (Lopez-Ochoa *et al.*, 2006) wurde untersucht. Ein künstliches Zinkfingerprotein blockierte in den Experimenten von Sera (2005) den ori

von BSCTV und verhinderte so die Bindung von Rep.

In den 1980er Jahren wurden in Assoziation mit Geminiviren erstmals subgenomische bzw. defekte DNAs (sgDNAs, D-DNAs) detektiert (ACMV: Stanley und Townsend, 1985). Diese sind in kleine ikosaedrische Partikel verpackt (Casado *et al.*, 2004; Frischmuth *et al.*, 2001), die einem halben Zwillingpartikel entsprechen. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurden sie in Begomo-, Curto- und Mastreviren beschrieben (Patil und Dasgupta, 2006). Im Allgemeinen umfassen die D-DNAs etwa die Hälfte der Genomkomponente oder sind etwas kleiner. Sie enthalten in jedem Fall den ori, weshalb sie transrepliziert werden können, und üblicherweise nur die linke Seite des viralen Genoms, wodurch sie zur Verpackung auf das Kapsidprotein des Elternvirus angewiesen sind. Häufig ist C1 verkürzt, womit die D-DNAs auch in der Replikationsinitiierung auf das Elternvirus angewiesen sind. Bei bipartiten Viren werden D-DNAs vor allem aus der B-Komponente gebildet. D-DNAs können außerdem durch Rekombination zwischen DNA A und B entstehen, wie für ICMV gezeigt wurde (Patil *et al.*, 2007). Generell kommen verschiedene Mechanismen zur Entstehung von D-DNAs in Frage: Deletion, Duplikation, Inversion, Umlagerung und Insertion nichtviraler DNA-Sequenzen (Liu *et al.*, 1998; Patil und Dasgupta, 2006). Für BCTV wurden nach Agroinokulation von *N. benthamiana* zwei Populationen von D-DNAs (680 bis 880 bp und 1180 bis 1700 bp) entdeckt (Frischmuth und Stanley, 1992). Sechs dieser D-DNAs wurden sequenziert. Alle Moleküle enthielten den Replikationsursprung, die Leserahmen für Rep und das Kapsidprotein waren jedoch teilweise oder komplett deletiert.

Auch humane Viren (Hennes-Stegmann und Schroder, 1982; Yuan *et al.*, 1998) und pflanzliche RNA-Viren (Roossinck *et al.*, 1992) können mit defekten Genomkomponenten assoziiert sein. Bei menschlichen Viren wurde in Zellkultur bei gleichzeitiger Replikation von D-DNAs eine Symptomabschwächung beobachtet (HSV-1: Hennes-Stegmann und Schroder, 1982; HBV: Yuan *et al.*, 1998), weshalb auch von defekter interferierender DNA (DI-DNA) gesprochen wurde. Durch die Amplifikation des defekten Moleküls wird vermutlich die Replikation des Elternvirus gehemmt, was schweren Symptomen vorbeugt und damit die weitere Übertragung des Virus sicherstellt. Wahrscheinlich replizieren die kleineren DI-DNAs schneller als das Elternvirus und beanspruchen daher Ressourcen der Amplifikation. Stanley *et al.*

(1990) erkannten das Potential geminiviraler DI-DNAs zur Herstellung resistenter Pflanzen.

Erste Versuche, geminivirale Infektionen in *N. benthamiana* durch DNA-Interferenz zu regulieren, wurden mit einer transgenen D-DNA der B-Komponente von ACMV-[Kenia] durchgeführt (Stanley *et al.*, 1990). Im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen zeigte sich eine Symptomabschwächung, die mit der Mobilisierung und Amplifikation der D-DNA einherging. Dies war sowohl nach Infektion mit dem kenianischen als auch mit dem nigerianischen Isolat zu beobachten, nicht jedoch für Infektion mit TGMV und BCTV. Da die D-DNAs durch das parentale Rep-Protein *in trans* repliziert werden (Stenger *et al.*, 1991), ist dieser Mechanismus auf eng verwandte Viren beschränkt. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Replikation der D-DNA des ACMV mit beiden Genomkomponenten interferiert (Frischmuth und Stanley, 1991). Nachfolgende Untersuchungen zeigten den Erfolg der DNA-Interferenz auch für das Curtovirus BCTV (Frischmuth und Stanley, 1994; Frischmuth *et al.*, 1997a).

Ein Kriterium für den Erfolg der Strategie ist die Länge der transgenen D-DNA. Als geeignet zeigten sich D-DNAs, die etwa die halbe Genomlänge des Elternvirus umfassen (Frischmuth *et al.*, 1997a). Als Vorteil dieser Resistenzstrategie wurde angesehen, dass D-DNAs in separate ikosaederförmige Partikel verpackt werden und daher durch ihren Vektor aufgenommen und auf andere Pflanzen übertragen werden können, wo sie ebenfalls mit der Replikation des Elternvirus interferieren (Casado *et al.*, 2004; Frischmuth *et al.*, 2001).

Die erfolgreichen Experimente in der Modellpflanze *N. benthamiana* gaben den Anstoß, die Strategie der DNA-Interferenz mit einer D-DNA des BCTV von 1271 nts im natürlichen Wirt, der Zuckerrübe, zu untersuchen (Lauster, 2000). Verschiedene transgene und nicht-transgene Linien von *B. vulgaris* var. *altissima* wurden zunächst mittels *Southern blot*-Analyse auf replikative DNA-Formen von Virus und D-DNA untersucht. Anders als es für *N. benthamiana* gezeigt wurde (Frischmuth und Stanley, 1994; Frischmuth *et al.*, 1997a), bestand in der Zuckerrübe kein Zusammenhang zwischen Symptomstärke und DNA-Gehalt. Für Pflanzen mit schweren Symptomen wurden teils hohe D-DNA-Titer gefunden, während einige Zuckerrüben mit milden Symptomen erhöhte Konzentrationen an Virus-DNA aufwiesen. Zusätzlich wurden die Pflanzen durch PCR (*polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion)

analysiert, wobei durch zwei Primerpaare zwischen integriertem und mobilisiertem Transgen unterschieden werden konnte. Die gewonnenen Daten über Transgenität und Transreplikation wurden in Bezug zur Symptomstärke gesetzt. Durch statistische Berechnungen wurde untersucht, ob die Transreplikation in Zusammenhang mit der Symptomausprägung stand. Sowohl durch *Southern blot*- als auch PCR-Analyse konnte jedoch nicht mit Sicherheit gezeigt werden, ob die nachgewiesene D-DNA vom Transgen stammte oder durch Mutation aus dem Elternvirus hervorging. Einige Pflanzen der Linie 84124T erholten sich von der Infektion, was auf DNA-Interferenz zurückgeführt wurde.

2. Diagnostik von Geminiviren

Wie bereits dargestellt (vgl. IV.1.1.4), steht die Entwicklung resistenter Pflanzen zur Eindämmung von geminiviralen Infektionen noch an ihrem Anfang. Daher muss eine Verbreitung innerhalb eines Anbaugebietes als auch zwischen unterschiedlichen geographischen Regionen unterbunden werden. Wie für Pflanzenviren im Allgemeinen (Lopez *et al.*, 2009), müssen auch für den Nachweis von Geminiviren sensitive, spezifische und reproduzierbare Analysemethoden zum Einsatz kommen. Um schnelle Vorgehensweisen im Falle einer Infektion zu gewährleisten, sollten die eingesetzten diagnostischen Methoden zudem Ergebnisse in einer kurzen Zeit liefern.

2.1 Verbreitete Nachweismethoden

Prinzipiell kann der Nachweis von Pathogenen auf Nukleinsäure- oder Proteinebene stattfinden. In der Vergangenheit wurde zur Diagnostik von pflanzenpathogenen Viren auf biologische Indizierung (Einbringen von infektiösem Material in Indikatorpflanzen), Elektrophorese, Elektronenmikroskopie und ELISA-basierte Analysemethoden zurückgegriffen (Lopez *et al.*, 2009). Neuerdings werden zur Detektion im Wesentlichen Methoden zum Nachweis von Nukleinsäuren eingesetzt. Hierzu zählen die molekulare Hybridisierung (*Southern*- und *Northern blot*-Analyse) und die PCR-Diagnostik. Vor allem die PCR bietet einige Vorteile gegenüber den traditionellen Methoden. Die Viren müssen nicht zum Zwecke der Vervielfältigung kultiviert werden, und eine hohe Sensitivität wird erreicht. Zudem ist die Methode schnell, kann vielfältig eingesetzt und nach Bedarf abgewandelt werden.

2.1.1 PCR-basierte Methoden

Zum Nachweis von Viren mit einem ssDNA-Genom (vgl. IV.1) werden zur Zeit vornehmlich PCR-basierte Methoden eingesetzt, wie z.B. quantitative PCR (qPCR) (Vasilyev *et al.*, 2009), SybrGreen[®]-basierte qPCR (Huang *et al.*, 2010) und *nested* PCR (Brassard *et al.*, 2008). Diese Methoden haben den Nachteil, dass die Sequenz des nachzuweisenden Virus zumindest teilweise bekannt sein muss, um spezifische Primer entwerfen zu können.

Nicht nur für den Nachweis unbekannter Geminiviren, sondern auch für die Diagnostik von aus Rekombinationsereignissen resultierenden Varianten kann die Abhängigkeit der PCR-Analyse von spezifischen Primern ungünstig sein. Aufgrund der Genomstruktur von Geminiviren bietet sich hingegen die RCA (*rolling circle amplification*) als Alternativmethode zur PCR-Diagnostik an.

2.1.2 Rolling circle amplification (RCA)

In den letzten Jahren wurde die RCA zunehmend als sensitive Methode zur Detektion von Viren mit zirkulärem ssDNA-Genom beschrieben, darunter human- und zoopathogene torque teno-Viren (Niel *et al.*, 2005) und phytopathogene Nanoviren (Grigoras *et al.*, 2009; Grigoras *et al.*, 2010). Auch zum Nachweis von Geminiviren und endogener zirkulärer DNA, wie mitochondrialer Plasmide, wurde die Methode erfolgreich eingesetzt (Haible *et al.*, 2006; Homs *et al.*, 2008; Jeske, 2007).

Mit Hilfe der mesophilen DNA-Polymerase des Bakteriophagen Φ 29 kann zirkuläre DNA in einer isothermalen Reaktion amplifiziert werden (Fire und Xu, 1995), wodurch die RCA im Gegensatz zur PCR auch ohne Thermocycler durchgeführt werden kann, was vor allem in Entwicklungsländern und bei Analyse vor Ort von Vorteil ist. Das Produkt der Reaktion ist ein aus Sequenzwiederholungen bestehendes DNA-Molekül, da die Φ 29-DNA-Polymerase neben der Polymerasefunktion auch eine Strangverdrängungsaktivität besitzt. Die zusätzliche Verwendung von Hexameren (NNNNNN) als Primer ermöglicht eine 10000-fache Vervielfältigung der Ausgangssequenz (Dean *et al.*, 2001). Ein weiterer Vorteil gegenüber der PCR ist, dass die Virussequenz nicht bekannt sein muss, da alle zirkulären DNAs amplifiziert werden.

Zur Identifizierung der amplifizierten DNA kann das RCA-Produkt durch Restriktions-

endonukleasen fragmentiert werden. Das Fragmentmuster nach Agarose- oder Polyacrylamidgelelektrophorese wird dann zur ersten Eingrenzung der Identität des Virus mit den *in silico*-erstellten Fragmenten aus der Genomdatenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>) abgeglichen (Jeske, 2007). Wie weitere Arbeiten der letzten Jahre zeigten, hat die Kombination aus RCA- und RFLP-Analyse das Potential, eine Standardmethode in der Diagnostik von Geminiviren zu werden, da auch unbekannte Viren, Satelliten und defekte DNAs vervielfältigt werden können (Briddon *et al.*, 2010; Haible *et al.*, 2006; Homs *et al.*, 2008; Jeske *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2008; Paprotka *et al.*, 2010a, 2010b, 2010c, 2010d; Tiwari *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2008; Wyant *et al.*, 2011). Die RCA ermöglicht es weiterhin, schnell und einfach infektiöse Klone zu erhalten, die mittels *Agrobacterium tumefaciens* in Wirtspflanzen eingebracht werden können. Nach partieller Restriktion des RCA-Produktes können Fragmente kloniert werden, die etwas größer sind als ein Monomer (sog. Bitmer) und somit zwei Replikationsursprünge besitzen. Damit kann die virale DNA *in planta* rezirkularisiert und amplifiziert werden. Zudem können die klonierten viralen Genome in einer Standardprozedur mit Einheitsprimern sequenziert werden. Da außerdem Sequenzen mit verschiedenen Startpunkten vorliegen, kann durch deren Assemblierung die Gesamtsequenz ermittelt werden und schrittweises Sequenzieren (*primer walking*) entfällt (Wyant *et al.*, 2011).

Infektiöse Klone können in *A. tumefaciens* transformiert und in eine Vielzahl an mono- und dikotyledonen Pflanzen eingebracht werden (Staley, 2005), da die gramnegativen Bodenbakterien der Gattung *Agrobacterium* (Familie *Rhizobiaceae*) als einzige Organismen in der Lage sind, einen Genaustausch zwischen Mitgliedern verschiedener Reiche durchzuführen (Pitzschke und Hirt, 2010). Dabei initiieren sie die Bildung von Tumoren. *A. tumefaciens* ist zum eigentlichen Tumorwachstum nicht erforderlich (White und Braun, 1941), da die Wirtszellen zu undifferenziertem Zellwachstum umprogrammiert werden. Das Ti-Plasmid virulenter *Agrobacterium*-Stämme kodiert die zur Tumorentstehung erforderlichen Faktoren, darunter T-DNA und *vir*-Region. Die von einer verwundeten Pflanze ausgehenden Signale wie Phenole, Aldosemonosaccharide, niedriger pH-Wert und geringe Phosphatkonzentration (Brencic und Winans, 2005; Palmer *et al.*, 2004) werden durch das membrangebundene VirA erkannt. Daraufhin wird der Transkriptionsfaktor VirG aktiviert, der genau wie VirA konstitutiv exprimiert wird, jedoch in geringen Konzen-

trationen vorliegt. Weitere Produkte der *vir*-Gene vermitteln das Ausschneiden der T-DNA aus dem Ti-Plasmid und deren Transport in die Wirtszelle. Das Ausschneiden des Bereiches erfolgt an den links- und rechtsseitigen Grenzregionen der T-DNA, die aus 25 bp langen Nukleotidwiederholungen bestehen. Einige Vir- und Wirtsproteine lösen den Transport der T-DNA in den Zellkern des Wirts aus, wo Wirtsproteine deren illegitime Integration in das pflanzliche Genom vermitteln. Dadurch ist der Integrationsort variabel, generell werden jedoch transkriptionsaktive Bereiche favorisiert. Da VirD2 kovalent an die T-DNA gebunden ist wurde vermutet, dass auch dieses bakterielle Protein an der Integration beteiligt ist (Pitzschke und Hirt, 2010). Die Genprodukte der T-DNA treiben letztlich in der Wirtszelle die Synthese von Pflanzenhormonen an, welche die Tumorbildung auslösen. Zudem werden Opine gebildet, die als Kohlen- und Stickstoffquelle für *Agrobacterium* dienen.

Da die in der T-Region kodierten Gene im Transferprozess keine Rolle spielen, können sie gegen beliebige DNA-Sequenzen ausgetauscht werden. Bei der Agrobakterinokulation werden *vir*-Region bzw. linke und rechte Grenzregion in getrennte Plasmide eingebracht. Die Grenzregionen werden auf ein binäres Plasmid übertragen, was eine Selektion in *E. coli* und die anschließende Transformation in *A. tumefaciens* ermöglicht. Die geringe Größe der verwendeten Plasmide bietet den Vorteil einer leichteren Handhabung gegenüber dem Ti-Plasmid. Der *A. tumefaciens*-Stamm, der zur Agrobakterinokulation verwendet wird, trägt ein Ti-Plasmid mit den *vir*-Genen, allerdings fehlt ihm die T-DNA. Die Agrobakterinokulation von Zuckerrübe wird seit den 1990er Jahren erfolgreich durchgeführt (Lindsey und Gallois, 1990).

2.2 Microarraytechnologie

Microarrays werden oft als *lab-on-a-chip* Systeme bezeichnet, da sie verschiedene Arbeitsschritte auf einer kleinen Trägeroberfläche verbinden, um eine parallele Analyse verschiedenster Proben zu ermöglichen. Der Begriff Mikrochip wird analog zur Computertechnologie verwendet, da sich ähnlich wie bei einem Computerchip eine hohe Informationsdichte auf kleinstem Raum konzentriert.

Ein wichtiges Feld zur klinischen Anwendung von Mikrochips sind die Diagnose von Infektionskrankheiten und die Kontrolle des Infektionsverlaufes (Mikhailovich *et al.*, 2008). Darunter fällt der Nachweis von human- und zoopathogenen Viren, wobei zu

betonen ist, dass Viren eine extrem hohe Variabilität aufgrund von Mutationen aufweisen (Schneider und Roossinck, 2001). Dadurch können sie sich effizient auf neue Umgebungen anpassen. In der Diagnostik ist dieser Punkt jedoch kritisch, da die Nachweismethoden ständig angepasst werden müssen.

Einige Viren werden bereits standardmäßig mit Hilfe von Mikrochips nachgewiesen. Dazu zählen die humanpathogenen HBV, HIV, Poliovirus, Orthopoxviren und Influenza Viren, wobei letztere beiden auch zoopathogen sind (Mikhailovich *et al.*, 2008). Für phytopathogene Viren sind sowohl Chips entwickelt worden, die Interaktionen zwischen Wirt und Virus auf Expressionsebene darstellen (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008; Catoni *et al.*, 2009), als auch diagnostische Microarrays für verschiedene Kartoffelviren und Tobamoviren (Boonham *et al.*, 2007).

2.2.1 Die Entstehung der Microarraytechnologie

Den größten Einfluss auf die Entwicklung der Mikrochiptechnologie hatten vor allem drei molekularbiologische Methoden: Die *Southern blot*- (Southern, 1975), die PCR-Analyse (Saiki *et al.*, 1988) und eine Methode zur chemischen Synthese von DNA (Minamoto *et al.*, 1976). Die zugrunde liegenden Mechanismen ermöglichten Hochleistungssysteme zur Quantifizierung der Genexpression, wie sie erstmals Mitte der 1990er Jahre beschrieben wurden (Schena *et al.*, 1995). Spezifische Oligonukleotide wurden mit Hilfe eines Roboters auf Glasoberflächen aufgebracht, um die komplementären cDNAs (synthetisiert ausgehend von *A. thaliana*-mRNAs) zu detektieren. Der bedeutende Vorteil zu anderen Methoden wie qPCR und *Northern blot*-Analyse ist im Wesentlichen die Möglichkeit, die Expression vieler Gene parallel zu untersuchen. Aber auch die hohe Dichte und das kleine Format sind von Vorteil, da geringe Probenvolumina eingesetzt werden, was zum einen Kosten einspart und zum anderen den Umgang mit seltenen oder wertvollen Proben vereinfacht. Über die quantitative Bestimmung der Genexpression eines Organismus, eines Organs o.ä. hinaus wurde die differentielle Untersuchung der Genexpression durch den Einsatz von zwei Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht. Beispielhaft kann dadurch die unterschiedliche Transkription in gesunden Zellen und Tumorgewebe dargestellt werden.

2.2.2 Formen von Microarrays

Heutzutage werden Microarrays zur Lösung verschiedenster Fragestellungen eingesetzt. Den unterschiedlichen Mikrochips gemeinsam ist die Immobilisierung eines Biomoleküls auf einer Oberfläche, um ein komplementäres Molekül aus einem Molekülgemisch herauszufischen (Venkatasubbarao, 2004). Das immobilisierte Molekül, das sogenannte Fängermolekül, kann hierbei ein Oligonukleotid (Bahl *et al.*, 2010; Lehner *et al.*, 2005), PCR-Produkt (Diehl *et al.*, 2002), Protein (Fang *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2007), Peptid (Andresen und Bier, 2009; Panicker *et al.*, 2004), Lipid (Kanter *et al.*, 2006; Lahiri *et al.*, 2001) oder Kohlenhydrat (Liu *et al.*, 2009; Song und Pohl, 2009) sein. DNA- und Protein-Microarrays werden dabei am häufigsten verwendet.

Fängermolekül und Oberfläche können auf zwei Arten miteinander verknüpft werden: Durch Immobilisierung eines synthetisierten oder aufgereinigten Moleküls oder mittels Synthese auf der Oberfläche. Sollen die Fängermoleküle immobilisiert werden, können sowohl kovalente als auch nicht-kovalente Bindungsarten Verwendung finden. Die am häufigsten verwendeten kovalenten Bindungstypen sind die Ausbildung einer Schiff'schen Base zwischen Aldehyd- und Aminomodifikation (Lee *et al.*, 2007; Zammattéo *et al.*, 2000) und die Kopplung Amin-modifizierter Liganden an Epoxid-aktivierten Oberflächen (Heise und Bier, 2006). Beispiele für nicht-kovalente Wechselwirkungen sind die Interaktion zwischen Biotin und Streptavidin (Heller *et al.*, 1999) und elektrostatische Anziehung zwischen DNA-Rückgrat und positiv geladenen Oberflächen (Heise und Bier, 2006). Bei der photolithographischen Synthese des Fängermoleküls auf der Oberfläche tragen die einzelnen Bausteine, wie Nukleotide (Beier und Hoheisel, 2000) oder Aminosäuren (Shin *et al.*, 2010) eine UV-sensitive Schutzgruppe. In der überwiegenden Zahl der Experimente werden durch Auflegen einer Maske und UV-Bestrahlung die Schutzgruppen ausgewählter Bausteine entfernt und diese aktiviert. So kann schließlich kontrolliert und örtlich begrenzt eine bestimmte Sequenz aufgebaut werden (Venkatasubbarao, 2004).

Während zu Beginn der Microarraytechnologie planare Oberflächen wie Membranen aus Nitrocellulose oder Nylon und auch Glas verwendet wurden (Khan *et al.*, 1999; Ramsay, 1998; Watson *et al.*, 1998), ist heute eine Vielzahl an polymeren, anorganischen und organisch/biologischen Substraten unterschiedlichster Form wie Poly-

styren, Gold, Latex und Chitosan (Heise und Bier, 2006) in Gebrauch. Zwar finden die planaren Substrate auch heute noch vorwiegend Anwendung, werden aber immer mehr von anderen Strukturen verdrängt, die durchaus ihre Vorteile besitzen. Hierzu zählen z.B. sphärische Partikel im Mikro- und Nanometer Bereich (Deregt *et al.*, 2006; Hatch *et al.*, 1999; Hsu und Huang, 2004), Biegebalken (*cantilever*) (McKendry *et al.*, 2002) oder fibrilläre Strukturen wie Glasfasern und Nanodrähte (He *et al.*, 2008). Aber auch PCR-Reaktionsgefäße wurden eingesetzt (Liu *et al.*, 2007).

Bei DNA-Microarrays können zwei Anwendungsgebiete unterschieden werden: Die Expressionsanalyse und die Detektion von DNA-Varianten, wie Mutationen und Polymorphismen. Letztgenannte Variante umfasst dabei die Untersuchung von Verwandtschaftsbeziehungen, forensische Identifizierung, Pathogendetektion und -bestimmung, Sequenzanalyse und Detektion von Punktmutationen (McKenzie *et al.*, 1998).

Zur Signaldetektion werden meist Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Diese können wie schon bei den ersten cDNA-Arrays (Schna *et al.*, 1996) vor der Hybridisierung in die Probe eingebaut oder in Form von Sonden eingesetzt werden (Stears *et al.*, 2000). Aber auch Enzyme (Li *et al.*, 2010) oder Nanopartikel (Mossoba *et al.*, 2010) finden Verwendung. Im ersteren Fall wird der Ort der enzymatischen Reaktion bestimmt, im zweiten Fall die Lokalisation des Partikels. Markierungsfreie Methoden sind *cantilever*-basierte Microarrays (Biegebalken, z.B. Siliziumplättchen), deren Auslenkung nach Bindung des spezifischen Interaktionspartners optisch gemessen wird (McKendry *et al.*, 2002) und der Nachweis der DNA- oder RNA-Hybridisierung durch Änderung der elektrostatischen Eigenschaften des Trägermaterials (Clack *et al.*, 2008).

2.2.3 Nutzen der Microarraytechnologie für die Geminivirus-Diagnostik

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurden wenige diagnostische Microarrays für Pflanzenviren entwickelt (vgl. IV.2.2, Boonham *et al.*, 2007). Für Geminiviren wurden Mikrochips zur Transkriptom-Analyse von AC2-exprimierenden (MYMV und ACMV) *A. thaliana*-Protoplasten (Trinks *et al.*, 2005) und CaLCuV-infizierten *A. thaliana*-Pflanzen (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008), nicht jedoch zum Nachweis von Geminiviren in Pflanzenmaterial eingesetzt. Dabei hätte die Verwendung von Mikrochips gerade

auf diesem Gebiet viele Vorteile gegenüber den bisherigen Nachweismethoden (vgl. IV.2.1). Die stetig wachsende Zahl an Publikationen über neue Geminiviren aus Beikräutern und Nutzpflanzen zeigt deren hohe Variabilität weltweit. Für diagnostische Labore ist es von Interesse, einerseits die Vielfalt der Sequenzen zu berücksichtigen und andererseits den Arbeitsaufwand so gering wie möglich zu halten, um schnelle Ergebnisse erhalten zu können. Auf der Trägeroberfläche eines Microarrays könnte zur parallelen Analyse ein reiches Spektrum an geminiviralen Erkennungssequenzen auf minimalem Raum untergebracht werden. Zudem entfallen Klonierung und Sequenzierung, was den Anforderungen an ein schnelles und sensitives Nachweissystem gerecht wird. Auch Mischinfektionen oder Rekombinationen könnten durch mehrfache Signale auf der Chipoberfläche sofort detektiert werden.

Für den Nachweis von Geminiviren wäre eine Kombination zweier Methoden denkbar. Zum einen die Microarraytechnologie mit ihrer hohen Informationsdichte und zum anderen die RCA, da sich diese Methode aufgrund der Genomstruktur zur Signalverstärkung anbietet. Es konnte bereits auf Trägeroberflächen gezeigt werden, dass durch RCA und Verwendung von modifizierten Nukleotiden eine direkte Markierung des Produktes möglich ist (Nallur *et al.*, 2001; Smolina *et al.*, 2005). Andererseits ist auch eine nachträgliche Anfärbung des oberflächenassoziierten RCA-Produktes denkbar.

3. Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit

Da BCTV ein sehr aggressives Geminivirus ist, und gegenwärtig lediglich strikte Quarantänemaßnahmen die Ausbreitung einschränken sollen, ist es von großem Interesse, durch gentechnische Ansätze resistente Zuckerrüben herzustellen oder schnelle Diagnostikverfahren zu entwickeln, um die Ausbreitung einzudämmen.

Wie sich bereits in *N. benthamiana* zeigte, kann eine D-DNA (D_0 -DNA), die als Transgen in das Pflanzengenom eingebracht wurde, die Replikation des Elternvirus durch DNA-Interferenz eindämmen (Frischmuth und Stanley, 1994). Diese Strategie sollte auf die Zuckerrübe übertragen werden, wobei die Replikation des Transgens und des Elternvirus mittels *Southern blot*- und PCR-Analyse untersucht wurden (Lauster, 2000). Die Experimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit griffen diese Experimente erneut auf, und die Replikation von Virus und defekten DNAs in trans-

genen und nicht-transgenen Zuckerrübenlinien sollte durch RCA/RFLP-Analyse untersucht werden. Mittels statistischer Auswertung sollte ein eventueller Zusammenhang zwischen Replikation von Elternvirus und Transgen und der Symptomausprägung beurteilt werden.

Für einige Begomo-, Curto- und Mastreviren ist die spontane Bildung defekter DNAs bekannt (Patil und Dasgupta, 2006). Auch im Infektionsverlauf der getesteten Zuckerrübenlinien bildeten sich spontan neue D-DNAs (D_n -DNAs). Eine Auswahl dieser Moleküle sollte sequenziert und charakterisiert werden. Zum einen wurde erhofft, interessante Einblicke in die molekularen Ursprünge der D_n -DNAs, die Populationsdynamik und Interaktion mit dem Elternvirus zu erhalten. Zum anderen sollten mögliche alternative Kandidaten für weitere Resistenzforschungen identifiziert werden.

Um ein Mikrochipssystem für Geminiviren zu etablieren, wurden zur Unterscheidung der viralen und transreplizierten D_0 -DNA aus den infizierten transgenen Zuckerrüben spezifische Primer auf geeigneten Oberflächen immobilisiert. Zur Signalverstärkung sollte die RCA nach Hybridisierung der viralen DNA direkt auf der Oberfläche durchgeführt und unterschiedliche Nachweismethoden für das RCA-Produkt getestet werden. Ein ähnlicher Versuchsaufbau mit einer Auswahl an weiteren Primern diene der Unterscheidung verschiedener Geminiviren, um langfristig ein *lab-on-a-chip*-System für die Diagnostik von Geminiviren entwickeln zu können.

Zudem wurde experimentell untersucht, ob alternativ zu dem standardmäßig verwendeten RCA-Kit eine Amplifikation von Geminiviren durch $\Phi 29$ -DNA-Polymerase ohne Primer möglich ist. Als Matrizen sollten replikative Intermediate in Gesamtnukleinsäuren infizierter Pflanzen dienen. Zum einen sollten diejenigen Intermediate identifiziert werden, deren molekulare Struktur einen Angriffspunkt für eine Amplifikation durch die Polymerase darstellt. Andererseits wurde angestrebt, die Reaktionsausbeute für anwendungsbezogene Zwecke zu erhöhen.

V Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien

Alle Lösungen, Puffer und Medien wurden in H₂O_{dd.} angesetzt und für 20 min bei 120 °C autoklaviert, sofern nicht anders angegeben. Die Zusammensetzung ist im Methodenteil (s. V.2) zusammen mit dem jeweiligen Versuchsprotokoll angegeben.

1.2 Software/Programme

Tabelle 2: Verwendete Programme.

Bezeichnung	Hersteller
BLAST Basic Local Alignment Search Tool	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
Corel Draw® 9.337	Eastman Kodak Company
dBioedit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0	Tom Hall (Hall, 1999)
FastPCR Professional 5.4.4 und 6.1.10 beta 3	Ruslan Kalendar „PrimerDigital Ltd“
ImageJ 1.42q	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA; http://rsb.info.nih.gov/ij
Microsoft® Excel 2002	Microsoft®
Microsoft® Power Point 2002	
Microsoft® Word 2002	
NEBcutter V2.0	New England Biolabs (Vincze <i>et al.</i> , 2003)
NMT - The MYR Predictor	http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm (Maurer-Stroh <i>et al.</i> , 2002)
Nucleic Acids Dot Plots	http://www.vivo.colostate.edu/molkit/dnadot/
PLACE: A database of plant cis-acting regulatory DNA elements	http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html (Higo <i>et al.</i> , 1999; Prestridge, 1991)
Plant-Specific Myristoylation Predictor	http://plantsp.genomics.purdue.edu/plantsp/html/myrist.html (Podell und Gribskov, 2004)
SigmaStat®3.1	Systat (Erkrath, Deutschland)
WatCut: An on-line tool for restriction analysis, silent mutation scanning, and SNP-RFLP analysis	Michael Palmer (Palmer, 2007)

1.3 Pflanzenmaterial

Für die Experimente wurden F₁-Linien der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* var. *altissima*) verwendet. Neben transgenen Linien wurden die konventionellen Zuchtlinien 2R7629, 7B0091 (sensitiv) und 9K9010 (tolerant) eingesetzt (vgl. Tabelle 3). Die Linien wurden von Planta/KWS wie folgt hergestellt: pBin19 wurde in *A. tumefaciens* C58C1 mit dem residenten Plasmid pGV2260 eingebracht (An, 1985). Rekombinante Klone wurden durch Kanamycin (50 mg/ml) selektiert. Zuckerrüben wurden nach Lindsey und Gallois (1990) unter Kanamycinselektion transformiert. Die Integration des Transgens in Einzelpflanzen wurde durch eine PCR-Analyse mit 0,2 µM der Primer 5'-GTGGAGAGGCTATTCGGTA-3' und 5'-CCACCATGATATTCGGCAAG-3' und 10 ng genomischer DNA bei einer Annealingtemperatur von 55 °C in einem Multi-Cycler PTC-200 (MJ Research, Watertown, USA) untersucht. Dabei wurde ein Fragment von 553 bp des *npflI*-Gens amplifiziert.

Tabelle 3: Untersuchte F₁-Linien.

Linie ¹	Abstammung	Kreuzung	Kommentar
2R 7629	Konventionelle		sensitiv
7B0091	Zuchtlinien, nicht-	A-STD_D106	sensitiv
9K9010	transgen	R-STD_KA03	tolerant
05-004K	Hybrid	S1-DH-207-001-D106 * VC3-6	transgen
05-018K	Hybrid	S1-DH-207-001-D106 * VC3-6	transgen
05-026T	Selbstung	S1-VC3-2	transgen
05-032T	Selbstung	S1-VC4-1	transgen
05-154T	Hybrid	S1-DH-406-001-R12 * VC3-8	transgen
05-157T	Hybrid	S1-DH-406-001-R12 * VC3-8	transgen
84101T	Hybrid	S1-(R13) * (VC3-3)	transgen
84104T	Hybrid	S1-(R13) * (VC3-6)	transgen
84107K	Hybrid	S1-(D106) * (VC3-6)	transgen
84111K	Hybrid	S1-(D106) * (VC3-6)	transgen
84118T	Hybrid	S1-(R12) * (VC3-8)	transgen
84124T	Hybrid	S1-(R13) * (VC3-8)	transgen
84137T	Hybrid	S1-(R20) * (VC14-1)	transgen
84142T	Hybrid	S1-(R13) * (VC14-2)	transgen
84147T	Hybrid	S1-(R13) * (VC14-2)	transgen
84151T	Hybrid	S1-(R20) * (VC14-2)	transgen
84164T	Hybrid	S1-(R13) * (VC14-3)	transgen

¹: interne Bezeichnung der Firma Planta. *: gibt die Kreuzung an.

1.4 Plasmide und Vektoren

Tabelle 4: In den Experimenten verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Länge [kb]	Eigenschaften	Quelle
pUC19*	2,7	<i>E. coli</i> Klonierungs- und Expressionsvektor, lacZ α , MCS, Amp ^R	GE Healthcare
pGEM [®] -T Easy*	3,0	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, lacZ α , SP6 und T7 Promotoren, f1-Replikationsursprung, MCS, Amp ^R	Promega
pBluescript II KS(+)*	3,0	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, MCS, Amp ^R , pUC- und f1-Replikationsursprung, lacZ α , lac-Promotor	Stratagene
pAbA1.0	5,6	AbMV DNA A als Monomer in pBluescript II KS(+)	(Frischmuth <i>et al.</i> , 1990)

*: Die Vektorkarten sind im Anhang (s. IX.1) dargestellt.

Tabelle 5: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.

Bezeichnung	Länge [kb]	Integriertes Fragment
pGEM-JH-D ₀	4,3	D ₀ -DNA von BCTV (transrepliziertes Transgen aus Zuckerrübe)
pGEM-JH-D-2	4,7	D _n -DNA von BCTV aus Pflanze #2
pGEM-JH-D-8a	5,6	D _n -DNA von BCTV aus Pflanze #8
pGEM-JH-D-8b	4,7	
pGEM-JH-D-8c	4,6	
pGEM-JH-D-8d	4,6	
pGEM-JH-D-8e	4,4	
pGEM-JH-D-9a	5,8	D _n -DNA von BCTV aus Pflanze #9
pGEM-JH-D-9b	5,6	
pGEM-JH-D-9c	5,2	
pGEM-JH-D-9d	4,8	
pGEM-JH-D-9e	4,7	
pGEM-JH-D-9f	4,6	
pGEM-JH-D-11	4,6	D _n -DNA von BCTV aus Pflanze #11
pGEM-JH-D-17a	5,8	D _n -DNA von BCTV aus Pflanze #17
pGEM-JH-D-17b	5,5	
pGEM-JH-D-17c.1	4,6	
pGEM-JH-D-17c.2	4,6	
pGEM-JH-D-17d	4,5	
pGEM-JH-D-17e	4,3	
pGEM-JH-D-17f	4,3	

Die D_n-DNAs wurden durch *SalI* linearisiert und in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert. Nach Selektion in *E. coli* fand die Sequenzierung statt. Die Plasmide sind durch D für defekte DNA, die laufende Nummer der Quellpflanze (2, 8, 9, 11 und 17, vgl. Tabelle 20) und einen Buchstaben gekennzeichnet. Letzterer dient der Unterscheidung mehrerer D_n-DNAs aus einer Pflanze, wobei mit „a“ die größte D_n-DNA bezeichnet wird.

1.5 Organismen

Tabelle 6: In den Experimenten eingesetzte Organismen.

Bezeichnung	Genotyp/Phänotyp	Quelle
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG, Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK ⁺), λ -	Gibco (jetzt Invitrogen), DSM Nr. 6897 (Hanahan, 1985)
<i>A. tumefaciens</i> PGV mit BCTVpBin1.2	Klon von BCTV-A[US:Cal:85] in pBin19, der in <i>A. tumefaciens</i> PGV transformiert wurde	(Briddon <i>et al.</i> , 1989)

Tabelle 7: In den Experimenten erzeugte Stämme. Die Klone gehen auf *E. coli* DH5 α zurück, das mit den erzeugten Plasmiden (s. Tabelle 5) transformiert wurde.

Bezeichnung	transformiertes Plasmid
<i>E. coli</i> DH5 α [D ₀]	pGEM-JH-D ₀
<i>E. coli</i> DH5 α [D-2]	pGEM-JH-D-2
<i>E. coli</i> DH5 α [D-8a]	pGEM-JH-D-8a
<i>E. coli</i> DH5 α [D-8b]	pGEM-JH-D-8b
<i>E. coli</i> DH5 α [D-8c]	pGEM-JH-D-8c
<i>E. coli</i> DH5 α [D-8d]	pGEM-JH-D-8d
<i>E. coli</i> DH5 α [D-8e]	pGEM-JH-D-8e
<i>E. coli</i> DH5 α [D-9a]	pGEM-JH-D-9a
<i>E. coli</i> DH5 α [D-9b]	pGEM-JH-D-9b
<i>E. coli</i> DH5 α [D-9c]	pGEM-JH-D-9c
<i>E. coli</i> DH5 α [D-9d]	pGEM-JH-D-9d
<i>E. coli</i> DH5 α [D-9e]	pGEM-JH-D-9e
<i>E. coli</i> DH5 α [D-9f]	pGEM-JH-D-9f
<i>E. coli</i> DH5 α [D-11]	pGEM-JH-D-11
<i>E. coli</i> DH5 α [D-17a]	pGEM-JH-D-17a
<i>E. coli</i> DH5 α [D-17b]	pGEM-JH-D-17b
<i>E. coli</i> DH5 α [D-17c.1]	pGEM-JH-D-17c.1
<i>E. coli</i> DH5 α [D-17c.2]	pGEM-JH-D-17c.2
<i>E. coli</i> DH5 α [D-17d]	pGEM-JH-D-17d
<i>E. coli</i> DH5 α [D-17e]	pGEM-JH-D-17e
<i>E. coli</i> DH5 α [D-17f]	pGEM-JH-D-17f

1.6 Oligonukleotide

Tabelle 8: In den Experimenten eingesetzte Oligonukleotide. Die Oligonukleotide wurden mit den angegebenen Modifikationen von Metabion (metabion international AG, Martinsried) und der Hexanukleotid-Random-Primer-Mix von Roth (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bezogen.

Name	Sequenz (5'→3') (mit Genomposition)	T _m [°C]
Sequenzierung von D_n-DNAs (Standardsequenzierprimer)		
M13F(-20)	GTAAAACGACGGCCAGT	52,9
M13R	GGAAACAGCTATGACCATG	60
M13R(-20)	GCGGATAACAATTTTCACACAGG	53
Sequenzierung von D_n-DNAs (primer walking)		
Del1_F1	TTTCAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAA (265-237)	63
Del1_F2	ATATATTAGTACAACCTTTCATAAGGGCCATC (60-90)	66
Del1_F3	ACTTCCTGAAGAAGATTCCTG (191-211)	57
Del1_F4	GCAGTATCGACCAGTTGTTTCTT (528-550)	61
Del1_F5	CGTTACTGTGACGAAGCATTGGAAG (966-990)	64
Del1_R1	ATCCGTATTATCATTAAACAACAACATAGAGTAAAGCA (1407-1371)	69
Del1_R2	TTCACAATACACCATGAATGTAATAGAGGATTTTC (1909-1875)	68
Del1_R3 ¹	CCAGCACCCCAACATATCATCATAC (875-852)	66
Del2_F	ACACTTGATACAAAAGTAAATTCATACAGGACAT (1523-1559)	69
Del2_R	TCCTGAGGAAATGCAAGAATG (2418-2398)	57
Del2_R2	ATGTAATAGAGGATTTTCGCACAGG (1892-1868)	63
Del3_F	TGACCTCCTCTAGCACTTCTA (2614-2634)	62
Del3_R	TAGATATGTTAATATGCTAAGCCACGTCATC (39-9)	67
BCTV6	TTATCTTCAGTATTCTACTGC (438-458)	54
JH_17a_Primer1 ¹	TGGGGTCAGTGTTCCTACT (1079-1098)	58
JH_17a_Primer2	GGCATTGAAGGAGCCTTGT (1271-1253)	57
JH_17a_Primer3	GTTTCATTGCAACACTCTGGTTCTG (1495-1518)	64
JH_17a_Primer4 ¹	GCCCTAGAACGTATTATGATG (2251-2230)	58
Entwicklung eines Microarrays zur Detektion geminiviraler DNA²		
JH_CRpositiv (Positivkontrolle) ₃	5'-NH ₂ -TTTTTTTTTTTGTAAATATTA (invariante Sequenz)	40
AMbindTMV6245HH2 (Negativkontrolle; TMV-spezifisch, Dr. Anna Müller)	5'-NH ₂ -GCACCACGTGTGATTACGGACACAATCCG	69,5
AbMV-Amino-JH	5'-NH ₂ -TTTTTTTTTTTCAGGCAGGCCAAGAGGAGGGCC (1597-1576)	77
JH_ACMV-Nig	5'-NH ₂ -TTTTTTTTTTTATCACCAGGCACCAACAACGA (1535-1515)	66,7
JH_BCTV	5'-NH ₂ -TTTTTTTTTTTCGTACATACCCAACAGTCCCCTTC (74-49)	72
JH_CaLCuV	5'-NH ₂ -TTTTTTTTTTTCGCAATTATAAGGGCTGGAGAT (2182-2161)	64,9
JH_CLCrV	5'-NH ₂ -TTTTTTTTTTTCGGGTATGGAGTCCATGGTGGG (2611-2589)	69,4
JH_SiGMCRV	5'-NH ₂ -TTTTTTTTTTTCGTTGAGTGGTGGGAGTTTC (2287-2268)	64,6
JH_SiYVv	5'-NH ₂ -TTTTTTTTTTTGGGACGCCGGGCGTCTTT (514-496)	71,4
JH_TGMVyv	5'-NH ₂ -TTTTTTTTTTTTCGGGGACCAGTACGACGACA (211-192)	67
anti-CR ³	5'-NH ₂ -TAATATTAC	20
BCTV_FL	5'-Biotin-CGGTTTCTTGTAAATTTGGCATTGAAGGAGCCTT (1138-1106)	73
BCTV_FL_D ₀	5'-Biotin-AAGCCACGTCATCGGAGTACAATGCCTCC (2912-2884)	73
AbMV_RecA	5'-Biotin-GTTCAAATTATATTGACTCGTCAGGCGCATTATTATTGGACGAGGCGCCATGGACTACC (132-74)	85
Hexanukleotid-Mix	NNNNNN	n.d.
Spezielle RCA-Protokolle		
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	47,7

¹ Diese Primer wurden von D_n-DNAs abgeleitet und unterscheiden sich an den grau unterlegten Positionen von BCTV.

² Die Schmelztemperaturen der Primer mit 11T-Spacer beziehen den Spacer mit ein.

³ Der Primer „JH_CRpositiv“ sollte das Nonanukleotid geminiviraler DNA binden. Zum Nachweis der erfolgreichen Oberflächenimmobilisierung dieses Primers wurde das Oligonukleotid „anti-CR“ eingesetzt.

1.7 Enzyme

Tabelle 9: Verwendete Restriktionsendonukleasen (NEB, Frankfurt/Main).

Enzym	Schnittstelle (5' → 3')	Art der entstandenen Enden
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	5'-Überhang
<i>HpaII</i>	C↓CGG	5'-Überhang
<i>Nb.BbvCI</i>	3'-GGAGT↓CG-5'	nur ein Strang von dsDNA wird geschnitten
<i>NcoI</i> -HF	C↓CATGG	5'-Überhang
<i>PstI</i>	CTGCA↓G	3'-Überhang
<i>SalI</i> -HF	G↓TCGAC	5'-Überhang
<i>SspI</i>	AAT↓ATT	stumpfes Ende

Die Pfeile zeigen die Schnittstellen an. Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben verwendet (s. auch V.2.5.2). HF-Enzyme haben ihre Sternaktivität durch genetische Optimierungen verloren.

Tabelle 10: Sonstige Enzyme.

Enzym	Hersteller	Beschreibung
RNase A	Roche	Entfernung von ssRNA-Strängen
RNase H	NEB	Entfernung von RNA-Strängen aus DNA/RNA-Hybriden
Klenow-Fragment (3'→5' exo-)	NEB	Auffüllreaktionen
Exonuklease III	GibcoBRI	3'→5' gerichtete Entfernung von unmodifizierten Mononukleotiden von dsDNA, RNase H-Funktion
T7-Exonuklease	NEB	5'→3' gerichtete Entfernung von unmodifizierten Mononukleotiden, RNase H-Funktion
Φ29-DNA-Polymerase	NEB	Polymerase mit starker Strangverdrängungsaktivität
Anorganische Pyrophosphatase aus Hefe	NEB	Katalysiert die Hydrolyse von anorganischem Pyrophosphat zu Orthophosphat (s. Abbildung 30)
RecA	NEB	In Gegenwart von ATP vermittelt RecA den Strangaustausch einer ssDNA in eine dsDNA
Taq DNA-Polymerase	Qiagen	Polymerase für Standard-PCR

1.8 Kits

Tabelle 11: Verwendete Kits.

Bezeichnung	Hersteller	Verwendungszweck
illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare	Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen und enzymatischen Reaktionen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen	
illustra TempliPhi™ Kit	GE Healthcare	Amplifikation von zirkulärer DNA
CEQ-DTCS Quick start sequencing kit	Beckman-Coulter, Krefeld	Sequenzierung
DIG-High Prime	Roche	Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden für die <i>Southern blot</i> -Analyse

2. Methoden

2.1 Inokulation von Pflanzenmaterial

Die Pflanzen wurden nach Briddon *et al.* (1989) durch Agroinokulation infiziert (Gardner und Knauf, 1986; Grimsley *et al.*, 1986a; Grimsley *et al.*, 1986b; Rogers *et al.*, 1986). Die Inokulation fand im Vier-Blatt-Stadium statt. Hierzu wurde ein Bitmerklon von BCTV-A[US:Cal:85] (Zugangsnummer: M24597) in pBin19 verwendet (pBin1.2, Briddon *et al.*, 1989), der in *A. tumefaciens* PGV vorlag. Mit Hilfe einer Impföse wurden Agrobakterien aus einer Glycerinkultur auf LB_{Rif/Kan}-Platten ausgestrichen und für drei Tage bei 28 °C inkubiert. Die Bakterien wurden in 500 µl sterilem H₂O resuspendiert und je 10 µl dieser Suspension auf die Blattachsel jeder Pflanze gegeben. Mit Hilfe einer Insektenpräparationsnadel wurde mehrfach durch den Tropfen hindurch gestochen, um eine Verwundung auszulösen und das Eindringen der Bakterien zu ermöglichen. Kontrollpflanzen wurden in Abwesenheit des Inokulums angestochen.

Puffer und Lösungen:

LB-Medium (1 l, pH 7,0)	10 g Bacto-Trypton
	5 g Hefe-Extrakt
	10 g NaCl

Für LB-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar beigefügt. Vor dem Gießen der Platten wurden Kanamycin und Rifampicin zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben.

2.2 Pflanzenanzucht

Die Pflanzen wurden in einem insektenfreien Gewächshaus mit Zusatzbeleuchtung ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bei einer 16-stündigen Lichtperiode bei 24 °C und einer nächtlichen Reduktion auf 18 °C gehalten (Langtag). Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 63 %. Die Pflanzen wurden unter S2-Sicherheitsbedingungen mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Stuttgart (für Quarantäne-Regelungen) und Tübingen (für gentechnische Arbeiten) gehalten. In wöchentlichen Abständen fand eine Protokollierung der Symptome der Einzelpflanzen statt. Nach 21, 42 und 91 Tagen wurden Blattproben zur Nukleinsäure-Analyse entnommen.

2.3 Isolierung der Gesamtnukleinsäuren aus Pflanzenmaterial

2.3.1 CTAB-basierte Extraktion

Gesamtnukleinsäuren wurden mit einer abgewandelten CTAB-Methode (Haible *et al.*, 2006; Permingeat und Romagnoli, 1998) aus 10-50 mg Blattgewebe des zweit- oder dritjtüngsten Blatt isoliert. Mit Hilfe von 2 ml-Reaktionsgefäßen wurden Blattscheiben ausgestantzt, in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 500 µl Extraktionspuffer für 60 min bei 60 °C unter Schütteln (1000 rpm) inkubiert. Nach Zugabe von 1x Vol. CI erfolgte eine Inkubation für 5 min bei RT (Raumtemperatur) und 1000 rpm. Nach Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm bei 4 °C wurde der Überstand entnommen und mit 0,8x Vol. Isopropanol versetzt. Die Fällung der DNA fand durch Inkubation bei RT für 10 min und Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C statt. Der Niederschlag wurde zweimal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (5 min, RT, 14000 rpm) und nach dem Trocknen in 50 µl H₂O gelöst.

Puffer und Lösungen:

CTAB-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8,0
	20 mM Na-EDTA pH 8,0
	1,4 M NaCl
	<u>0,5 M Glukose</u>
	2 % w/v CTAB

Der Extraktionspuffer wurde für 15 min bei 120 °C autoklaviert. Nach Zugabe des CTAB wurde der Puffer bis zur Lösung bei 60 °C inkubiert.

CI (24:1)	Chloroform und Isoamylalkohol wurden zu gleichen Teilen gemischt.
-----------	-------------------------------------------------------------------

2.3.2 Phenol/Chloroform-basierte Extraktion

10-50 mg Blattgewebe aus dem zweit- oder dritjtüngsten Blatt wurden mit Hilfe eines 2 ml-Reaktionsgefäßes ausgestantzt. Die Blattscheiben wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert, das Pulver mit 500 µl NSE-Puffer und 500 µl PCI überschichtet und der Ansatz für 30 min bei RT unter Schütteln (1000 rpm) inkubiert. Der wässrige Überstand nach Zentrifugation für 5 min bei RT (14000 rpm) wurde mit 500 µl PCI versetzt. Nach Schütteln für 5 min bei RT (1000 rpm) und Zentrifugation für 5 min bei RT (14000 rpm) wurde der wässrige Überstand mit 500 µl CI gemischt. Nach weiterer Inkubation für 5 min bei RT (1000 rpm) wurden durch Zentrifugation bei 5 min und RT (14000 rpm) die wässrige und organische Phase getrennt. Die wässrige Phase

wurde zur Fällung der DNA mit 1/10x Vol. Na-Acetat (3 M, pH 5,0) und 2x Vol. 100 % Ethanol versetzt und durch Invertieren gemischt. Nach Zentrifugation für 15 min bei RT (14000 rpm) wurde der Niederschlag dreimalig mit jeweils 400 µl 70 % Ethanol gewaschen (5 min, RT, 14000 rpm), getrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen.

Puffer und Lösungen:

NSE-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 7,0 100 mM NaCl 1 mM Na-EDTA 1 % SDS 100 mM DTT
PCI (25:24:1)	250 ml Chloroform/Isoamylalkohol 250 ml Trispuffer-gesättigtes Phenol

Die Phasentrennung des PCI fand über Nacht statt.

2.4 Amplifikation viraler DNA

2.4.1 PCR zum Nachweis des Transgens

Um die im Pflanzengenom integrierte D₀-DNA nachzuweisen, wurde eine PCR mit den M13-Standardprimern (s. Tabelle 8) und der Taq DNA-Polymerase (vgl. Tabelle 10) auf Gesamtnukleinsäuren einer infizierten Pflanze (s. V.2.3.1) durchgeführt.

Gesamtnukleinsäuren	150-200 ng
Taq PCR-Reaktionspuffer (10x)	5,0 µl
dNTPs (je 0,25 mM)	5,0 µl
Primer M13F(-20) (10 µM)	2,0 µl
Primer M13R(-20) (10 µM)	2,0 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 12: PCR-Programm zum Nachweis des Transgens. Die Schritte 4-6 wurden 30-mal wiederholt. Das Programm wurde nach Lauster (2000) abgewandelt.

	PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1.	Denaturierung	95	300
2.	Annealing	58	30
3.	Elongation	72	120
4.	Denaturierung	95	60
5.	Annealing	58	45
6.	Elongation	72	120
7.	Denaturierung	95	60
8.	Annealing	58	30
9.	finale Elongation	72	600
10.	Abkühlung	4	-

2.4.2 Standard-RCA-Protokoll (GE Healthcare Kit)

Zirkuläre DNA wurde mittels *rolling circle amplification* (RCA) vervielfältigt. In den Experimenten wurde das illustra TempliPhi™ Kit (GE Healthcare) gemäß Herstellerangaben verwendet. Zur Amplifikation wurden Gesamtnukleinsäuren aus systemisch infizierten Blättern (50 bis 100 ng; s. V.2.3.1) in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug mindestens 16 h bei 30 °C, danach wurde die Reaktion für 10 min bei 65 °C gestoppt.

2.4.3 Spezielle RCA-Protokolle (NEB Polymerase)

Im Vergleich zum Standard-RCA-Kit, dessen Zusammensetzung vom Hersteller nicht bekannt gegeben wird, wurde für die Markierung der DNA Produkte die Φ29-DNA-Polymerase eines anderen Herstellers (NEB) in verschiedenen Versuchsansätzen getestet.

Für die Markierung mit Biotin oder Cy3 wurde Plasmid-DNA für 5 min bei 95 °C denaturiert, in Aliquots bei -20 °C gelagert, zur weiteren Verwendung auf Eis aufgetaut und ohne weiteren Anlagerungsschritt für die Primer in die jeweiligen RCA Reaktions-Mischungen gegeben. Die Inkubationsdauer der RCA betrug 16 h bei 30 °C. Für die Markierungsreaktionen in Lösung wurden das *E. coli* Plasmid pAbA1.0 (s. Tabelle 4) und die Nukleotide Cy3-AP3-dUTP und Biotin-16-dUTP in nachfolgend aufgeführten Mischungen verwendet. Bovines Serumalbumin (BSA) wurde von NEB, Biotin-16-2'-Desoxyuridin-5'-Triphosphat (im Folgenden als Biotin-16-dUTP bezeichnet) von Roche Diagnostics und Cy3-AP3-dUTP von GE Healthcare bezogen.

Direkte Markierung mit Cy3

BSA (1 mg/ml)	0,2 µl
DNA (pAbA1.0, s. Tabelle 4)	2,0 µl (1,3 µg)
T7-Primer (1 µM, s. Tabelle 8)	1,3 µl
10x dNTP-Mix (je 1 mM dATP, dCTP und dGTP ohne oder mit 1 mM dTTP)	2,0 µl
Cy3-AP3-dUTP (1 mM, GE Healthcare)	2,0 µl
Φ29-DNA-Polymerase (NEB)	0,5 µl (5 U)
Φ29 Reaktionspuffer (10x, NEB)	2,0 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Cy3 wurde auf dem DarkReader[®] (Clare Chemical Research, Dolores, Colorado/USA) bei 400 bis 500 nm nachgewiesen. Während der gesamten Reaktionszeit wurden die Proben vor Lichteinstrahlung geschützt.

Direkte Markierung mit Biotin

Reaktion 1 (35 % Biotin-16-dUTP, 65 % dTTP):

BSA (1 mg/ml)	0,2 µl
DNA (pAbA1.0, s. Tabelle 4)	2,0 µl (1,3 µg)
T7-Primer (1 µM, s. Tabelle 8)	1,3 µl
10x Biotin-dNTP-Mix (je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,65 mM dTTP und 0,35 % Biotin-16-dUTP)	2,0 µl
Φ29-DNA-Polymerase (NEB)	0,5 µl (5 U)
Φ29 Reaktionspuffer (10x, NEB)	2,0 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Reaktion 2 (100 % Biotin-16-dUTP):

BSA (1 mg/ml)	0,2 µl
DNA	2,0 µl (1,3 µg)
T7-Primer (1 µM, s. Tabelle 8)	1,3 µl
10x dNTP-Mix (je 1 mM dATP, dCTP, dGTP ohne oder mit 1 mM dTTP)	2,0 µl
Biotin-16-dUTP (1 mM)	2,0 µl
Φ29-DNA-Polymerase (NEB)	0,5 µl (5 U)
Φ29 Reaktionspuffer (10x, NEB)	2,0 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Der Einbau von Biotin-16-dUTP in die RCA-Produkte wurde mittels RCA/RFLP-*EcoRI*- und nachfolgender *Southern blot*-Analyse untersucht (s. V.2.5.2, V.2.5.3 und V.2.5.5/2.5.6). Zur Detektion der Fragmente wurden die Membranen mit einem Streptavidin-AP-Konjugat inkubiert.

Um die Effizienz der RCA mit dem NEB-Enzym ohne Markierungsnukleotide zu prüfen, wurden Gesamtnukleinsäuren infizierter Pflanzen als Matrize eingesetzt und ohne Denaturierungsschritt folgendermaßen verwendet:

Amplifikation der geminiviralen Intermediate

BSA (1 mg/ml)	0,2 µl
Gesamtnukleinsäuren einer AbMV A und B-infizierten <i>N. benthamiana</i> -Pflanze	1,0 µg
10x dNTP-Mix (je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2,0 µl
Φ29-DNA-Polymerase (NEB)	0,5 µl (5 U)
YiPP (anorganische Phosphatase, NEB)	0,2 µl (0,04 U)
Φ29 Reaktionspuffer (10x, NEB)	2,0 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Die eingesetzte Konzentration an Gesamtnukleinsäuren je Reaktionsansatz (20 µl) lag mit 1 µg deutlich über der für das illustra TempliPhi™ Kit (GE Healthcare) verwendeten Menge. Da jedoch die einzelnen DNA-Formen durch *Southern blot*-Analyse untersucht wurden, musste die Gesamtkonzentration erhöht werden, wie sich in Vorversuchen zeigte.

Um die bevorzugten Konformationen der Matrizen für die RCA zu ermitteln, wurden phenolgereinigte Gesamtnukleinsäuren (vgl. V.2.3.2) aus infizierten Pflanzen gewonnen und mit verschiedenen Enzymen vorbehandelt (Tabelle 10). Die unten aufgeführten Reaktionen wurden doppelt angesetzt: Ein Ansatz diente als Kontrolle, der andere als RCA Matrize. Nach Ende der Inkubationsdauer wurden die Reaktionen mit H₂O auf ein Endvolumen von 500 µl gebracht. Proteine wurden wie in V.2.5.1 beschrieben durch Phenolisierung entfernt. Die DNA wurde in Gegenwart von 1 µl Heringssperma-DNA (Endkonzentration 10 µg/µl) oder 2 µl tRNA (Endkonzentration 10 µg/µl) gefällt und anschließend in 30,2 µl H₂O gelöst. Davon wurden 15,1 µl zur RCA eingesetzt (Das Volumen bezieht sich auf ein Endvolumen von 20 µl unter Abzug der Volumina aller weiteren Reaktionsbestandteile, s. Protokoll „Amplifikation basierend auf geminiviralen Intermediaten“), der Kontrollansatz wurde ohne weitere Behandlung verwendet.

RNase H

2 µg Gesamtnukleinsäuren wurden mit 10 U RNase H (Roche Diagnostics) und 1x RNase H-Puffer in einem Endvolumen von 50 µl für 1 h bei 37 °C inkubiert.

RNase A

10 mg/ml RNase A wurde vor Gebrauch für 15 min bei 100 °C inkubiert, um DNasen in der Lösung zu inaktivieren.

2 µg Gesamtnukleinsäuren wurde mit 0,1 µl der RNase-Lösung in einem Gesamtvolumen von 100 µl für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Exonuklease III

2 µg Gesamtnukleinsäuren wurden mit 78 U Exonuklease III in 1x Exonuklease III-Puffer in einem Endvolumen von 30 µl für 30 min bei 37 °C inkubiert. Für eine vollständige Exonukleolyse wurde die Reaktionsdauer auf 16 h erhöht.

T7-Exonuklease

2 µg Gesamtnukleinsäuren wurden mit 80 U T7-Exonuklease in Puffer 4 (NEB) in einem Endvolumen von 30 µl für 3 min bei 37 °C inkubiert. Für eine vollständige Exonukleolyse wurde die Reaktionsdauer auf 16 h erhöht.

Exonuklease III/ T7-Exonuklease

Die obigen Reaktionen der Exonuklease III und T7-Exonuklease wurden in einem Ansatz (30 µl Endvolumen) kombiniert und in Puffer 2 (NEB) für 16 h bei 37 °C inkubiert.

RNase H/Exonuklease III

2 µg Gesamtnukleinsäuren, 10 U RNase H und 78 U Exonuklease III wurden für 1 h bei 37 °C in 1x RNase H-Puffer inkubiert.

RNase H/T7-Exonuklease

2 µg Gesamtnukleinsäuren, 10 U RNase H und 80 U T7-Exonuklease wurden für 1 h bei 37 °C in 1x RNase H-Puffer inkubiert.

Nb.BbvCI

2 µg Gesamtnukleinsäuren wurden in Puffer 2 (NEB) in einem Endvolumen von 100 µl mit 5 U Nb.BbvCI für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Puffer und Lösungen:

RNase H-10x-Puffer

200 mM HEPES-KOH, pH 8,0

500 mM KCl

100 mM MgCl₂

10 mM DTT

RNase A (900 µg/ml)	Die Stammlösung (5 mg/ml) wurde in 10 mM Na-Acetat (pH 5,0) verdünnt und 15 min bei 100 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,1x Vol. 1 M Tris-HCl (pH 7,5) wurden Aliquots bei -20 °C gelagert.
10x Exonuklease III-Puffer	660 mM Tris-HCl, pH 8,0 770 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM DTT

2.5 Standardmethoden zur Analyse von DNA

2.5.1 Reinigung von DNA

Die Phenolisierung und anschließende Fällung mit Alkohol wurden verwendet, um DNA zu konzentrieren oder aus einer wässrigen Lösung zu reinigen.

Das Probenvolumen wurde mit dem bereits verwendeten Puffer auf 500 µl gebracht, danach wurden 500 µl PCI (s. V.2.3.2) zugegeben und 5 min bei RT geschüttelt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei RT und 14000 rpm wurde die wässrige Phase mit 500 µl CI gemischt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei RT und 14000 rpm wurde die wässrige Phase in einem frischen Reaktionsgefäß mit 1/10x Vol. Na-Acetat und 2x Vol. 100 % Ethanol versetzt. Bei geringen DNA-Konzentrationen wurde 1 µl Heringssperma-DNA (Endkonzentration 10 µg/µl) oder 2 µl tRNA (Endkonzentration 10 µg/µl) beigefügt, um eine höhere Ausbeute der DNA zu erreichen. Die Fällung fand über Nacht bei -20 °C statt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14000 rpm wurden der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und der Niederschlag zweimal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (5 min, RT, 14000 rpm). Die DNA wurde in dem entsprechenden Volumen H₂O aufgenommen, das für die weiteren Versuche benötigt wurde.

2.5.2 Restriktionsspaltung viraler DNA

Zur hydrolytischen Spaltung der viralen DNA wurden Restriktionsendonukleasen und *high fidelity*-Restriktionsendonukleasen (HF) von NEB bezogen (vgl. Tabelle 9). 500 ng der RCA-Produkte wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 U des verwendeten Enzymes für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 13: Erwartete Fragmentgrößen von BCTV, der D₀-DNA und der mitochondrialen Plasmide aus Zuckerrübe (vgl. VI.1).

Restriktionsendonuklease	Erwartete Fragmentgrößen [bp]				
	BCTV-A	D ₀ -DNA	BvMtPa	BvMtPc	BvMtPd
<i>Hpa</i> II	1375	1271	874	499	435
	1233		665		380
	386		82		288
					168
					37
<i>Sa</i> II	2993	1271			
<i>Nco</i> I	2993	1271		---	
<i>Ssp</i> I	1366	725			1308
	1082	545		---	
	545				

Besaß das Enzym keine Schnittstelle in der Komponente, ist dies durch „---“ gekennzeichnet.

2.5.3 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt, die nach Standardprotokoll vorbereitet (Sambrook und Russell, 2001) und nach der Gelelektrophorese in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt wurden. Als Größenstandard wurden DNA A und B von AbMV eingesetzt, die in getrennten Ansätzen mit *Hpa*II oder *Pst*I geschnitten wurden und anschließend vereint wurden (vgl. IX.2: Abbildung 40a). Zur Konzentrationsbestimmung von DNA wurde *Hind*III geschnittene λ-DNA verwendet (0,05 bzw. 0,1 µg Gesamt-DNA; vgl. IX.2: Abbildung 40c). Laufstrecken von unbekanntem Fragmenten wurden im Vergleich zu den Fragmenten der Standards geschätzt. Hierzu wurde die polynomische Regression dritten Grades der bekannten Fragmente genutzt und eine Genauigkeit von ±30 bp erreicht.

Puffer und Lösungen:

Ladepuffer	1 % SDS 10 mM EDTA 0,025 % Bromphenolblau 0,025 % Xylolcyanol FF 50 % Ficoll
TBE Puffer (10x, pH 8,3)	0,6 M Tris-Base 0,6 M Borsäure 10 mM EDTA
Ethidiumbromidstammlösung	10 mg/ml (Roth, Karlsruhe)
Färbelösung	0,5 µg/ml Ethidiumbromid

2.5.4 Chloroquingelelektrophorese

Zur Unterscheidung der replikativen Formen geminiviraler DNA, insbesondere der Topoisomere superspiralisierter zirkulärer DNA, wurde die Agarosegelelektrophorese in Gegenwart von Chloroquin durchgeführt. Dieses interkaliert in doppel-

strängige DNA und wandelt negative DNA-Windungen in positive um. Schwach spiralisierte Topoisomere werden dadurch stärker gewunden und wandern im Gel am schnellsten, während stark überspiralisierte cccDNAs entwunden werden, was mit einer geringeren elektrophoretischen Mobilität einhergeht. Die zirkulären DNA-Moleküle mit mittleren Windungszahlen ordnen sich in Form einer Leiter zwischen diesen beiden Extremen an (Clark und Leblanc, 2009).

Die Agarosegele wurden nach Standardprotokoll vorbereitet (Sambrook und Russell, 2001), wobei die Endkonzentration an Chloroquin in Gel und Laufpuffer (1x TBE) (vgl. V.2.5.3) 20 oder 50 µg/ml betrug. Als Hybridisierungsstandard wurden pro Spur 1, 10 und 100 pg linearisierte genomische DNA des zu analysierenden Virus aufgetrennt. Die Gelelektrophorese erfolgte für 19 h bei ca. 3 V/cm.

Puffer und Lösungen:

Chloroquinammlösung

10 mg/ml Chloroquindiphosphatsalz (Sigma-Aldrich, Seelze)

2.5.5 Southern blot-Analyse: Immobilisierung von Nukleinsäuren auf Membranen

Als Hybridisierungsstandard für die *Southern blot*-Analyse wurde linearisierte DNA des untersuchten Virus verwendet. Hierzu wurde virale DNA mittels RCA amplifiziert und durch Restriktionsenzyme linearisiert (s. V.2.5.2). Die Fragmente wurden wie unter V.2.6.1 beschrieben aus Agarosegelen extrahiert. 1, 10 oder 100 pg wurden als Standard pro Spur aufgetragen. Aus den Restriktionsprodukten wurden mit Hilfe des DIG-High Prime Kits (s. Tabelle 11) Sonden hergestellt, deren Bindung durch Chemilumineszenz nachgewiesen wurde. Dazu wurden ca. 1 µg DNA mit H₂O auf ein Endvolumen von 16 µl gebracht. Nach Denaturierung (10 min, 95 °C) wurde die Lösung auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 4 µl DIG-High Prime Mix für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 µl Na-EDTA (0,2 M, pH 8,0) gestoppt.

Zum Nachweis von Nukleinsäuren mittels *Southern blot*-Analyse wurden die Agarosegele bis zum Farbumschlag des im Ladepuffer enthaltenen Bromphenolblau in 0,25 N HCl geschwenkt (je nach Agarosekonzentration betrug die Dauer 8-10 min). Anschließend wurden die Gele kurz in H₂O gewaschen und zweimal 15 min in 1x

(CSPD, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) wurde 1:100 in Dig-Puffer 3 verdünnt und auf der Membran ausgestrichen. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die überschüssige Flüssigkeit ausgestrichen und die Membran in Folie eingeschweißt.

Zum Nachweis Biotin-markierter DNA-Fragmente wurde dasselbe Protokoll verwendet. Zur Detektion wurde jedoch ein Streptavidin-AP-Konjugat eingesetzt (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg), das 1:10000 in Blockierungslösung verdünnt wurde.

Die Exposition auf Röntgenfilm erfolgte abhängig von der Stärke des Signals für 1 min bis 60 h. Zur erneuten Hybridisierung, z.B. mit einer anderen Sonde, wurden die Membranen gestrippt. Hierzu wurden sie jeweils zweimal für 10 min in 0,2 M NaOH (42 °C) und zweimal in 2x SSC (RT) gewaschen und anschließend getrocknet. Die erneute Hybridisierung erfolgte wie bereits beschrieben.

Puffer und Lösungen:

Denhardt (100x)	2 % (w/v) BSA 2 % (w/v) Ficoll 400 2 % (w/v) BSA
SSPE (20x, pH 7,4)	0,02 M Na-EDTA 0,2 M NaH ₂ PO ₄ 3,0 M NaCl
Hybridisierungslösung	1,5 g Dextransulfat 3,2 ml H ₂ O 5 ml 20x SSPE 0,2 ml HS-DNA (10 mg/ml) <u>1 ml 100x Denhardt</u> → lösen 10 ml Formamid _{deion.} 0,6 ml SDS (10 %)
Presoak-Lösung	0,2 g Glycin 3,2 ml H ₂ O 5 ml 20x SSPE 0,2 ml HS-DNA (10mg/ml) <u>1 ml 100x Denhardt</u> → lösen 10 ml Formamid _{deion.} 0,6 ml SDS (10 %)
Maleinsäurepuffer (pH 7,5)	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl
10x Blockierungslösung	10 % (w/v) (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) in Maleinsäurepuffer

Die 10x Blockierungslösung wurde 15 min bei 120 °C autoklaviert. Zur Verwendung wurde die Lösung 1:10 in Maleinsäurepuffer verdünnt.

Dig-Puffer 3 (pH 9,5)	1 M Tris-Base 5 M NaCl
20x SSC (pH 7,0)	3 M NaCl 0,3 M tri-Natriumcitrat

2.6 Klonierung und Sequenzierung viraler DNA

Zur Klonierung und Sequenzierung viraler DNA wurden Gesamtnukleinsäuren mittels RCA amplifiziert und mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten (s. V.2.5.2). Entweder wurde der Reaktionsansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt und das zu klonierende Fragment aus dem Gel eluiert (s. V.2.6.1), oder die Reaktion wurde nach Herstellerangaben (NEB) abgestoppt und die Fragmente direkt zur Ligation eingesetzt.

2.6.1 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Restriktionsansätze wurden in 0,5 bis 0,8 %-igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Markerspur und ein Teil der Probenspur wurden mit einem Skalpell abgetrennt und im Ethidiumbromidbad gefärbt. Unter UV-Licht wurde mit dem Skalpell das DNA-Fragment in der gefärbten Probenspur markiert. Ohne UV-Einstrahlung wurde anhand des markierten Bereiches das Fragment aus dem ungefärbten Gel ausgeschnitten. Die Elution erfolgte mit dem illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit bzw. dem QIAquick® Gel Extraction Kit (vgl. Tabelle 11) nach Herstellerangaben.

2.6.2 Vektorpräparation

Der Vektor wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten (s. V.2.5.2) und wie unter V.2.6.1 beschrieben, aufgereinigt. Die Dephosphorylierung erfolgte für 15 min bei 37 °C mit 10 U CIP (NEB).

2.6.3 Ligation

Ligationen wurden mit der T4 DNA-Ligase (NEB) durchgeführt. Die Fragmente wurden wie unter V.2.6.1 beschrieben, aufgereinigt oder nach abstoppen der Reaktion nach Herstellerangaben (NEB) direkt zur Ligation eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert. Zur Religation viraler Fragmente wurde der gleiche Ansatz ohne Zugabe des Vektors verwendet.

Ligationsreaktion:

T4 Ligasereaktionspuffer (10x)	1 µl
T4 DNA-Ligase (1 U/µl)	1 µl
Insert (ca. 3 ng/µl)	3 µl
Vektor (dephosphoryliert, ca. 5 ng/µl)	5 µl
H ₂ O	ad 10 µl

2.6.4 Herstellung hitzekompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung hitzekompetenter *E. coli*-Zellen zur Transformation wurde nach Inoue *et al.* (1990) abgewandelt. 3 ml LB-Medium wurden mit *E. coli* DH5α (s. Tabelle 6) aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 250 µl dieser Vorkultur wurden in 250 ml SOB-Medium überführt und bei 19 °C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht wurde. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 4000 rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert (Rotor GS3). Der Niederschlag wurde in 80 ml eiskalter TB-Lösung aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C wurde der Niederschlag in 20 ml eiskalter TB-Lösung mit 1,4 ml DMSO resuspendiert. Aliquots von 100 µl wurden bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Puffer und Lösungen:

SOB-Lösung	0,5 % Hefeextrakt
	2 % Trypton
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
TB-Lösung	10 mM PIPES
	15 mM CaCl ₂
	250 mM KCl
	pH 6,7
	55 mM MnCl ₂

Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße) und bei 4 °C gelagert.

2.6.5 Transformation

Die verwendeten Vektoren tragen die multiple Klonierungsstelle in der kodierenden Region für das α-Peptid des Enzyms β-Galaktosidase. *E. coli* DHα kodiert nicht für diese Region, womit eine erfolgreiche Ligation durch Blau-Weiß-Screening ermittelt werden kann. Zur Transformation hitzekompetenter *E. coli* DHα-Zellen wurden die

Zellen auf Eis aufgetaut und zu dem Ligationsansatz gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen 45 s bei 42 °C inkubiert und sofort für 2 min abgekühlt. Nach Zugabe von 300 µl LB-Medium wurden die Zellen bei 37 °C für 1 h regeneriert und auf LB-Platten ausplattiert (100 µg/ml Ampicillin), auf denen zuvor 50 µl X-Gal ausgestrichen wurde.

Puffer und Lösungen:

X-Gal 20 mg/ml in DMF

2.6.6 Colony-RCA

Die Selektion positiver Klone erfolgte durch *Colony-RCA/RFLP*-Analyse. Weiße Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze abgenommen, auf einer LB-Replikplatte ausgestrichen, die über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde. Die gleiche Spitze wurde in 5 µl RCA-Probenpuffer (GE Healthcare) gedippt. Die Reaktionen wurden für 3 min bei 95 °C denaturiert, um die Zellen aufzuschließen. Nach Abkühlen auf RT wurden 5 µl RCA-Reaktionspuffer und 0,2 µl Enzymmix zugegeben und die Ansätze für mindestens 16 h bei 30 °C inkubiert. Die RCA-Produkte wurden mittels RCA/RFLP-Analyse (s. V.2.5.2 und V.2.5.3) auf die Integration des Inserts hin untersucht.

2.6.7 Sequenzierung

RCA-Produkte wurden zur Sequenzierung an die Firma Macrogen (Seoul, Südkorea) übersandt. Sequenzierungen wurden dort auf Grundlage von BigDye[®]-Chemikalien durch Kapillarelektrophorese mit einem ABI3730XL DNA Sequenziergerät durchgeführt. Die Daten wurden zur Analyse elektronisch an uns übermittelt. Nach der initialen Sequenzierung bei Macrogen wurden Primer konstruiert, um die Methode des *primer walking* zur Komplettierung der Sequenz durchzuführen. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Es wurden ein CEQ 8000 Sequenziergerät und das CEQ-DTCS Quick start sequencing kit (Beckman-Coulter, Krefeld) verwendet (s. Tabelle 11).

RCA-Produkte wurden in H₂O zu einer Endkonzentration von ca. 20 ng/µl verdünnt und für 2 min bei 95 °C denaturiert. Den abgekühlten Proben wurden je 4 µl Quid Mix (vgl. Tabelle 11) und 1 µl Primer (10 µM Stammkonzentration) zugegeben. Die *cycle sequencing*-Reaktion wurde wie folgt durchgeführt.

Tabelle 14: PCR-Programm „cycle sequencing“ zur Sequenzierung. Die Schritte 2-4 wurden 50-mal wiederholt. Die Annealingtemperatur von 50 °C bezieht sich auf die Standardprimer M13F und M13R und wurde für alle weiteren Primer angepasst (T_m des Primers [°C] - 5 °C).

	PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1.	Denaturierung	96	300
2.	Denaturierung	96	20
3.	Annealing	50	20
4.	Elongation	60	240
5.	finale Elongation	60	600
6.	Abkühlung	4	-

Anschließend wurden die Proben mit 7 µl magnetischen Kügelchen pro Reaktion gemischt. Nach Zugabe von 42 µl 85 % EtOH wurden die Reaktionsgefäße auf eine magnetische Platte gestellt, um die magnetischen Kügelchen an der Gefäßwand zu konzentrieren. Nach 3-minütiger Inkubation wurde der Überstand entfernt und 100 µl 85 % EtOH ohne Mischen zugegeben. Dieser wurde nach 3 min entfernt und der Schritt einmal wiederholt. Die Gefäße wurden in eine nichtmagnetische Halterung überführt, und pro Reaktion wurden 40 µl SLS zugegeben und gemischt. Die Proben konnten direkt zur Sequenzierung eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

Die Sequenzen wurden mit den Sequenzdaten der NCBI-Datenbank durch BLAST (basic local alignment search tool: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast>) abgeglichen und anschließend mit Hilfe des Programms Bioedit (Hall, 1999) analysiert. Um Sequenzen auf Restriktionsschnittstellen hin zu untersuchen, wurde das Onlineprogramm NEBcutter verwendet (Vincze *et al.*, 2003). Mit dem Onlineprogramm WatCut wurden Positionen in DNA-Sequenzen lokalisiert, an denen stille Mutationen für neue Restriktionsschnittstellen eingeführt werden können (Palmer, 2007).

2.7 Statistische Auswertung

Die Analyse der Infektionsexperimente erfolgte mittels χ^2 -Test. Dieser Test beurteilt, ob ein Unterschied zwischen beobachteten Häufigkeiten signifikant ist (Cavalli-Sforza, 1980). Zur Analyse wurden die Pflanzendaten wie folgt tabellarisch dargestellt, wobei zwischen D_0 - oder D_n -DNA-positiven und -negativen Pflanzen unterschieden wurde.

Tabelle 15: 4x2-Felder-Tafel zur Analyse der Effekte von D₀- und D_n-DNA.

Pflanzengruppe	Symptome			
	keine	mild	schwer	tot
D _(0/n) -DNA-positiv				
D _(0/n) -DNA-negativ				

Um die Auswirkungen von D-DNAs tiefergehend zu charakterisieren wurden vier Gruppen unterschieden, wie in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: 4x4-Felder-Tafel zur Analyse der Effekte von D₀- und D_n-DNA.

Pflanzengruppe	Symptome			
	keine	mild	schwer	tot
D ₀				
D _n				
D _(0/n)				
keine D-DNA				

χ^2 mit $(m-1) \cdot (n-1)$ Freiheitsgraden wurde mit dem Programm SigmaStat®3.1 (Systat, Erkrath) berechnet. Dabei wurden Gleichungen (1) bis (3) zugrunde gelegt (Cavalli-Sforza, 1980).

$$(1) \quad N_1 = \frac{a^2}{m_1} + \frac{b^2}{m_2} + \frac{c^2}{m_3} + \frac{d^2}{m_4} \quad \text{und} \quad N_2 = \frac{e^2}{m_1} + \frac{f^2}{m_2} + \frac{g^2}{m_3} + \frac{h^2}{m_4}$$

$$(2) \quad A = \frac{N_1}{n_1} + \frac{N_2}{n_2}$$

$$(3) \quad \chi^2 = (A-1) \cdot N$$

In den Experimenten wurde das Signifikanzniveau auf $\alpha = 5\%$ gesetzt. Unter diesen Voraussetzungen zeigte $\chi^2 > 7,815$ mit drei Freiheitsgraden (4x2-Felder-Tafel) bzw. $\chi^2 > 16,92$ mit neun Freiheitsgraden (4x4-Felder-Tafel) signifikante Unterschiede in der Symptomverteilung zwischen den analysierten Pflanzengruppen an (Cavalli-Sforza, 1980).

2.8 Microarray

2.8.1 Aldehydmodifizierte Glasobjektträger

In den Versuchen wurden gebrauchsfertige aldehydmodifizierte Glasobjektträger (Schott Nexterion®) verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Schritte bei RT und nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Objektträger wurden in Petri-

schalen gelegt, deren Boden zuvor mit feuchtem Laborpapier (Tork Universal) bedeckt wurde. 50 bis 100 pmol der einzelnen 5'-Amino-modifizierten Oligonukleotide (s. Tabelle 8) wurden als separate Tropfen auf die Objektträger aufgetragen. Die Petrischale wurde mit Parafilm verschlossen und für 15 min inkubiert, um ein Austrocknen der Tropfen zu vermeiden. Die Objektträger wurden in Falcon-Röhrchen gesteckt und auf einem Rollenschüttler zweimal 2 min in 0,2 % SDS, anschließend zweimal 2 min in $H_2O_{\text{deion.}}$ und abschließend 1 min in $H_2O_{\text{deion.}}$ gewaschen. Zur Blockierung freier Aldehydgruppen auf den Objektträgern wurde frische Aldehyd-blockierungslösung (nach Schott Nexterion[®]) verwendet. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die Objektträger zweimal 2 min in 0,2 % SDS und zweimal 2 min in $H_2O_{\text{deion.}}$ gewaschen und anschließend getrocknet. Die Hybridisierung wurde in *gene frames*[®] mit einem Fassungsvermögen von 125 µl durchgeführt (Thermo Scientific, ABgene, Epsom, Surrey/UK). Ein passendes Plastikdeckgläschen wurde mit HS-DNA (10 mg/ml) bedeckt und mit einem zweiten luftblasenfrei abgedeckt. Nach Inkubation für ca. 5 min wurden die Deckgläschen auseinander gezogen und getrocknet. Die so blockierten Deckgläschen konnten für die Hybridisierung mit geminiviraler DNA aus Gesamtnukleinsäuren infizierter Pflanzen (= Virus-Probe) eingesetzt werden, dazu wurde ein selbstklebender Gummiraahmen auf den vorbereiteten Objektträger aufgebracht, die Hybridisierungslösung aufgetragen und mit Hilfe des Deckgläschens eine Hybridisierungskammer geschaffen. Die Hybridisierung fand in einem Falcon-Röhrchen statt, dessen Boden mit feuchtem Laborpapier ausgefüllt wurde, um eine feuchte Kammer zu schaffen. Als Hybridisierungslösung wurde die Virus-Probe 1:10 in gebrauchsfertiger Nexterion Hyb-Lösung (Schott Nexterion[®]) verdünnt und für 3 min bei 95 °C denaturiert. Nach der Hybridisierung für 16 h bei 65 °C *) wurden die Objektträger für 10 min in 2x SSC mit 0,2 % SDS gewaschen. Nach 10-minütigem Waschen in 2x SSC und 10-minütigem Waschen in 0,2x SSC wurden die Objektträger getrocknet und zur RCA (s. V.2.4.3) eingesetzt. Durch das Trocknen der Objektträger konnten diese auch später weiterverwendet werden.

*) Die Temperatur richtete sich nach Herstellerangaben und kann in zukünftigen Versuchen angepasst werden.

Puffer und Lösungen:

PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
Aldehydblockierungslösung (Zur Blockierung freier Aldehydgruppen)	1 g NaBH ₄ 300 ml PBS 100 ml Rotisol

2.8.2 Streptavidinmodifizierte magnetische Kügelchen

***Streptavidin magnetic beads* von New England Biolabs**

Die *streptavidin magnetic beads* hatten einem Durchmesser von 1 µm. Sie lagen in einer Konzentration von 4×10^8 Kügelchen/ml vor.

Die Zusammensetzung von Wasch- und Bindepuffer richtet sich nach Herstellerangaben (NEB). Die Schritte des Protokolls wurden in Vorversuchen ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt und später optimiert.

Pro Reaktion wurden 1 µl der Lösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf einem magnetischen Halter für 15 s inkubiert. Nach Entfernung des Lagerpuffers wurden die *beads* zweimal mit jeweils 100 µl W&B gewaschen. Dazu wurden die Kügelchen drei bis viermal auf und abpipettiert, um nach 15-sekündiger Inkubation den Überstand zu entfernen. Die *beads* wurden in 20 µl TBS aufgenommen. 5'-Biotin-markierte Oligonukleotide (s. Tabelle 8: BCTV_FL, BCTV_FL_D₀ oder AbMV_RecA) wurden in TBS zu einer Endkonzentration von 10 pmol/µl verdünnt und 5 µl wurden mit den vorbereiteten Streptavidin-Kügelchen für 1 h bei RT auf dem Intelli-Mixer (Neolab; Programm C1, 15 rpm) inkubiert. Die Kügelchen wurden dreimal mit jeweils 250 µl TBS/0,05 % Tween-20 wie bereits beschrieben gewaschen und vom Überstand getrennt. Zur Blockierung wurden verschiedene Lösungen getestet. Die Blockierung wurde mit 25 µl 0,2 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % oder 5 % w/v BSA in TBS durchgeführt. Alternativ wurden pro Aliquot der Kügelchen 100 µl TBS mit 0,1 mg/ml HS-DNA oder 100 µl TBS mit 0,2 mg/ml tRNA verwendet. Die Ausgangslösung der tRNA (10 mg/ml) wurde zunächst für 5 min auf 95 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt, um Sekundärstrukturen zu lösen. Nach der Blockierung über Nacht wurde der Überstand wie bereits beschrieben entfernt und die *beads* wurden

in 31,5 µl H₂O aufgenommen. Pro Reaktion wurden 4 µl RecA-Reaktionspuffer (10x, NEB) und 0,5 µl Adenosin-5'-[γ-thio]Triphosphat-tetra-Lithiumsalz (Sigma, 10 mM, im Folgenden als γ-S-ATP be-zeichnet) zugegeben. 1 µl RecA (NEB, 2 mg/ml) wurde den Positivkontrollen beigefügt, in den Negativkontrollen wurde es durch 1 µl H₂O ersetzt. Die Reaktionen wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl Gesamtnukleinsäuren (AbMV A und B aus *N. benthamiana*, BCTV aus *B. vulgaris* oder Mock-inokulierte *B. vulgaris*, s. entsprechende Versuche in Kapitel VI.2.2.2) wurde die Reaktion für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 4 °C gelagert. Die Kügelchen wurden wie oben beschrieben dreimal mit jeweils 100 µl TBS gewaschen und für eine RCA nach Standardprotokoll (s. V.2.4.2) eingesetzt. Zusätzlich wurden 2 µl des Überstands zur RCA in einem getrennten Ansatz verwendet. In beiden Fällen wurde auf den Denaturierungsschritt verzichtet, um ein Lösen der gebundenen DNA zu vermeiden. 2 µl der RCA-Produkte wurden zur RCA/RFLP-Analyse eingesetzt (vgl. V.2.5.2 und V.2.5.3).

Puffer und Lösungen:

Wasch- und Bindepuffer (W&B)	0,5 M NaCl 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA
TBS	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

Dynabeads[®] von Invitrogen

Dynabeads[®] M-270 Streptavidin und M-280 Streptavidin hatten einen Durchmesser von 2,8 µm, MyOne[™] Streptavidin C1 und MyOne[™] Streptavidin T1 waren 1 µm groß. M-270 und M-280 lagen in einer Konzentration von 6-7x10⁸ Kügelchen/ml vor, bei C1 und T1 enthielt 1 ml der Lösung 7-12x10⁹ Kügelchen. Bei M-280 und T1 handelte es sich um hydrophobe, bei M-270 und C1 um hydrophile Kügelchen.

Das Protokoll wurde zunächst nach Herstellerangaben durchgeführt. Später wurde das für die *streptavidin magnetic beads* von NEB beschriebene Protokoll verwendet.

Zur Bindung von 5'-Biotin-markierten Oligonukleotiden wurden 5 µl Aliquots der Kügelchen auf dem magnetischen Halter vom Lagerpuffer getrennt und dreimal in 500 µl 1x B&W gewaschen. Die Kügelchen wurden in 5 µl 1x B&W aufgenommen und mit den Oligonukleotiden inkubiert wie für die *streptavidin magnetic beads* von

NEB beschrieben. Nach Inkubation auf dem magnetischen Halter wurde der Überstand abgenommen und die beads zweimal in 100 µl 1x B&W gewaschen. RecA-Behandlung und RCA wurden wie oben beschrieben, durchgeführt.

Puffer und Lösungen:

Binde- und Waschpuffer (B&W, 2x)	2 M NaCl
(Quelle: Invitrogen)	10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	1 mM EDTA

Die nicht-kovalente Bindung zwischen Streptavidin und Biotin wurde durch Erhitzen auf 70 °C gelöst (Versuchsprotokoll nach Holmberg *et al.*, 2005). Hierzu wurde der Reaktionsüberstand nach 30-sekündiger Inkubation auf dem Magnethalter abgenommen, die Kügelchen mit 100 µl 1x B&W gewaschen und in 20 µl H₂O aufgenommen. Ein Heizblock wurde auf 30 °C vorgeheizt. Sobald das Reaktionsgefäß mit den Kügelchen hineingestellt wurde, wurde die Solltemperatur auf 70 °C erhöht. Nach Erreichen der Endtemperatur (etwa 1 °C/6 s) wurde die Lösung für 2 s inkubiert und anschließend auf RT abgekühlt. Der Überstand konnte nach 30-sekündiger Inkubation auf dem Magnethalter abgenommen werden.

Da die Versuche zeigten (vgl. Abbildung 27h), dass ssDNA unspezifisch an die Kügelchen bindet, sollten die Einzelstränge dieser DNA-Form, aber auch ssDNA-Bereiche anderer replikativer Intermediate aufgefüllt werden. Dazu wurden 1 µg Gesamtnukleinsäuren mit 2 µl der biotinylierten Primern (BCTV_FL, BCTV_FL_D₀ oder AbMV_RecA; je 100 µM in H₂O) in Puffer 2 (NEB) in einem Gesamtansatz von 12 µl für 20 min bei 68 °C* inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Primer, die komplementär an einzelsträngige DNA-Bereiche gebunden hatten, wurden in einer Polymerase-Reaktion verlängert. Hierzu wurden 1 µl T4-DNA-Polymerase (NEB), 0,5 µl dNTPs (20 mM) und 0,5 µl H₂O zugegeben und der Ansatz bei 16 °C für 1 h inkubiert. Um mögliche verbleibende einzelsträngige DNA-Stränge unspezifisch aufzufüllen, wurden 5 µl eines Hexanukleotid-Mixes (= 625 ng; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) zugegeben und die Reaktionskomponenten für 1 h bei 16 °C inkubiert. Die Mikrokügelchen wurden wie bereits beschrieben für die DNA-Bindung vorbereitet.

* Die Inkubationsdauer kann in künftigen Versuchen optimiert werden. Aufgrund der parallelen Inkubation von Ansätzen mit unterschiedlichen Primern wurde eine gemittelte Annealingtemperatur gewählt. Diese kann für die einzelnen Oligonukleotide optimiert werden.

Der Reaktionsansatz und die *beads* wurden gemischt und für 20 min bei RT unter Schütteln inkubiert (Intelli-Mixer, Neolab; Programm F5, 50 rpm). Nach Abnahme und Lagerung des Überstandes mit ungebundener DNA wurden die Kügelchen wie bereits beschrieben gewaschen. Geminivirale DNA, die sich im Überstand befand bzw. an die Kügelchen gebunden hatte, wurde durch eine RCA/RFLP-Analyse nachgewiesen (vgl. V.2.4.2, V.2.5.2 und V.2.5.3). Die Nukleinsäuren wurden hierzu ohne Denaturierungsschritt in die RCA eingesetzt.

2.9 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

2 % Uranylacetat (in H₂O) und 0,5 mg/ml Bacitracin wurden zu gleichen Teilen gemischt und 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Lösung konnte bei 4 °C im Dunkeln einige Wochen gelagert werden. Kohlebedampfte und Parlodion-beschichtete Kupfernetze (*grids*) wurden zunächst in EtOH_{abs.} getaucht und getrocknet. 5 µl der Probe (magnetische Kügelchen nach oberflächengebundener RCA bzw. Überstand der Reaktion) wurden auf das *grid* aufgetragen, welches über einen Magneten platziert wurde. Dadurch konnte eine Abstoßung zwischen *grid* und Kügelchen verhindert werden. Nach 1-minütiger Inkubation bei RT wurden einzelne H₂O-Tropfen aus einer Plastikpasteurpipette über das *grid* getropft, welches auf Filterpapier (Whatman Rundfilter) abgetupft wurde. Viermal wurden 10 µl der Uranylacetat/Bacitracin-Lösung zur Negativkontrastierung aufgetragen und nach 10 s mit Filterpapier abgenommen. Die Fotos wurden mit einem EM10C/CR Hochleistungs-Elektronenmikroskop (Zeiss) aufgenommen, das bei 60 kV betrieben wurde.

VI Ergebnisse

1. Defekte DNAs von BCTV korrelieren unterschiedlich mit Symptomen in Zuckerrübe

1.1 DNA-Interferenz in transgenen Zuckerrüben

Die Versuche von Frischmuth und Stanley (1994) zeigten für die Modellpflanze *N. benthamiana*, dass DNA-Interferenz durch eine D-DNA von BCTV erreicht werden kann. Diese wurde als Transgen stabil in das Pflanzengenom eingebracht. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde der wichtigste Wirt von BCTV, die Zuckerrübe, mit dem selbem Konstrukt transformiert. Im Gegensatz zu den vorherigen auf *Southern blot*- und PCR-Analyse basierenden Arbeiten (Lauster, 2000), wurde im Rahmen dieser Arbeit die RCA/RFLP-Analyse verwendet.

Hierzu wurden Pflanzen transgener und nicht-transgener Linien in zwei unabhängigen Experimenten (E# 1 und E# 2) mit BCTV-A[US:Cal:85] inokuliert und der Symptomverlauf wöchentlich dokumentiert. Weiterhin wurden Gesamtnukleinsäuren aus den Einzelpflanzen zu drei verschiedenen Zeitpunkten (3, 6 und 13 wpai) isoliert und zirkuläre DNA mittels RCA vervielfältigt. Virale und defekte Moleküle konnten durch endonukleolytische Spaltung charakterisiert werden. Die statistische Auswertung mittels χ^2 -Test sollte zeigen, ob die Transreplikation des Transgens in Zusammenhang mit der Symptomausprägung stand.

1.1.1 Symptomentwicklung

In beiden unabhängigen Experimenten konnte eine hohe Infektionsrate von 88 bis 100 % erreicht werden, was die Effektivität der Agroinokulation von Zuckerrübe mit BCTV belegte. Die einzige Ausnahme stellte Linie 05-004K dar, welche lediglich im zweiten unabhängigen Experiment erfolgreich infiziert werden konnte. Die hohen Infektionsraten wiesen darauf hin, dass die Pflanzen aller Linien empfänglich für das Virus sind (Suszeptibilität). Es konnte somit für keine Linie eine Resistenz gegenüber BCTV nachgewiesen werden.

Individuelle Pflanzen wurden in die vier Symptomklassen „symptomlos“, „milde“ und „schwere“ Symptome und „tote Pflanzen“ eingeteilt, wie in Abbildung 2e-j dargestellt.

Pflanzen mit milden und schweren Symptomen zeigten eine graduelle Symptomausprägung in Hinsicht auf Stärke von Blattrollen und Wachsminderung. Im Wesentlichen wurde aufwärts gerichtetes Blattrollen beobachtet (vgl. Abbildung 2b-c) In wenigen Fällen trat auch abwärts gerichtetes Rollen auf (s. Abbildung 2d).

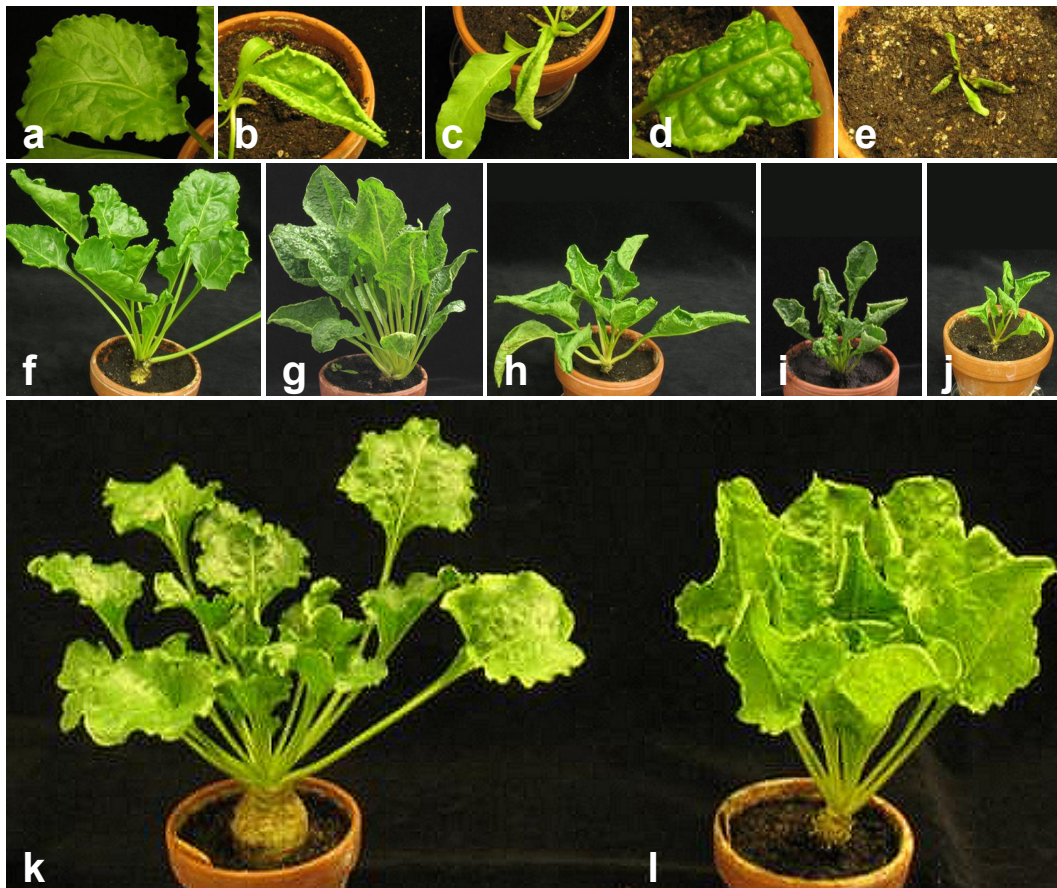


Abbildung 2: Symptome von BCTV in der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.). a: Blatt einer uninfizierten Kontrollpflanze; b und c: Blätter mit aufwärtsgerichtetem Blattrollen in unterschiedlicher Intensität; d: Blatt mit abwärtsgerichtetem Blattrollen; e: tote Pflanze; f: infizierte Pflanze ohne Symptome; g und h: Pflanzen mit milden Symptomen unterschiedlicher Ausprägung; i und j: Pflanzen mit schweren Symptomen unterschiedlicher Stärke; k: uninfizierte Kontrolle der Linie 84111K und l: infizierte Pflanze derselben Linie, die Erholung von der Infektion zeigt (beide 30 wpai).

In den Linien 05-157T, 84107K, 84111K, 84142T und 9K9010 konnten bereits 7 bis 10 dpai erste Symptome wie abwärts gerichtetes Blattrollen beobachtet werden. Im Allgemeinen waren die ersten Symptome jedoch erst 2 wpai zu sehen. Zu diesem Zeitpunkt bildeten sich in den Linien 05-157T, 7B009, 84107K, 84137T, 84142T und 84151T die ersten schweren Symptome aus. Bereits 4 wpai begannen einzelne Pflanzen in Linie 84151T abzusterben. Erst 13 wpai starben in der Mehrzahl der untersuchten Linien Einzelpflanzen ab. Die Ausnahme bildeten die Linien 05-018K (100 % schwere Symptome), 05-032T (E# 1: 25 % milde, 75 % schwere Symptome),

9K9010 (100 % ohne Symptome) und 84124T (E# 2: 33 % keine, 66 % milde Symptome). Die Verläufe der Symptome sind für die Zeitpunkte der Probenahme in Tabelle 17 dargestellt. Die Gesamtdaten für die Symptombdokumentierung sind im Anhang (s.IX.3) beigefügt.

Tabelle 17: Klassifizierung der Einzelpflanzen zu den drei Probenahmen.

Experiment	Linie	Infektiosität (infizierte/inokulierte Pflanzen)		Symptome*													
				3 wpai				6 wpai				13 wpai					
		absolut	[%]	n	m	s	d	n	m	s	d	n	m	s	d		
1	05-004K	0/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	05-018K	1/1	100	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	05-026T	1/1	100	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	05-032T	8/8	100	0	8	0	0	0	6	2	0	0	2	6	0	0	0
	05-154T	4/4	100	1	3	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	4
	05-157T	8/8	100	0	8	0	0	0	0	2	6	0	0	0	1	7	0
	2R 7629	1/1	100	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	7B0091	2/2	100	0	2	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0	1
	84101T	8/8	100	0	8	0	0	0	1	5	2	0	0	0	0	8	0
	84104 T	8/8	100	0	7	1	0	0	2	4	2	0	2	0	6	0	0
	84107 K	7/8	88	1	6	0	0	1	4	0	2	1	2	2	2	2	0
	84111 K	8/8	100	0	7	1	0	0	3	5	0	1	1	2	4	0	0
	84118 T	5/5	100	1	0	4	0	0	0	2	3	0	0	0	5	0	0
	84124 T	8/8	100	0	7	1	0	0	5	2	1	0	4	0	4	0	0
	84137 T	8/8	100	1	7	0	0	0	1	4	3	0	0	0	8	0	0
	84142 T	8/8	100	2	6	0	0	1	1	6	0	0	1	0	7	0	0
	84147 T	8/8	100	0	8	0	0	0	5	3	0	0	1	1	6	0	0
	84151 T	5/5	100	0	5	0	0	0	3	1	1	0	2	0	3	0	0
	84164 T	8/8	100	0	6	2	0	0	3	2	3	1	2	0	5	0	0
	9K9010	1/1	100	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
2	05-004K	1/1	100	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	05-032T	5/5	100	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0
	05-154T	1/1	100	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	05-157T	1/1	100	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
	7B0091	1/1	100	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
	84101T	9/9	100	0	9	0	0	0	5	4	0	0	3	3	3	0	0
	84104T	9/9	100	0	9	0	0	0	9	0	0	0	5	0	4	0	0
	84107K	9/9	100	0	9	0	0	0	7	2	0	0	4	3	2	0	0
	84111K	9/9	100	0	9	0	0	0	9	0	0	1	1	6	1	0	0
	84124T	3/3	100	0	3	0	0	0	3	0	0	1	2	0	0	0	0
	84137T	9/9	100	0	3	6	0	0	3	5	1	0	1	3	5	0	0
	84142T	9/9	100	0	9	0	0	0	7	2	0	0	6	1	2	0	0
	84147T	9/9	100	0	9	0	0	0	8	1	0	0	7	0	2	0	0
	84151T	3/3	100	0	0	3	0	0	0	1	2	0	0	0	3	0	0
	84164T	9/9	100	0	8	1	0	0	7	2	0	1	2	4	2	0	0
	9K9010	2/2	100	0	1	1	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0

*: Gliederung der Symptome: n = keine/no; m = mild; s = schwer/severe; d = tot/dead

Alleine in Linie 05-032T konnte bei infizierten und nicht-inokulierten Kontrollpflanzen eine verfrühte Blütenbildung beobachtet werden. 12 wpai begannen die ersten Pflanzen dieser Linie Blütenstände zu bilden. Auffällig waren weiterhin die Blätter, die

sich durch ihre Verschmälerung von den Blättern der Zuckerrüben anderer Linien unterschieden. Des Weiteren zeichneten sich die Pflanzen durch eine auffällige Wuchshöhe mit schlanken Blütenständen aus. Die morphologischen Unterschiede lassen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Integration des Transgens in kodierende Bereiche des Wirts erklären, die mit der Entwicklung assoziiert sind. Um zu bestätigen, dass das Transgen in dieser Linie integriert vorlag, wurde eine PCR-Analyse mit den M13-Standard-Primern durchgeführt, wobei bei korrekter Integration ein Fragment von 2 kb erwartet wurde. Wie in Abbildung 3 zu sehen, konnte dieses Fragment in zwei nicht-inokulierten Kontrollpflanzen der Linie 05-032T (Spuren 1, 2 und 5) detektiert werden. Als Kontrolle wurden Mock-Kontrollpflanzen der Linien 84124T und 84111K (Spuren 3, 4, 6 und 7) untersucht. Bei den Kontrollen wurde deutlich, dass die als transgen bezeichneten Linien nicht homogen waren. Die untersuchten Pflanzen der Linie 84111K (Spuren 4 und 7) waren positiv für das Transgen, während die Pflanzen aus Linie 84124T dieses nicht in ihrem Genom integriert hatten (Spuren 3 und 6). Als Positivkontrolle wurde die D₀-DNA eingesetzt, die in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert wurde. Der Fragmentgrößenunterschied belegte, dass das Transgen als Bitmer vorlag.

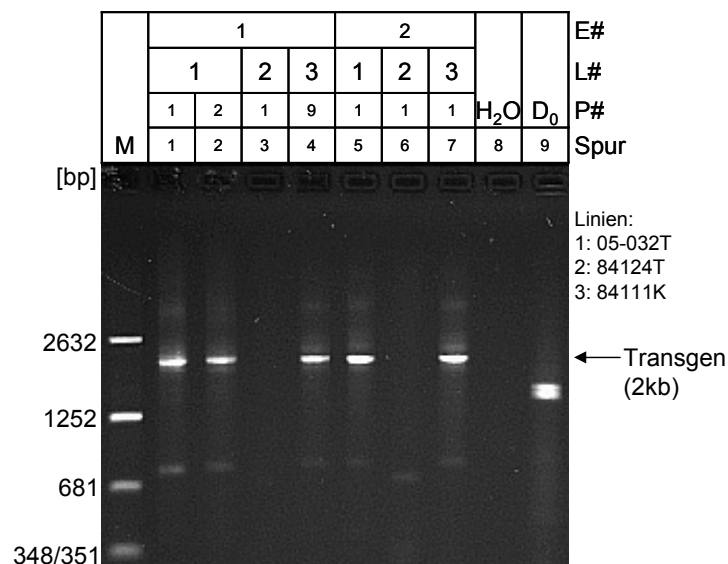


Abbildung 3: Überprüfung der Integration des Transgens in das Pflanzengenom. Mit den M13-Standardprimern (vgl. Tabelle 8) wurde das D₀-DNA-Konstrukt (2 kb) amplifiziert. Als Matrize wurden Gesamtnukleinsäuren nicht-inokulierter transgener Pflanzen der Linien 05-032T, 84124T und 84111K verwendet. Als Negativkontrolle wurde H₂O statt der Gesamtnukleinsäuren eingesetzt (Spur 8). Als Positivkontrolle wurde mit einer Pipettenspitze ein Teil einer Kolonie der klonierten D₀-DNA abgenommen und in dem PCR-Ansatz gelöst (Spur 9). Die PCR-Produkte wurden in einem 1 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt, welches nach der Gelelektrophorese mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt wurde. Als Marker (M) wurde *Hpa*II- und *Pst*I-geschnittene DNA A von AbMV aufgetragen (vgl. Abbildung 40a). E#: Nummer des Experimentes, L#: Liniennummer, P#: Pflanzennummer.

Interessanterweise trat bei einigen Pflanzen ein Erholungseffekt auf, und die jüngsten Blätter waren nur schwach verformt oder von Blättern uninfizierter Kontrollpflanzen nicht zu unterscheiden, wie beispielhaft in Abbildung 2k-l dargestellt. Sehr auffällig war dies in Linie 84124T, wo überlebende Pflanzen nahezu die gleiche Höhe wie Kontrollpflanzen erreichten, und neue Blätter lediglich ein mildes Blattrollen oder schwaches Kräuseln der Blattoberfläche aufwiesen. Pflanzen dieser Linie, die eine Erholung zeigten, wurden für mehr als anderthalb Jahre unter gleichen Bedingungen gehalten ohne abzusterben. Weiterhin trat in Linie 9K9010 ein Erholungseffekt in beiden unabhängigen Experimenten auf. Das sehr schwache Blattrollen, welches 2 wpai beobachtet wurde, bildete sich nach zwei weiteren Wochen vollständig zurück. Die Pflanzen wiesen noch immer eine schwache Wuchsminderung auf, erreichten aber zwischen 5 und 11 wpai die Größe der Kontrollpflanze. Auch in Linie 84111K trat bei einigen Pflanzen eine Rückbildung der Symptome ein. Von 70 bis 84 dpai wurde dies ebenso für die Linien 84107K und 84164T vermutet. Kurze Zeit später bildeten sich jedoch erneut schwere Symptome aus.

1.1.2 RCA/RFLP-Analyse der Einzelpflanzen

Zunächst sollte untersucht werden, mit welcher Restriktionsendonuklease ein geeignetes Fragmentmuster erhalten werden kann, das sowohl die Identifikation infizierter, als auch transreplizierender (D_0 -DNA-positiver) Pflanzen ermöglicht. Das in unserer Arbeitsgruppe als Standard-Enzym verwendete *Hpa*II stellte sich dabei als ungeeignet heraus, da neben den viralen Komponenten auch die mitochondrialen Plasmide aus Zuckerrübe (Zugangsnummern: X04983 (BvMta), X00641 (BvMtc) bzw. X04984 (BvMtd)) geschnitten werden (zur Übersicht der Fragmentgrößen siehe Tabelle 13). Interessanterweise zeigte sich, dass auch in mitochondrialen Plasmiden Polymorphismen auftraten, welche sich in einem veränderten Fragmentmuster äußerten (s. Abbildung 4a, graue Sterne). Da dies nicht in Zusammenhang mit dem Versuchsziel stand, wurden die veränderten mitochondrialen Plasmide nicht weiter untersucht.

Für die Auswertung der Gesamtheit der Pflanzen wurde die RCA/RFLP-*Hpa*II-Analyse nicht verwendet, da die Vielzahl der Fragmente die Auswertung der Agarosegele erschwerte. Als problematisch stellte sich weiterhin heraus, dass *Hpa*II die virale DNA dreimal schneidet, wobei eines der drei Fragmente von 1233 bp und

die *Hpa*II-linearisierte D₀-DNA (1271 bp) nahezu die gleiche Größe besitzen (vgl. Abbildung 4a). Auch in 0,4 %-igen Agarosegelen konnten die beiden Fragmente nicht separiert werden (s. Abbildung 4b).

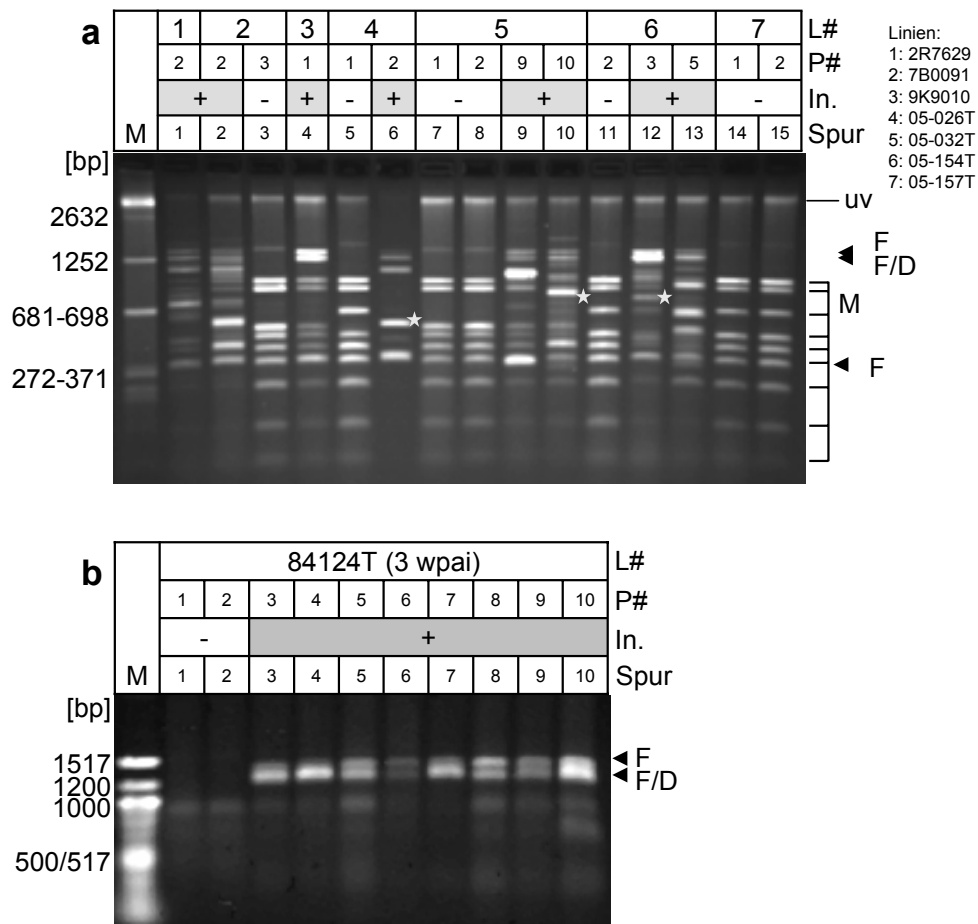


Abbildung 4: Nachweis der Replikation von Virus und Transgen durch RCA/RFLP-*Hpa*II am Beispiel einiger infizierter und uninfizierter Pflanzen. a: 2 %-iges TBE-Agarosegel. Als Marker (M) wurde *Hpa*II- und *Pst*I-geschnittene Gesamt-DNA von AbMV aufgetragen (vgl. Abbildung 40a); **b:** 0,4 %-iges TBE-Agarosegel, als Marker (M) wurden 0,5 µg des 100 bp DNA Ladder® Größenstandards (vgl. Abbildung 40d) aufgetragen. Die Gele wurden wie in Abbildung 3 beschrieben gefärbt. L#: Liniennummer, P#: Pflanzennummer, In.: inokuliert; Kennzeichnung der Fragmente im Agarosegel: uv: unverdaut, F: *full-length*/gesamtgemisch, D: defekt, M: mitochondrial. Polymorphismen mitochondrialer DNA wurden in a mit grauen Sternen gekennzeichnet.

*Ssp*I stellte eine Alternative zur Restriktionsanalyse dar, da lediglich das mitochondriale Plasmid BvMtPd einmal geschnitten wird. Die virale DNA wird dreimal (1366, 1082 und 545 bp) und die D₀-DNA zweimal geschnitten (725 und 545 bp) (vgl. Tabelle 13). In 1,5 %-igen Agarosegelen konnten die Fragmente gut voneinander getrennt werden, was die Identifikation D₀-DNA-positiver Pflanzen ermöglichte. Weiterhin tauchten in einigen getesteten Pflanzen zusätzliche Fragmente auf, die D_n-DNAs zugewiesen wurden (s. Abbildung 5, graue Sterne).

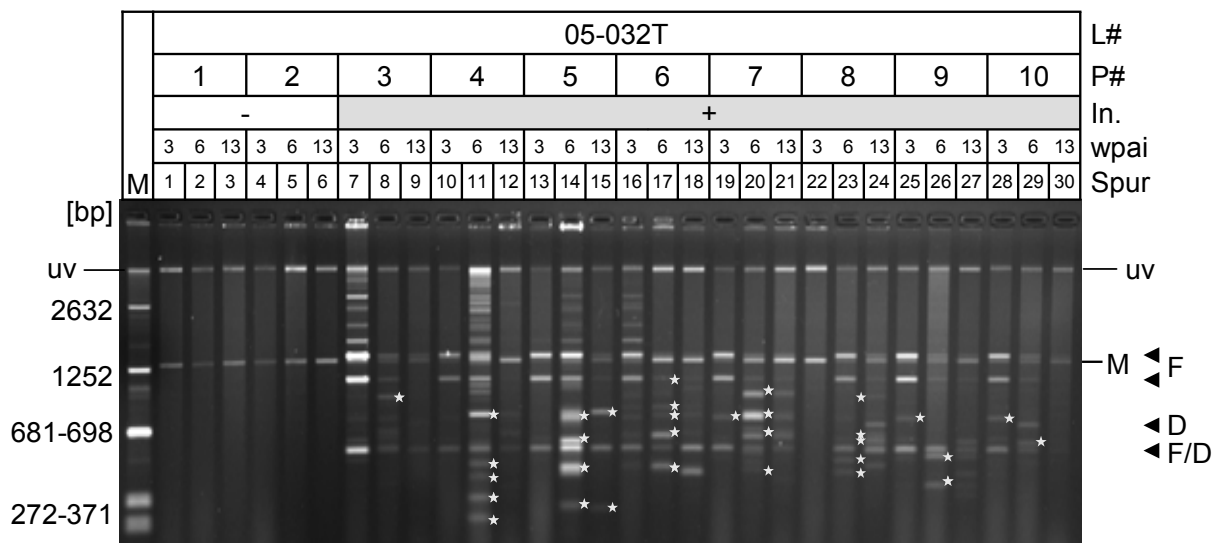


Abbildung 5: Nachweis der Replikation von Virus und Transgen durch RCA/RFLP-*SspI*-Analyse am Beispiel infizierter und uninfizierter Pflanzen der Linie 05-032T. Die Fragmente wurden in einem 1,5 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt, als Marker (M) wurde *HpaI*- und *PstI*-geschnittene Gesamt-DNA von AbMV aufgetragen (vgl. Abbildung 40a). Das Gel wurde wie in Abbildung 3 beschrieben gefärbt. Abkürzungen wie in Abbildung 3 und Abbildung 4, D_n -DNAs wurden mit grauen Sternen gekennzeichnet.

Bei der weiteren Analyse der BCTV- und D_0 -DNA-Sequenzen wurde jedoch *SalI* als geeigneteres Restriktionsenzym identifiziert, daher wurden nicht alle Einzelpflanzen durch RCA/RFLP-Analyse mit den Enzymen *HpaI* und *SspI* untersucht. *SalI* hat in beiden untersuchten Sequenzen (viral und D_0 -DNA) lediglich eine Erkennungsstelle, welche sich im C1-ORF befindet. Daher wurde angenommen, dass mit Hilfe dieser Endonuklease die deutlichste Unterscheidung zwischen beiden DNA-Spezies möglich sein sollte. Alle Proben aus beiden unabhängigen Experimenten und der jeweiligen Zeitpunkte wurden mittels RCA/RFLP-*SalI*-Analyse untersucht. In Abbildung 6a ist dies beispielhaft für drei Linien dargestellt. Man sieht, dass die Identifikation infizierter und transreplizierender Pflanzen im Gegensatz zu *HpaI* und *SspI* deutlich erleichtert wurde. Über die drei Zeitpunkte betrachtet veränderte sich das erhaltene Fragmentmuster der D-DNAs. In Experiment 1 konnte die D_0 -DNA 3 wpai in 77 (73 %), 6 wpai in 42 (43 %) und 13 wpai in 35 Pflanzen (33 %) nachgewiesen werden. In Experiment 2 variierte die Anzahl D_0 -DNA-transreplizierender Zuckerrüben im entsprechenden Zeitverlauf von 48 (54 %) über 40 (45 %) zu 38 (43 %). Es ließ sich also in beiden unabhängigen Versuchsreihen erkennen, dass die D_0 -DNA am häufigsten zum ersten Untersuchungszeitpunkt transrepliziert wurde. Anschließend wurde sie durch D_n -DNAs verdrängt. Diese waren 3 wpai stark unter-

repräsentiert und wurden erst nach drei weiteren Wochen in der Mehrheit der Pflanzen nachgewiesen.

Um auszuschließen, dass mittels RCA/RFLP-*SalI* statt D_n-DNAs mitochondriale Plasmide detektiert wurden, die Punktmutation angereichert hatten, wurde die DNA mit Hilfe einer BCTV-spezifischen Sonde durch *Southern blot*-Analyse nachgewiesen. Hierdurch wurde belegt, dass es sich um defekte BCTV-Moleküle handelte (vgl. Abbildung 6b). Die Untersuchung mittels RCA/RFLP-*SalI* stellte somit die beste Analysemethode dar.

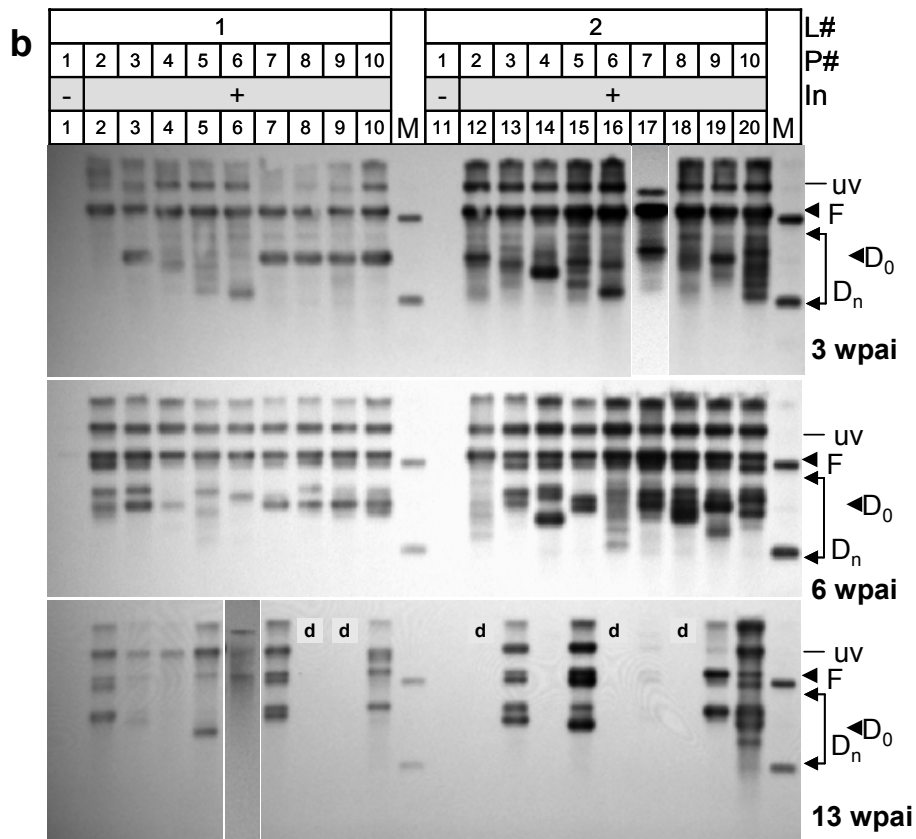
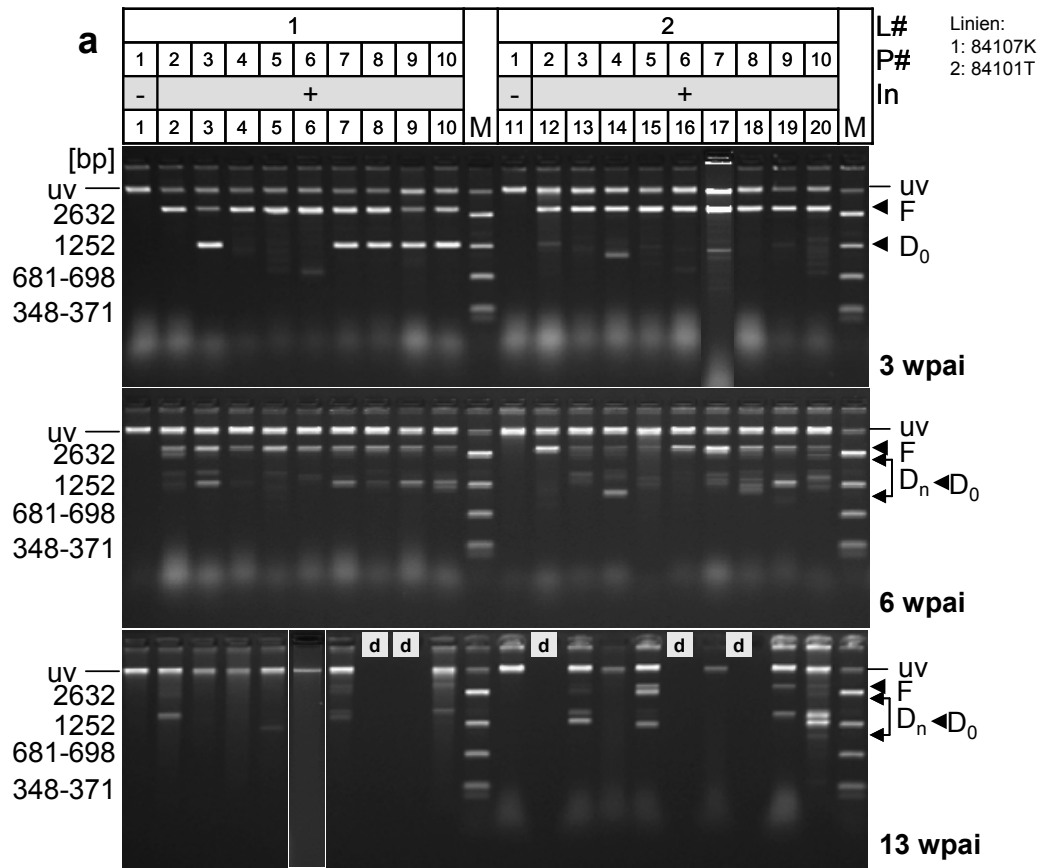


Abbildung 6: Nachweis der Replikation von Virus und Transgen durch RCA/RFLP-*SalI*-Analyse am Beispiel zweier Linien. a: Die Fragmente wurden in einem 1,5 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt, das wie in Abbildung 3 beschrieben gefärbt wurde. b: Die Nukleinsäuren wurden mittels *Southern blot*-Analyse desselben Gels nachgewiesen. Hierzu wurde eine Sonde aus linearisierter BCTV-DNA verwendet (vgl. V.2.5.6). Gezeigt sind die Linien 84107K und 84101T zu den Zeitpunkten 3, 6 und 13 wpai. Die 1,5 %-igen Agarosegele für die Gesamtheit der Pflanzen wurden im Anhang beigefügt. Als Marker (M) wurde *HpaII*- und *PstI*-geschnittene Gesamt-DNA von AbMV aufgetragen (vgl. Abbildung 40a). Als Hybridisierungsstandard dienten 1, 10 und 100 pg *SalI*-linearisierte virale DNA von BCTV (2993 bp) (s. V.2.5.5). Abkürzungen wie in Abbildung 4; D₀: D₀-DNA, D_n: D_n-DNA.

Durch *Southern blot*-Analyse konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die subgenomischen Fragmente von neuen *SalI*-Schnittstellen in der viralen DNA resultierten. Daher wurde ein zweites Enzym gesucht, das ähnlich wie *SalI* beide untersuchten Komponenten einmal schneidet. Die Wahrscheinlichkeit für zwei Mutationen in der BCTV DNA, die in falsch-positiver Diagnose von D-DNAs resultiert, wurde als gering angesehen. *NcoI* schneidet ebenso wie *SalI* im C1-ORF. Die Proben wurden 6 und 13 wpai parallel mit RCA/RFLP-*SalI*- und -*NcoI*-Analyse untersucht. Mit Hilfe dieser vergleichenden Analyse konnten Fragmente, die in beiden Restriktionsansätzen die gleiche Größe aufwiesen, D-DNAs zugeordnet werden. Abbildung 7 zeigt ein beispielhaftes Vergleichsgel. Die Gesamtdaten können dem Anhang entnommen werden (s. IX.4).

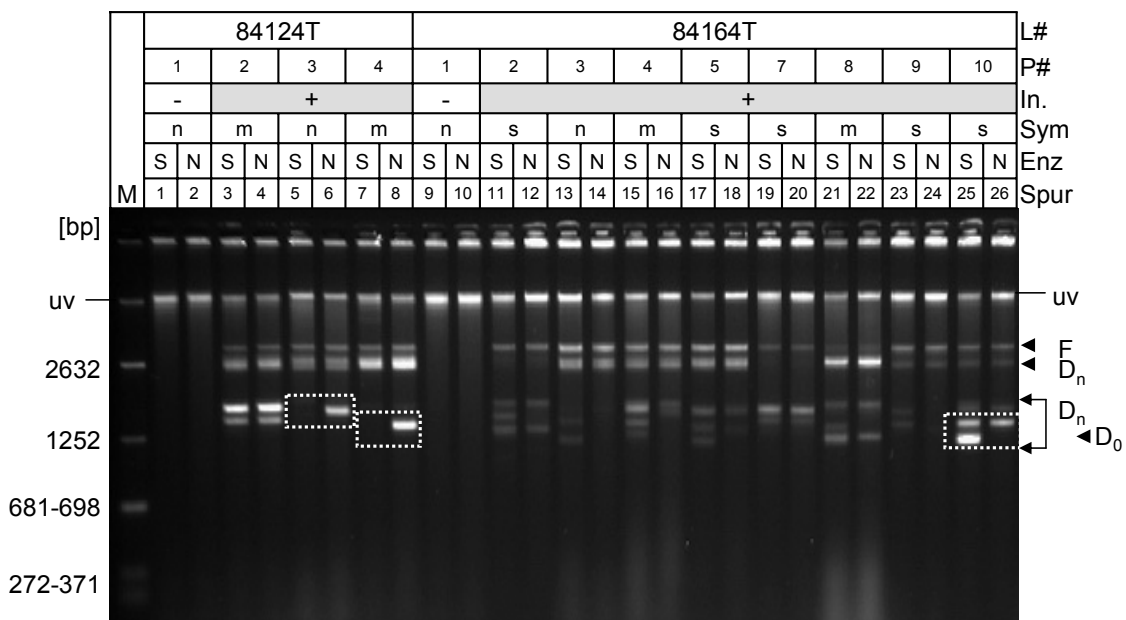


Abbildung 7: Vergleich der Replikation von Virus und Transgen durch parallele RCA/RFLP-*SalI*- und -*NcoI*-Analyse am Beispiel zweier Linien. Die Fragmente wurden in einem 1,5 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt, das wie in Abbildung 3 beschrieben gefärbt wurde. Gezeigt sind die Linien 84124T und 84164T zum Zeitpunkt 13 wpai. Als Marker (M) wurde *HpaII*- und *PstI*-geschnittene Gesamt-DNA von AbMV aufgetragen (vgl. Abbildung 40a). Die Agarosegele für die Gesamtheit der Pflanzen wurden im Anhang beigefügt (s. IX.4). Weiße gestrichelte Boxen zeigen die unterschiedlichen Fragmente im direkten Vergleich gefunden wurden. Abkürzungen wie in Abbildung 4 und Abbildung 6.

Mittels RCA/RFLP-*SalI* und -*NcoI*-Analyse konnte eine Vielfalt an D_n -DNAs identifiziert werden. In den untersuchten Proben konnten die D_n -DNAs in drei Gruppen eingeteilt werden, die Größen von 940-1340 bp, 1610-1940 bp bzw. 2345-2815 bp aufwiesen. Wie Tabelle 18 zeigt, konnte entgegen der bisherigen Erfahrungen, dass D-DNAs etwa die Hälfte der geminiviralen Genomgröße umfassen (Frischmuth und Stanley, 1992) in auffällig vielen Pflanzen eine D_n -DNA von 2515 bp beobachtet werden.

Tabelle 18: Vorkommen der D_n -DNA von 2515 bp zu den drei Untersuchungszeitpunkten.

wpai	Pflanzen mit D_n -DNA von 2520 bp		
	3	6	13
Experiment 1	4/106 (4)	44/106 (42)	28/42 (67)
Experiment 2	9/89 (10)	37/85 (44)	46/62 (74)

Angegeben ist die absolute Anzahl D_n -DNA-amplifizierender Pflanzen. In Klammern ist die relative Anzahl (%) unter allen lebenden Pflanzen zum entsprechenden Zeitpunkt genannt.

Durch das Auftrennen von Proben in Agarosegelen unterschiedlicher Konzentration (vgl. Abbildung 8) konnte bestätigt werden, dass eine D_n -DNA der entsprechenden Größe repliziert wurde, und es sich nicht um Artefakte der Gelmigration handelte.

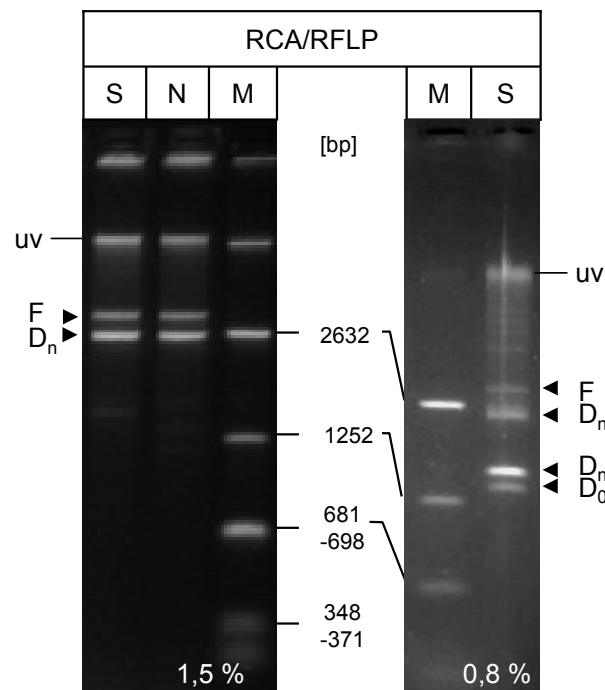


Abbildung 8: Darstellung der hochmolekularen D_n -DNA von 2,5 kb durch RCA/RFLP-Analyse mit *SalI* und *NcoI*. Die Fragmente wurden in einem 1,5- bzw. 0,8 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt, das wie in Abbildung 3 beschrieben gefärbt wurde. Als Marker (M) wurde *HpaI*- und *PstI*-geschnittene Gesamt-DNA von AbMV aufgetragen (vgl. Abbildung 40a). Abkürzungen wie in Abbildung 4 und Abbildung 6.

1.1.3 Korrelation von Symptomen und Replikation viraler DNA

Nachdem die Kombination von *Sall* und *NcoI* als parallele RCA/RFLP-Analyse als geeignete Diagnostikmethode für die Detektion der D₀-DNA erkannt wurde und weiterhin die sensitive Unterscheidung einzelner D-DNAs möglich war, wurden die Zuckerrüben in beiden unabhängigen Experimenten auf einen Zusammenhang zwischen Transreplikation der D₀-DNA und Symptomausprägung hin untersucht. Die Symptome wurden den RCA/RFLP-Ergebnissen gegenüber gestellt. Aufgrund der hohen Variabilität der Ergebnisse und nur geringer Abweichungen, konnten für die Einzellinien keine signifikanten Unterschiede der Symptomausprägungen beobachtet werden (s. Abbildung 9). Bei Betrachtung der Symptome 13 wpai ließ sich keine Tendenz zu mildereren Symptomen in D₀-positiven oder -negativen Pflanzengruppen erkennen. In der Linie 05-032T traten zu diesem Zeitpunkt in beiden Untergruppen und in beiden Infektionsexperimenten ausschließlich milde Symptome auf. In allen anderen Linien traten in der D₀-positiven Population weniger als 50 % keine oder milde Symptome auf. Im Gegensatz dazu konnten keine oder milde Symptome in mehr als 50 % der D₀-negativen Fraktion der Linien 84101T (E# 2), 84107K (E# 1 und E# 2), 84111K (E# 1 und E# 2), 84124T (E# 1), 84142T (E# 2), 84147T (E# 2), 84151T (E# 1), 84164T (E# 2) dokumentiert werden.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass die Linien 05-032T, 84107K und 84111K auch 13 wpai einen hohen Prozentsatz gesunder oder mild-symptomatischer Pflanzen aufwiesen. Während dies bei 05-032T bei beiden Untergruppen (D₀-positiv und -negativ) der Fall war, traten mildere Symptome bei 84107K und 84111K nur in nicht-transreplizierenden Pflanzen auf. Pflanzen von Linie 84124T, die aufgrund der vorherigen Untersuchungen mittels PCR-Analyse (Lauster, 2000) in den Fokus rückten, waren in der D₀-positiven Gruppe 13 wpai vollständig abgestorben. Milde Symptome traten zu diesem Zeitpunkt nur in der D₀-negativen Population auf.

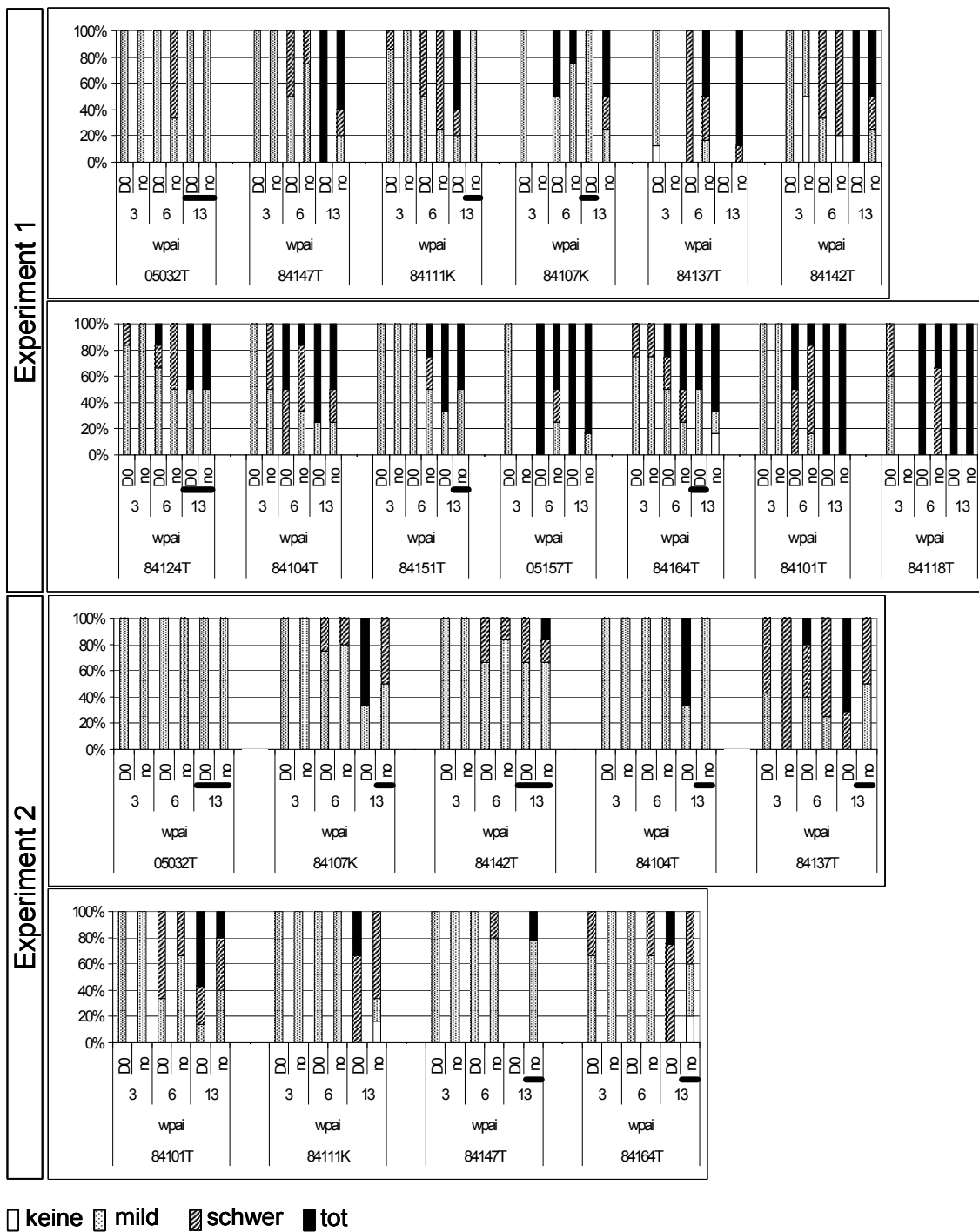


Abbildung 9: Symptomverteilung in den Einzellinien zwischen D₀-positiven (+) und -negativen (-) Pflanzengruppen. Dargestellt sind nur Linien mit mehr als 5 Einzelpflanzen. Die Gesamtheit aller Pflanzen in einer Untergruppe entspricht 100 %. Das Auftreten von keinen oder milden Symptomen zu mehr als 50 % wurde beim Zeitpunkt 13 wpai durch einen schwarzen Strich markiert.

Da die Analyse der Symptomverteilung in den Einzellinien nicht aufschlussreich war, wurden die Gesamtdaten zu den drei Infektionszeitpunkten 3, 6 bzw. 13 wpai vereinigt und mittels χ^2 -Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede der Symptomverteilungen untersucht. Da beide Infektionsrunden signifikante Abweichungen

voneinander zeigten, wurden sie jedoch getrennt analysiert.

Zunächst wurde untersucht, ob die Transreplikation der D₀-DNA maßgeblich für eine unterschiedliche Symptomausprägung ist. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, war lediglich für 13 wpai in Experiment 2 eine Signifikanz der Unterschiede der Symptomverteilung zu errechnen ($\chi^2 = 19,7$, $P < 0,001$). In diesem Fall traten in den transreplizierenden Pflanzen häufiger schwere Symptome und abgestorbene Pflanzen auf (26 % schwer, 50 % tot) als in der nicht-transreplizierenden Population (26 % schwer, 12 % tot). Dies und die tendenziellen Ergebnisse der Einzellinien (vgl. Abbildung 9) ließen vermuten, dass die D₀-DNA nicht den erhofften Effekt in den transgenen Pflanzen hatte.

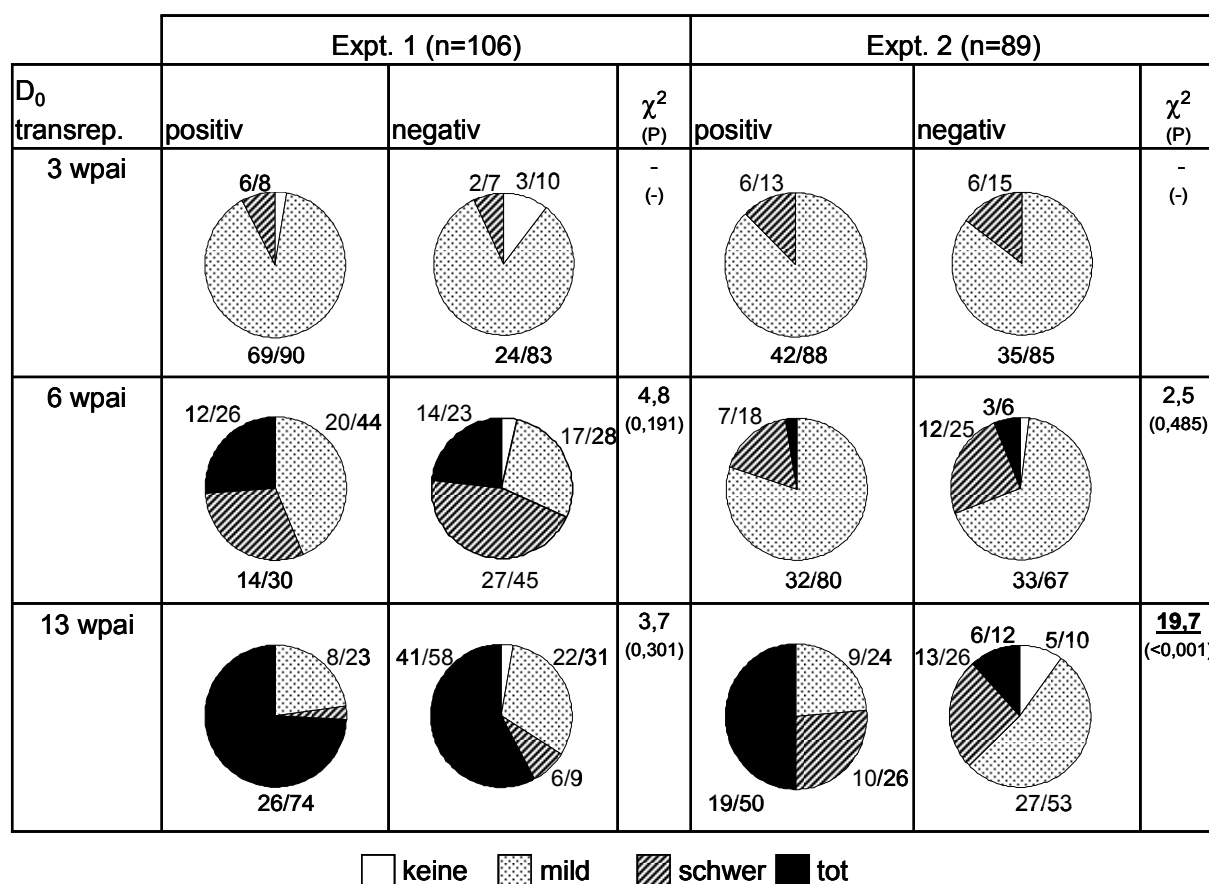


Abbildung 10: Symptomverteilung der Pflanzen in Abhängigkeit von der Transreplikation der D₀-DNA (D₀ transrep.). Tortendiagramme für alle untersuchten Pflanzen, die in zwei Untergruppen gegliedert wurden, die D₀-DNA transreplizierten (positiv) bzw. nicht transreplizierten (negativ). Die statistische Auswertung wurde mittels χ^2 -Test durchgeführt. Die angegebenen χ^2 -Werte beziehen sich auf den Vergleich beider Untergruppen pro unabhängigem Experiment (Expt. 1 und Expt. 2). χ^2 -Werte >7,815 zeigen signifikante Unterschiede an (Werte fett und unterstrichen dargestellt). Konnte der Test aufgrund zu geringer Probenanzahl nicht durchgeführt werden, ist dies durch „-“ gekennzeichnet. Zu jedem χ^2 -Wert wurde die Fehlerwahrscheinlichkeit (P) in Klammern angegeben.

Mit Hilfe der RCA/RFLP-Analyse konnte ein breites Spektrum an D-DNAs nachgewiesen werden. Da die statistische Auswertung eine scheinbar negative Auswirkung der D₀-DNA auf die Symptome zeigte, wurden die Daten neu ausgewertet. Durch den χ^2 -Test sollte dargestellt werden, ob eine unterschiedliche Symptomverteilung in Pflanzengruppen auftrat, die positiv bzw. negativ für D_n-DNAs waren (vgl. Abbildung 11). Zu zwei Zeitpunkten waren die Unterschiede statistisch signifikant (E# 1: 13 wpai: $\chi^2 = 10,4$, P = 0,015; E# 2: 6 wpai: $\chi^2 = 12,2$, P = 0,007). Der optische Vergleich der Tortendiagramme in Experiment 1 für den Zeitpunkt 13 wpai ergab, dass schwere Symptome mit der Abwesenheit von D_n-DNAs verbunden waren.

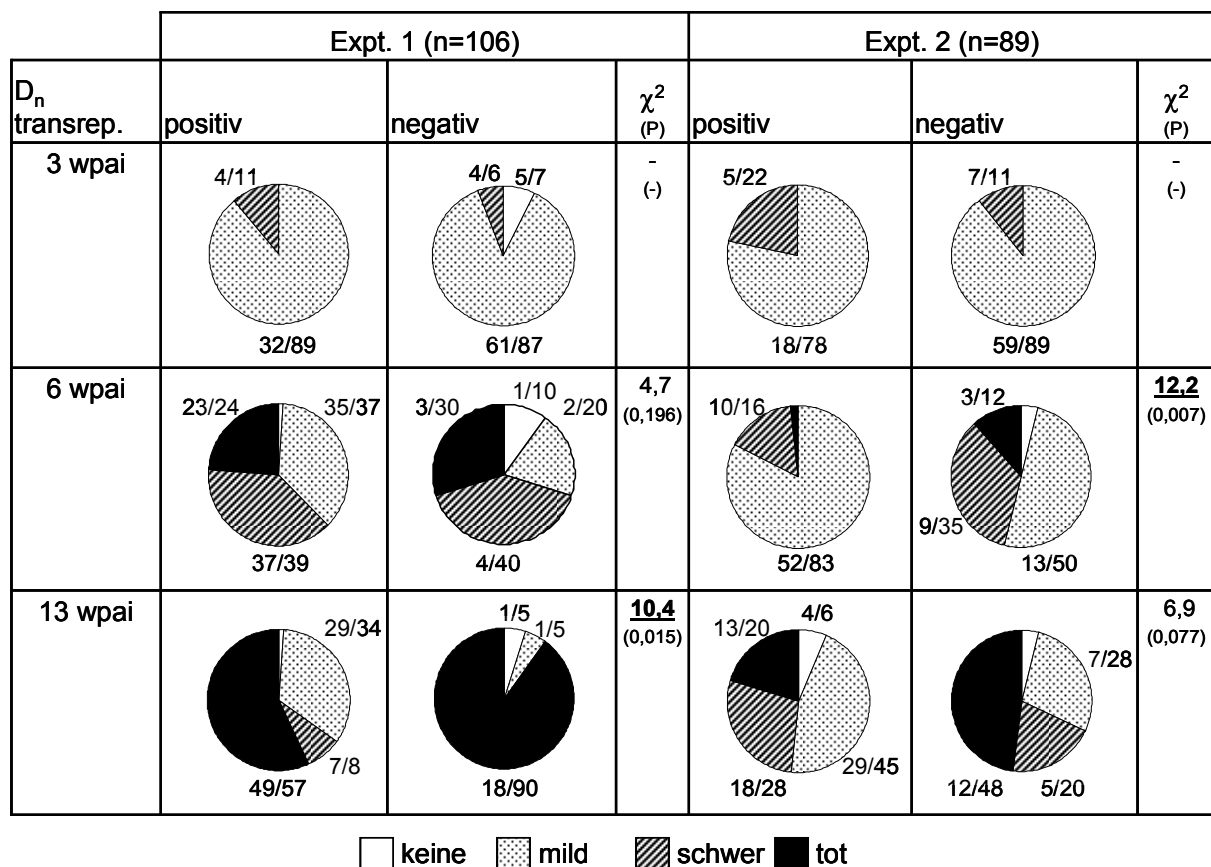


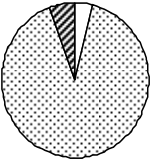
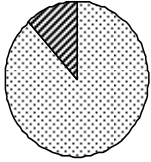
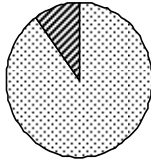
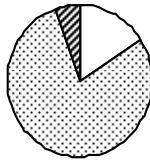
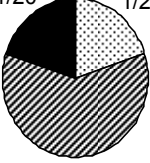
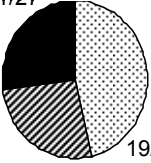
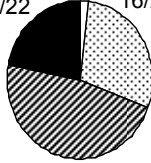

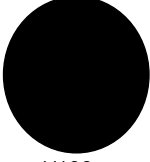
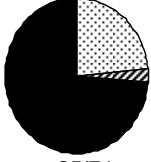
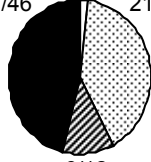
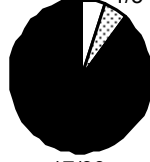
Abbildung 11: Symptomverteilung der Pflanzen in Abhängigkeit von der Transreplikation der D_n-DNA (D_n transrep.). Tortendiagramme für alle untersuchten Pflanzen, die in zwei Untergruppen gegliedert wurden, die D_n-DNA transrepliziert (positiv) bzw. nicht transrepliziert (negativ). Die statistische Auswertung wurde mittels χ^2 -Test wie in Abbildung 10 beschrieben durchgeführt.

Die Hinweise auf einen symptomabschwächenden Effekt der D_n-DNAs wurden durch eine weitere Analyse der ursprünglichen Daten bestärkt (s. Abbildung 12). Hierzu wurden die Pflanzen in vier Untergruppen eingeteilt. Pflanzen ohne D-DNA, Pflanzen

mit D₀- oder D_n-DNA und die Gruppe, in der beide D-DNAs gleichzeitig repliziert wurden. Zu drei Zeitpunkten war die Symptomverteilung zwischen den vier Untergruppen statistisch signifikant. In Experiment 1 (s. Abbildung 12a) waren zum Zeitpunkt 13 wpai ($\chi^2 = 17,8$, $P = 0,038$) die Pflanzen mit den mildesten Symptomen in der D_n-DNA-Gruppe zu finden (2 % ohne Symptome, 40 % mit milden Symptomen). Während in der Untergruppe mit D₀- und D_n-DNA immerhin fast ein Viertel der Pflanzen milde Symptome zeigte, überwog in den beiden anderen Gruppen (D₀- bzw. keine D-DNA) deutlich die Anzahl toter Pflanzen. In der D₀-Gruppe waren sogar alle Pflanzen abgestorben. Bei der Analyse der Daten von Experiment 2 traten die gleichen Zusammenhänge auf (vgl. Abbildung 12b). Hier konnten für 6 und 13 wpai statistisch signifikante Abweichungen der Symptomverteilungen errechnet werden (6 wpai: $\chi^2 = 19,0$, $P = 0,025$; 13 wpai: $\chi^2 = 36,2$, $P < 0,001$). Zum Zeitpunkt 6 wpai war lediglich zu sehen, dass die Pflanzen ohne D-DNAs mit 39 % öfter schwere Symptome ausbildeten als Pflanzen in den anderen drei Gruppen (D₀: 25 %; D₀/D_n bzw. D_n: 16 %). Beim Vergleich der Verteilungen für 13 wpai wurden jedoch erneut die Ergebnisse von Experiment 1 bestätigt. Während in der D₀-Gruppe wiederholt alle Pflanzen abgestorben waren, konnten in der D₀/D_n-Gruppe immerhin 28 % milde Symptome, in der Gruppe ohne D-DNA 37 % milde Symptome und 5 % asymptomatische Pflanzen gezählt werden. Die D_n-DNA Gruppe hingegen umfasste 13 % symptomlose und 63 % mild-symptomatische Pflanzen.

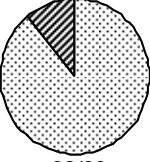
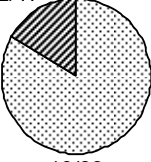
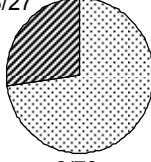
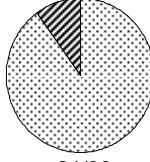
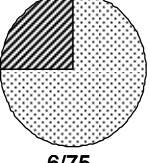
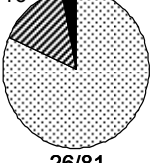
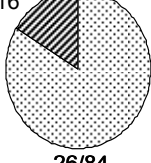
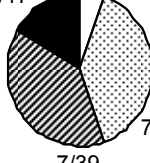
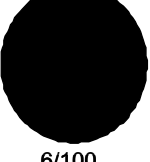
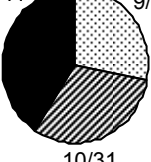
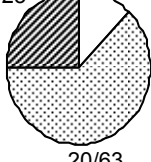

Expt. 1 (n=106)

a

	D_0	D_0 und D_n	D_n	keine D	χ^2 (P)
3 wpai	 3/6 46/90	 3/12 23/89	 1/10 9/90	 1/5 3/16 15/79	- (-)
6 wpai	 1/20 1/20 3/60	 11/27 11/27 19/46	 12/22 16/29 26/47	 2/40 1/20 1/20 1/20	16,6 (0,055)
13 wpai	 1/100	 8/24 25/74	 24/46 21/40 6/12	 1/5 1/5 17/90	17,8 (0,038)

Expt. 2 (n=89)

b

	D_0	D_0 und D_n	D_n	keine D	χ^2 (P)
3 wpai	 4/11 32/89	 2/17 10/83	 3/27 8/73	 3/10 21/90	- (-)
6 wpai	 2/25 6/75	 5/16 26/81	 5/16 26/84	 3/17 1/6 7/39 7/39	19,0 (0,025)
13 wpai	 6/100	 13/41 9/28 10/31	 8/25 4/13 20/63	 6/32 1/5 7/37 5/26	36,2 (<0,001)

 keine
  mild
  schwer
  tot

Abbildung 12: Reanalyse der in Abbildung 10 und 11 dargestellten Daten. Hierbei wurde zwischen Pflanzengruppen unterschieden, die keine D-DNA, D₀ oder D_n oder beide D-DNA-Typen replizierten. Die Daten sind für die beiden unabhängigen Experimente (a: Expt. 1; b: Expt. 2) als Tortendiagramme dargestellt. χ^2 -Werte >16,92 zeigen signifikante Unterschiede an (Werte fett und unterstrichen dargestellt). Konnte der Test aufgrund zu geringer Probenanzahl nicht durchgeführt werden, ist dies durch „-“ gekennzeichnet. Zu jedem χ^2 -Wert wurde die Fehlerwahrscheinlichkeit (P) in Klammern angegeben.

Um eine bessere Aufschlüsselung der Unterschiede zu erreichen, wurden die Gruppen paarweise gegenüber gestellt. Dabei wurde besonders deutlich, dass beim Vergleich der D_n-Population mit den restlichen drei Gruppen in D_n-Pflanzen mit statistischer Signifikanz mildere Symptome auftraten (s. Tabelle 19). Für Experiment 1 zum Zeitpunkt 13 wpai gab es lediglich in der Gegenüberstellung der Gruppen „D_n-replizierend“ und „ohne D-DNA“ eine signifikante Abweichung der Symptomverteilung ($\chi^2 = 12,8$, P = 0,009). Wie bereits an Abbildung 12a erläutert, traten in der D_n-Gruppe die mildesten Symptome auf. Die Analyse von Experiment 2 ergab für vier Paarungen statistische signifikante Unterschiede. D_n-positive Pflanzen wiesen sowohl gegenüber D₀- ($\chi^2 = 38,0$, P < 0,001), D₀/D_n- ($\chi^2 = 21,4$, P < 0,001) als auch D-DNA-freien Pflanzen ($\chi^2 = 12,2$, P = 0,007) signifikante Abweichungen in den Symptomverteilungen auf. Es wurde zuvor mittels Abbildung 12b beschrieben, dass in der D_n-Gruppe die mildesten Symptome auftraten. Auch eine statistisch unterschiedliche Symptomverteilung zwischen D₀-positiven und D-DNA-freien Pflanzen konnte für Experiment 2 gezeigt werden ($\chi^2 = 8,6$, P < 0,036).

Tabelle 19: Analyse der Daten als paarweiser Vergleich. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden jeweils zwei der Untergruppen miteinander verglichen und die Symptomausprägungen mittels χ^2 -Test verglichen. χ^2 -Werte und korrespondierende P-Werte (in Klammern) sind angegeben. χ^2 -Werte über der Signifikanzschwelle von 7,815 sind fett und unterstrichen dargestellt. Analyse aufgrund der Gruppengröße nicht möglich: „-“.

		3			6			13		
wpai:		D ₀	D ₀ /D _n	D _n	D ₀	D ₀ /D _n	D _n	D ₀	D ₀ /D _n	D _n
D-DNA:		D ₀	D ₀ /D _n	D _n	D ₀	D ₀ /D _n	D _n	D ₀	D ₀ /D _n	D _n
Experiment 1	D ₀ /D _n	- (-)			- (-)			- (-)		
	D _n	- (-)	- (-)		0,4 (0,943)	5,5 (0,141)		1,1 (0,767)	7,0 (0,073)	
	keine D	- (-)	- (-)	- (-)	2,3 (0,506)	<u>9,3</u> (0,026)	6,1 (0,107)	- (-)	5,1 (0,162)	<u>12,8</u> (0,005)
Experiment 2	D ₀ /D _n	- (-)			- (-)			- (-)		
	D _n	- (-)	- (-)		- (-)	- (-)		<u>38,0</u> (<0,001)	<u>21,4</u> (<0,001)	
	keine D	- (-)	- (-)	- (-)	3,5 (0,317)	<u>10,2</u> (0,017)	<u>12,7</u> (0,005)	<u>8,6</u> (0,036)	2,3 (0,506)	<u>12,2</u> (0,007)

Zusammenfassend gaben die statistischen Analysen der verschiedenen Aufteilungen der Rohdaten Anlass zu der Annahme, dass die Transreplikation der D₀-DNA eher einen negativen Einfluss auf die Symptome hatte. Im Gegensatz dazu war die Amplifikation von D_n-DNAs mit mildereren Symptomen assoziiert. Aufgrund der limitierten Populationsgröße konnten keine statistisch unterlegten Aussagen über Unterschiede der Symptomverteilungen zwischen einzelnen Linien gemacht werden. Einige Linien wiesen jedoch eine gewisse Toleranz gegenüber der Infektion auf (9K9010, 05-032T, 84107K, 84111K und 84124T).

1.2 Sequenzanalyse der D₀-DNA

Die Sequenz des transreplizierten Transgens sollte der theoretischen Sequenz der D₀-DNA (Frischmuth und Stanley, 1994) gegenüber gestellt werden. Die Gesamtnukleinsäuren einer Zuckerrübe (L# 84124T P# 4, 3 wpai, E# 2) wurden isoliert und virale und defekte DNAs mittels RCA/RFLP-*Sal*I-Analyse untersucht. Nach Religation der D₀-DNA von 1271 bp und erneuter Restriktion mit *Sal*I wurde das Fragment in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert und zur Selektion in *E. coli* DH5α transformiert. Mit Hilfe der Standardprimer M13F(-20) und M13R(-20) konnten bereits überlappende Sequenzen erhalten werden, was schrittweises Sequenzieren überflüssig machte. Der vollständige Nukleotid-Sequenzvergleich von BCTV, der D₀-DNA nach Frischmuth und Stanley (1994) und der klonierten D₀-DNA ist im Anhang (XI.5.2) beigefügt. Die Deletion der Nukleotide 585 bis 2306 konnte bestätigt werden. Die erwartete und beobachtete Sequenz stimmten bis auf einen Austausch von Guanin gegen Thymin an Position 2359 von BCTV überein (vgl. Abbildung 13). Diese Punktmutation wurde in vier sequenzierten Klonen bestätigt. Es ist wahrscheinlich, dass der Austausch durch Mutation innerhalb der Pflanze entstanden ist, da die Infektionsdauer zum Zeitpunkt der Entnahme drei Wochen betrug.

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                2350      2360      2370      2380      2390      2400
BCTV      ATACTATTAT ATCTTAAAGG CCGCGCAGCG GCATCAACCC CGAAATATGC ATCAGCCCAT
D0 erw.   .....
D0 3wpai .....T.....

```

Abbildung 13: Ausschnitt des Nukleotid-Sequenzvergleiches von viraler und D₀-DNA in viraler Orientierung. Die Nummerierung ist in Relation zu BCTV dargestellt. BCTV: BCTV-A[US:85:Cal], D₀ erw.: erwartete Sequenz nach Frischmuth und Stanley (1994), D₀ 3wpai: Sequenz der aus einer Zuckerrübe isolierten D₀-DNA. Der Austausch G₂₃₅₉T ist grau unterlegt, Übereinstimmungen mit der Referenzsequenz von BCTV sind durch Punkte „.“ dargestellt. (vollständige Daten s. XI.5.2).

Abbildung 14 zeigt die Genomorganisation der D₀-DNA. Durch die Deletion der Nukleotide 585 bis 2306 wurden die ORFs V1, C2 und C3 vollständig entfernt. C1 (Rep), V2 und V3 könnten weiterhin als verkürzte Proteine exprimiert werden. Einzig der C4-ORF lag unverändert vor, für den zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend geklärt ist, welches Startcodon verwendet wird. In der vorliegenden Sequenz von BCTV-A[Ca] konnten vier ATGs identifiziert werden, die im gleichen Leseraster wie das C4-Stoppcodon liegen, welches als gesichert gilt.

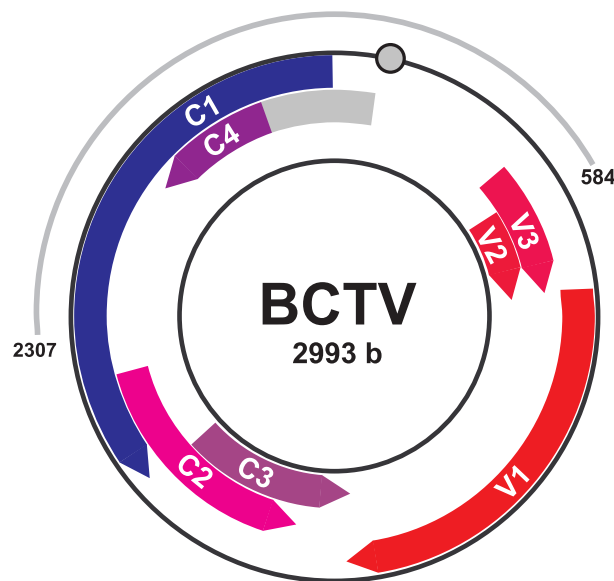


Abbildung 14: Genomorganisation der D₀-DNA. Die Elemente des Genoms sind wie in Abbildung 1 dargestellt. Der potentielle verlängerte ORF von C4 ist als graue Verlängerung des Pfeiles dargestellt. Der Sequenzbereich, der in der D₀-DNA erhalten blieb, ist als hellgrauer Bogen dargestellt und seine äußersten Nukleotide wurden angegeben. Die Länge der D₀-DNA beträgt 1271 Nukleotide.

Mit Hilfe des Onlineprogrammes PLACE wurde die BCTV-Sequenz auf das Vorhandensein und die Position regulatorischer Elemente untersucht (Higo *et al.*, 1999; Prestridge, 1991). Dabei konnten zwei der ATGs im Leseraster des C4-Stoppcodons als mögliche Startcodons ausgeschlossen werden, da sie vor TATA-Box und Transkriptionsstart liegen (ATG# -1 und ATG# -2, vgl. Abbildung 15). Das im Folgenden als „ATG# 1“ bezeichnete Startcodon liegt zwischen TATA-Box und C1-Startcodon. „ATG# 2“ liegt hinter dem ATG von C1. Entsprechend wurden die ORFs als C4.1 und C4.2 bezeichnet.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2570      2580      2590      2600      2610      2620      2630      2640
v GGTC AAGAGA AGTTGCGTTT AACGCCTTGG CATATGAGTC GTTAGCTGTC TGTTGACCTC CTCTAGCACT TCTACCGTCG
c CCAGTTCCT TCAACGCAAA TGC GGAACC GTATACTCAG CAATCGACAG ACAACTGGAG GAGATCGTGA AGATGGCAGC
      Stop C4

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2650      2660      2670      2680      2690      2700      2710      2720
v ATCTGGAATT CTCCCCATTC AATTGTGTCT CCGTCCTTGT CGACGTAGGA CTTGACGTCG GAGCTGGATT TAGCTCTCTG
c TAGACCTTAA GAGGGGTAAG TTAACACAGA GGCAGGAACA GCTGCATCCT GAACTGCAGC CTCGACCTAA ATCGAGAGAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2730      2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800
v AATGTTTGGA TGGAAATGTG CTGACCTGGT TGGGGATACC AGGTCGAATA ATCTGATATT TGTGATCTGA ACTTTTCCTT
c TTACAAACCT ACCTTTACAC GACTGGACCA ACCCCTATGG TCCAGTTAT TAGACTATAA AACTAGACT TGAAAAGGAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870      2880
v CGAGTTGAAG CAGGACGTGG AGATGAGGTT GCCCATCTTC GTGTAGCTCT CTGGCAATTT TAATATATTT TTTATTAGAT
c GCTCAACTTC GTCTGCACC TCTACTCAA CGG GTA GAAG CACATCGAGA GACCGTTAAA ATTATATAAA AAATAATCTA
      ATG# 2 C4

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2890      2900      2910      2920      2930      2940      2950      2960
v GAAAGTTGTA TTCTTTGAAT TTGCTCAAGA GCTTCTTCTT TTGAAAGAGA AACTGAGGA TATGTAAGAA ATATGTTTTT
c CTTTCAACAT AAGAACTTA AACGAGTTCT CGAAGAAGAA AACTTTCTCT TGTGACTCCT ATACATTCTT TATACAAAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      2970      2980      2990      3000      3010      3020      3030      3040
v TGCTTGAATA CGAAATCTTT TAGTAGGAGG CATTGTACTC CGATGACGTG GCTTAGCATA TTAACATATC TATTGGAGTA
c ACGAACTTAT GCTTTAGAAA ATCATCTCC GTAACATGAG GCTACTGCAC CGAATCCTAT AATTGTATAG ATAACCTCAT
      Start C1      ATG# 1 C4      Transkriptionsstart

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      3050      3060      3070      3080      3090      3100      3110      3120
v TTGGAGTATT ATATATATTA GTACAACTTT CATAAGGGCC ATCCGTTATA ATATTACCGG ATGGCCCGAA AAAAATGGGC
c AACCTCATAA TATATATAAT CATGTTGAAA STATTCCCGS TAGGCAATAT TATAATGGCC TACCGGGCTT TTTTACCCG
      TATA-Box      ATG# -1 C4      ATG# -2 C4

```

Abbildung 15: Sequenzausschnitt der D₀-DNA mit regulatorischen Elementen. Die regulatorischen Elemente wurden mit dem Onlineprogramm PLACE bestimmt (Higo *et al.*, 1999; Prestridge, 1991). Die Sequenz ist in viraler (v) und komplementärer Orientierung (c) angegeben. Das Startcodon von C1 ist blau dargestellt, das zugehörige Stoppcodon ist in dieser Aufzählung nicht enthalten. Das C4-Stoppcodon ist grün unterlegt. Die Iterons TATTGGAG (Arguello-Astorga *et al.*, 1994) wurden mit roten Pfeilen gekennzeichnet, ein mögliches partielles invertiertes Iteron befindet sich in der Nähe des Startcodons von C1. Für C4 wurden vier mögliche Startcodons (grün) gefunden, von denen zwei vor TATA-Box und Transkriptionsstart liegen (beide durch rote Rahmen markiert). Die Startcodons wurden ausgehend vom Transkriptionsstart nummeriert.

1.3 Sequenzanalyse später D_n-DNAs

Neunzehn der unter VI.1.1 charakterisierten Zuckerrüben konnten über einen Zeitraum von mehr als anderthalb Jahren nach Inokulation unter gleichen Wachstumsbedingungen kultiviert werden. Die Gruppe umfasste sechs uninfizierte Kontrollpflanzen und dreizehn infizierte Pflanzen (s. Tabelle 20).

Tabelle 20: Langzeitüberlebende Zuckerrüben. Die Zuckerrüben erhielten bei der Isolation der Gesamtnukleinsäuren eine laufende Nummer. Die im Folgenden charakterisierten D_n-DNAs wurden entsprechend dieser Nummer benannt, und die zur Analyse verwendeten Pflanzen sind in dieser Tabelle grau unterlegt.

Laufende Nummer	Linie	Pflanze	Inokuliert	Experiment	Kultivationsdauer nach Inokulation
1	84124T	3	+	1	20 Monate
2		4			
3		9			
4	84137T	1	-	2	14 Monate
5	84151T	1			
6	9K9010	3	+		
7	84142T	1	-		
8	84124T	2	+		
9		3			
10	05-032T	4			
11	84124T	4	-		
12		1			
13	84104T	6	+		
14		10			
15		4			
16		1	-		
17	84111K	8	+		
18	9K9010	1	-		
19		2	+		

Da die Gegenwart von D_n-DNAs schwere Symptome zu vermeiden schien (s. VI.1.1.3), sollten einige der Moleküle charakterisiert werden. Wie bereits zu früheren Zeitpunkten wurden die Einzelpflanzen 14 (Pflanzen aus E# 2) bzw. 20 Monate nach Agroinokulation (Pflanzen aus E# 1) durch RCA/RFLP-*Sa*I und -*Nco*I-Analyse auf Replikation von Virus und D-DNAs untersucht (vgl. Abbildung 16). Infizierte Pflanzen replizierten sowohl BCTV als auch eine Vielzahl an D_n-DNAs. Hierbei war auffällig, dass BCTV im Vergleich zu den D_n-DNAs oft unterrepräsentiert war. Eine große D_n-DNA von 2,5 kb wurde in den Zuckerrüben amplifiziert, mit Ausnahme der Pflanzen 3 und 4 der Linie 84124T (E# 1).

Die D_n -DNAs der Pflanzen 84124T #4 (E# 1), #2, #3, #4 und 84111K #8 (E# 2) wurden zur Charakterisierung ausgewählt (vgl. Tabelle 20). Im Weiteren werden die Pflanzen entsprechend der in Tabelle 20 angegebenen laufenden Nummer bezeichnet. Die RCA-Produkte wurden mit *Sa*I linearisiert und religiert bzw. direkt in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert. Zur Selektion wurden die Ligationsprodukte in *E. coli* DH5 α transformiert und positive Klone nach Analyse durch *Colony-RCA/RFLP-Sa*I ausgewählt. Die Größen der Inserts betragen zwischen 1340 und 2810 Nukleotide. Zur Sequenzierung wurden die Standardprimer M13F(-20) und M13R(-20) verwendet. Wenn die erhaltenen Sequenzen nicht überlappten, wurden sie durch *primer walking* vervollständigt (s. V.1.6). Von den 20 sequenzierten D_n -DNAs entsprachen 15 mit durchschnittlich 1550 nts etwa der halben Größe ihres Elternvirus. Die weiteren fünf Moleküle hatten eine Länge zwischen 2180 und 2810 nts was zeigte, dass eine hohe Größenvariabilität auch im Bereich hochmolekularer D_n -DNAs vorherrscht. Jeweils eine D_n -DNA stammte aus den Pflanzen #2 und #11, fünf D_n -DNAs aus Pflanze #8 und sechs bzw. sieben aus den Pflanzen #9 und #17. Die D_n -DNAs wurden im Folgenden entsprechend der laufenden Nummer ihrer Ursprungspflanze (s. Tabelle 20) und nach absteigender Größe mit einem Buchstaben bezeichnet. Aus Pflanze #17 wurden zwei D_n -DNAs von 1581 nts isoliert, die sich nur an Nukleotidposition 348 (Nummerierung in Bezug auf BCTV) unterschieden. Während in [17c.1] das Thymin des Elternvirus konserviert war, wurde in [17c.2] der Austausch T₃₄₈G gefunden.

Die 20 charakterisierten D_n -DNAs (vollständige Sequenzen s. IX.5.1) wurden in Bezug zur DNA von BCTV kartiert, um die Deletionen zu visualisieren. Wie in Abbildung 17 dargestellt, sind in den D_n -DNAs sowohl die viralen, als auch die komplementären ORFs von Deletionen betroffen. Häufig fanden Deletionseignisse in zwei Regionen des Genoms statt, deren äußere Grenzen die Nukleotide 348 und 1361 bzw. 1597 und 2330 bildeten (Nummerierung in Bezug zu BCTV). In fünf D_n -DNAs ([8d-e] und [17d-f]) wurden zudem kürzere Sequenzbereiche zwischen 137 und 214 bp deletiert, die zwischen den Nukleotiden 2749 bis 2979 lagen und somit den C4-ORF betrafen. Die Nukleotide 1773 bis 1833 waren in allen D_n -DNAs deletiert. 15 der insgesamt 20 D_n -DNAs (75 %) waren diskontinuierlich, d.h. sie enthielten zwei oder mehr Deletionen.

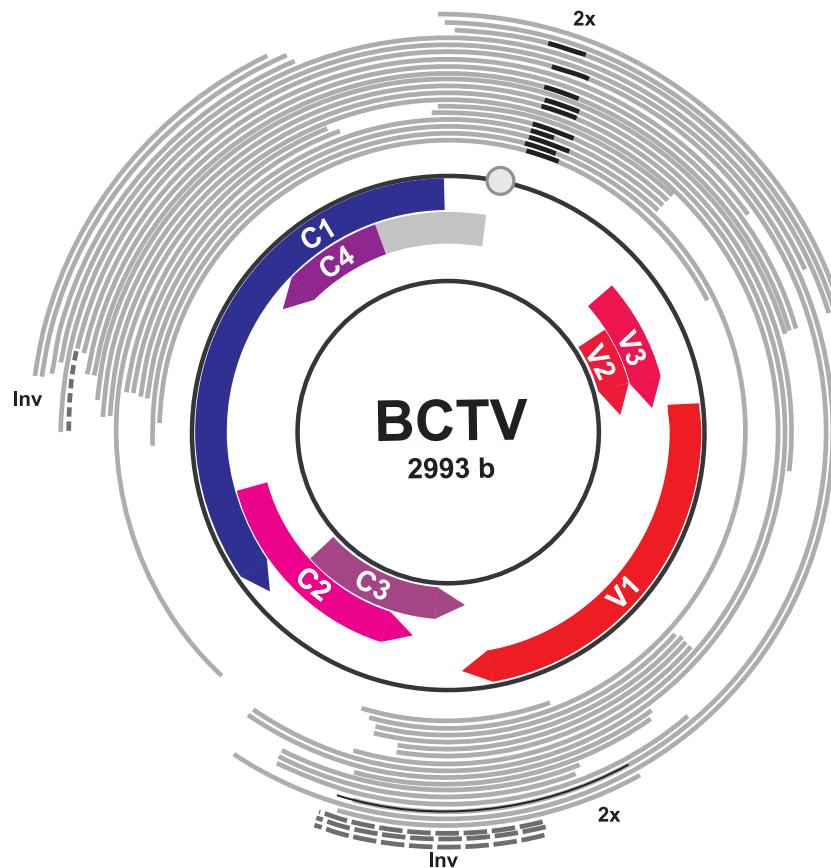


Abbildung 17: Genomorganisation von BCTV und zwanzig charakterisierten D_n-DNAs. Die Elemente des Genoms sind wie in Abbildung 1 dargestellt. Der potentielle verlängerte ORF von C4 ist als graue Verlängerung des Pfeiles dargestellt. Die Sequenzbereiche, die in den D_n-DNAs erhalten blieben, sind als hellgraue Bögen dargestellt. Die D_n-DNAs wurden von innen nach außen wie folgt sortiert: [2], [8a-e], [9a-f], [11] und [17a-f]. Die schwarzen Linien zeigen die Duplikationen an („2x“), während die gestrichelten dunkelgrauen Bögen („inv“) Inversionen anzeigen. Die invertierten Nukleotide sind an ihrem Ursprungsbereich platziert.

In allen Sequenzen war die Nonanukleotidsequenz TAATATTAC unverändert, womit eine Transreplikation durch Rep des Elternvirus sichergestellt ist.

Die Sequenzen der D_n-DNAs wurden auf die Integrität der ORFs hin untersucht. In den wenigsten Fällen jedoch waren die ORFs komplett erhalten (vgl. Abbildung 17). **C1** war ausschließlich in D_n-DNA [9a] vollständig erhalten, wobei keine Abweichungen zum Elternvirus in Nukleotid- und Aminosäuresequenz auftraten. Somit war sie das einzige defekte Molekül, das zur Initiierung der Replikation nicht auf BCTV angewiesen ist. D_n-DNAs [8d-e] und [17d-f] trugen eine Deletion im zentralen Bereich und in Teilen des C-Terminus. Alle anderen D_n-DNAs waren ausschließlich C-terminal deletiert. **C2** war durchweg von Deletionen betroffen und in D_n-DNAs [8b-e] vollständig entfernt. Ein großer mittlerer Bereich wurde in [9a] ausgeschnitten, während 3'-terminale Sequenzen unterschiedlicher Länge (2 nts in [9d] bis 169 nts in

[9b-c]) in den übrigen D_n -DNAs konserviert waren. Auf keinem der untersuchten Moleküle konnte ein funktioneller **C3**-ORF gefunden werden. Der mittlere Bereich von C3 war in [9a] deletiert. Außer in [17d-f] waren C-terminale Bereiche erhalten geblieben. **C4** war der ORF, der in den untersuchten D_n -DNAs am häufigsten intakt war (vgl. Abbildung 18). 15 der 20 (75 %) Moleküle wiesen beide möglichen Startcodons und das Stoppcodon (im Sequenzvergleich gelb unterlegt) auf. [8d-e] und [17d-f] zeigten wie schon für C1 beschrieben eine Deletion der mittleren Nukleotide (138 bis 284 nts Länge) und daher ein fehlendes zweites Startcodon. Sollte die Translation am ersten ATG beginnen, könnte für diese D_n -DNAs möglicherweise ein fusioniertes Genprodukt bestehend aus N- und C-Terminusbereichen erwartet werden. Einzelnukleotidaustausche in den C4-ORFs betrafen vor allem C₂ (50 % der D_n -DNAs mit C→A) und A₆₅ (55 % A→G, 5% A→C). Weitere Mutationen traten an den Positionen A₁ (10 % A→C), T₁₀ (10 % T→G), A₅₆ (15 % A→G), G₂₅₈₃ (10 % G→T), C₂₇₂₉ (5 % C→A), A₂₉₅₉ (5 % A→C) und A₂₉₇₉ (5 % A→C) auf.

Abbildung 18: Übersicht des Nukleotid-Sequenzvergleiches von C4 aus BCTV und seinen D_n-DNAs. Beide möglichen Startcodons (Nukleotide 89-87 bzw. 2836-2834) und das Stoppcodon (Nukleotide 2581-2579) sind gelb, von der Originalsequenz abweichende Nukleotide grau unterlegt. Deletionen im Bereich des ORFs sind durch Punkte dargestellt. D_n-DNAs, die Deletionen enthalten, wurden in hellgrauer Schrift dargestellt.

In silico-Translation mit Hilfe des Programmes Bioedit (Hall, 1999) ergab eine geringe Anzahl an Aminosäureaustauschen. Abbildung 19 zeigt den Aminosäure-Sequenzvergleich von C4 der D_n-DNAs, die nicht von Deletionen in dem Bereich betroffen waren (vgl. Abbildung 18). Für das verkürzte Genprodukt konnte lediglich ein Austausch gefunden werden (R₁₆₇L), der in den D_n-DNAs [9e-f] auftrat. Dies hat den Austausch einer basischen zu einer hydrophoben Aminosäure zur Folge. Der *core*-Bereich des C4-Proteins (Stanley *et al.*, 1992) umfasst dessen Kurzform (ATG# 2), und außer der genannten Mutation konnten keine Austausche gefunden werden. Da beide möglichen ATGs in einem Leseraster liegen, ist R₁₆₇L auch in der verlängerten C4-Version zu finden. Der Austausch I₉V lag in sieben D_n-DNAs ([2], [8a-c], [9a], [11], [17a] und [17b]) vor, und I₉L trat in [9d] auf. I₁₁ wurde gegen V in [9b], [9c] and [9f] ausgetauscht. Beide Male wurde der hydrophobe Charakter durch den Austausch erhalten. Des Weiteren traten Q₃₀K in [8a-c], [9a-b], [9d], [11] und [17a] auf (neutral nach basisch) und Q₃₀P in [17c.1] und [17c.2] (neutral nach hydrophob) auf. Das basische K₃₅ wurde in D_n-DNA [2] gegen ein neutrales T ausgetauscht, während K₄₂ bei [17a] in ein neutrales Q umgewandelt wurde.

	10	20	30	40	50	60	70
BCTV-A [Ca1]	MALMKVVLIIY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVQ	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [2]	MALMKVVLIVY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVQ	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [8a]	MALMKVVLIVY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVK	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [8b]	MALMKVVLIVY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVK	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [8c]	MALMKVVLIVY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVK	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [9a]	MALMKVVLIVY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVK	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [9b]	MALMKVVLIIY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVK	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [9c]	MALMKVVLIIY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVQ	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [9d]	MALMKVVLIIY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVK	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [9e]	MALMKVVLIIY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVQ	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [9f]	MALMKVVLIIY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVQ	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [11]	MALMKVVLIVY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVK	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [17a]	MALMKVVLIVY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVK	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [17b]	MALMKVVLIVY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVQ	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [17c.1]	MALMKVVLIIY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVP	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI
D-DNA [17c.2]	MALMKVVLIIY	IILQYSNRYV	NMLSHVIGVP	CLLLKDFVFK	QKTYFLHILS	VLQKQKLLS	KFKEYNFHLI

	80	90	100	110	120	130	140
BCTV-A [Ca1]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [2]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [8a]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [8b]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [8c]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [9a]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [9b]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [9c]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [9d]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [9e]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [9f]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [11]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [17a]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [17b]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [17c.1]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ
D-DNA [17c.2]	KNILKLPESY	TKMGNLISTS	CFNSKEKFRS	QISDYSTWYP	QPGQHISIQT	FRELNPAPTS	SPTSTRTETQ

	150	160	
BCTV-A [Ca1]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [2]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [8a]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [8b]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [8c]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [9a]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [9b]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [9c]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [9d]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [9e]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [9f]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [11]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [17a]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [17b]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [17c.1]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*
D-DNA [17c.2]	LNGENSRSTV	EVLEEVRQL	TTHMPRR*

Abbildung 19: Aminosäure-Sequenzvergleich von C4 aus BCTV und den D_n-DNAs. Der Sequenzvergleich zeigt nur die D_n-DNAs, die beide möglichen ORF-Varianten von C4 (s. Abbildung 18) enthielten. Die beiden möglichen kotranslational entfernten ersten Methionine beider Proteinvarianten sind gelb unterlegt. Die Aminosäuren sind entsprechend ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften markiert: hydrophob/unpolar, pink; basisch, grau; neutral/polar, blau. Der core-Bereich, welcher die letzten 85 Aminosäurereste umfasst (Stanley *et al.*, 1992), ist durch eine rote gestrichelte Linie dargestellt.

Nur [9a] und [17a-b] wiesen ein vollständiges **V1** auf, was diese unabhängig vom Elternvirus in Bezug auf Verpackung machte. Auf Aminosäureebene konnten N₁₁₄L ([17a]), G₁₆₅V ([9a] und [17b]) und W₁₇₃L ([9a] und [17a-b]) gesehen werden. Die beiden erstgenannten Austausche führten zum Ersatz einer neutralen Aminosäure gegen eine hydrophobe, während letztgenannter Austausch den hydrophoben Charakter konservierte. N-terminale Deletionen traten in [2], [8b-e], [9d-f], [11] und [17c-f] auf. D_n-DNA [9c] hatte einen zentralen Bereich verloren. Durch die Insertion eines Adenins zwischen T₁₃₄₄ und G₁₃₄₅ kam es in [9b] zu einer Verschiebung des Leserasters und einem potentiellen frühzeitigen Stoppcodon nach Aminosäure V₂₁₉. Die resultierende Länge würde anstelle von 254 Aminosäuren 219 Reste betragen. Durch den Nukleotidaustausch A₁₄₆₁T in [8a] war das Stoppcodon dieser D_n-DNA nicht funktionell und im Gegensatz zu [9b] sollte ein verlängertes Protein entstehen. Das erste Stoppcodon wurde nach der Aminosäure Y₂₅₅ gefunden. In [8a] traten zudem die Austausche G₁₆₅V und W₁₇₃L auf. **V2** konnte in [8a], [9a-b], [17a] und [17b] auf Nukleotid- und Aminosäureebene unverändert aufgefunden werden. In den anderen Molekülen wurden C-terminale Bereiche deletiert oder wie in [8b-e] und [11] der gesamte ORF. Aufgrund der Deletion in [9c] hatte diese D_n-DNA das V2-Stoppcodon verloren. Durch das nächste Stoppcodon im Leseraster könnte eine verlängerte Variante von V2 entstehen. Dabei würden 94 zusätzliche Aminosäuren angehängt werden. Der **V3**-ORF war in den D_n-DNAs [8a], [9a-c], [17a] und [17b] intakt, und I₁₇S von [9b] (hydrophob zu neutral) war der einzige Aminosäureaustausch, der gefunden werden konnte. In [8b-e] hingegen fand eine vollständige Deletion des ORFs statt. In den anderen D_n-DNAs wurde der C-Terminus entfernt.

Folglich ergab die Analyse der Nukleotid- und Proteinsequenzen, dass C4 der ORF war, der in den meisten Fällen (75 %) funktionell sein sollte. Alle anderen ORFs waren zu einem größeren Ausmaß von den Deletionen betroffen.

Die D_n-DNAs [17a] und [17d-f] enthielten invertierte Nukleotidbereiche (Abbildung 17, „inv“). Der Ursprung dieses Bereiches enthält die C-Termini von C2 und C3 bei [17d-f] und einen Bereich von C1 bei [17a]. Diese Region wurde mit den viral ausgerichteten Fragmenten fusioniert. Zusätzlich konnten an den 3'-Enden der invertierten Bereiche von [17d-f] kurze Fragmente gefunden werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit während des Entstehungsprozesses der D_n-DNAs *de novo* gebildet wurden. Neben

den Inversionen fanden auch Duplikationsereignisse statt. Diese Art von Mutation trat bei 50 % der untersuchten Moleküle auf (s. Abbildung 17, „2x“: D_n-DNAs [2], [8a-d], [9b-c], [9e], [17a] und [17d]) und befand sich im Bereich rechtsseits des Nonanukleotides. Bei [17a] und [17d] begann die Duplikation bereits im Nonanukleotid (TAATATTAC, duplizierte Nukleotide unterstrichen). Die Länge der duplizierten Bereiche betrug zwischen 44 und 76 Nukleotide (vgl. Abbildung 20).

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .
          110      120      130      140      150      160      170      180
[2]  ~~~~~~TG GCCCGAAAAA AATGGGCCCC CAATCAAAAC GTGACACGTG GAAGGGGACT GTTGAATGAT G~~~~~ ~
[8a]  ~~~CCGGATG GCCCGAAAAA AATGGGCACC CAATCAAAAC GTGACACGTG GAAGGGGACT GTTGAAT~~~ ~~~~~~ ~
[8b]  ~~~~~GGATG GCCCGAAAAA AATGGGCACC CAATCAAAAC GTGACACGTG GAAGGGGACT GTTGAATGAT GTGACGTTTT T
[8c]  ~~~~~~ ~~~~~~GCCCGAAAAA AATGGGCACC CAATCAAAAC GTGACACGTG GATGG~~~~~ ~~~~~~ ~
[8d]  ~~~~~GGATG GCCCGAAAAA AATGGGCACC CAATCAAAAC GTGACACGTG GAAGGGGACT GTTGAATGAT GTGACGTTTT T
[9b]  ~~~~~~ ~~~~~~AAAAA AATGGGCACC CAATCAAAAC GTGACACGTG GAAGGGGACT GTTGAATGAT ~~~~~~ ~
[9c]  ~~~~~~ ~~~~~~AAAAA AATGGGCACC CAATCAAAAC GTGACACGTG GAAGGGGACT GTTGAATGAT ~~~~~~ ~
[9e]  ~~~~~~ ~~~~~~AAAAA AATGGGCACC CAATCAAAAC GTGACACGTG GAAGGGGACT GTTGAATGAT ~~~~~~ ~
[17a] TTACCGGATG GCCCGAAAAA AATGGGCACC CAATCAAAAC GTGACACGTG GAAG~~~~~ ~~~~~~ ~
[17d] TTACCGGATG GCCCGAAAAA AATGGGCACC CAATCAAAAC GTGACACGTG GAAG~~~~~ ~~~~~~ ~

```

Abbildung 20: Übersicht der duplizierten Bereiche in den D_n-DNAs. Die Sequenzen wurden anhand der Übereinstimmung der Nukleotide ausgerichtet, dadurch entstandene Lücken sind durch „~“ gekennzeichnet. Teile des Nonanukleotides sind fett dargestellt.

D_n-DNA [17a] wies einen hochvariablen Bereich in der linksseitigen Genomhälfte auf (s. Abbildung 21). Da die Sequenzen für die *Dot plot*-Analysen im Nonanukleotid geschnitten wurden, beziehen sich die folgenden Angaben für [17a] auf AC als Nukleotid #1 und #2. Die Replikation wurde nach 52 Nukleotiden abgebrochen und startete erneut bei TT des Nonanukleotides (TAATATTAC). Nach dieser Duplikation verlief die Replikation bis zum Nukleotid 1487 ohne Unterbrechung. Anschließend wurden die Nukleotide 1126 bis 1514 repliziert, was in einer Duplikation des Bereiches 1126 bis 1487 resultierte. Nach dem Nukleotid 2216 verlief die Amplifikation des Elternvirus ohne Mutationsereignisse. Weiterhin fand eine Inversion des Nukleotidbereiches 2110 bis 2209 statt. Nach Abbildung 21a wurden die Nukleotide 1515 bis 2215 deletiert, mit den Daten der Inversion verglichen bedeutet dies jedoch, dass ausschließlich die Nukleotide 1515 bis 2109 und 2210 bis 2215 nicht in der D_n-DNA enthalten waren.

Die gesamten Diagramme der *Dot plot*-Analyse sind als Übersicht im Anhang (IX.6) dargestellt. Die Graphen zeigen sowohl die Deletionen als auch die Inversionen und Duplikationen, die in Abbildung 17 dargestellt sind.

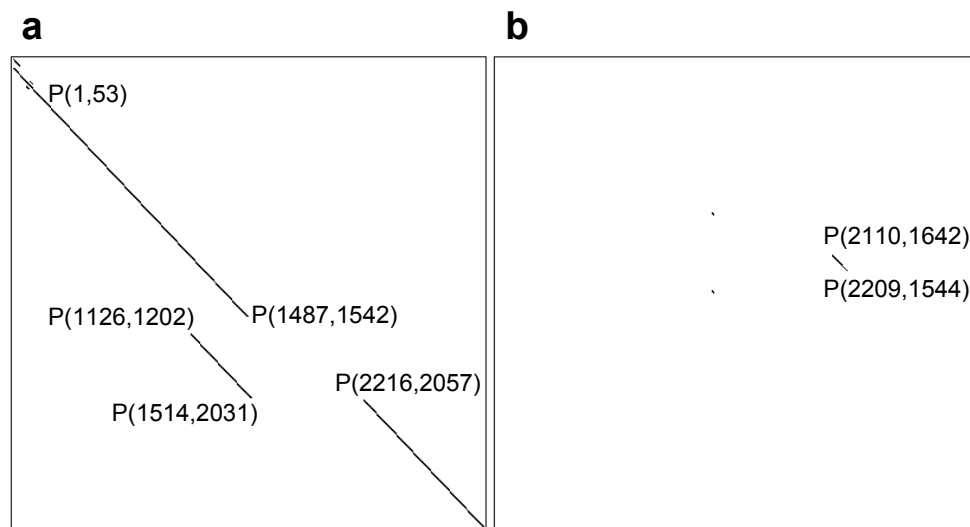
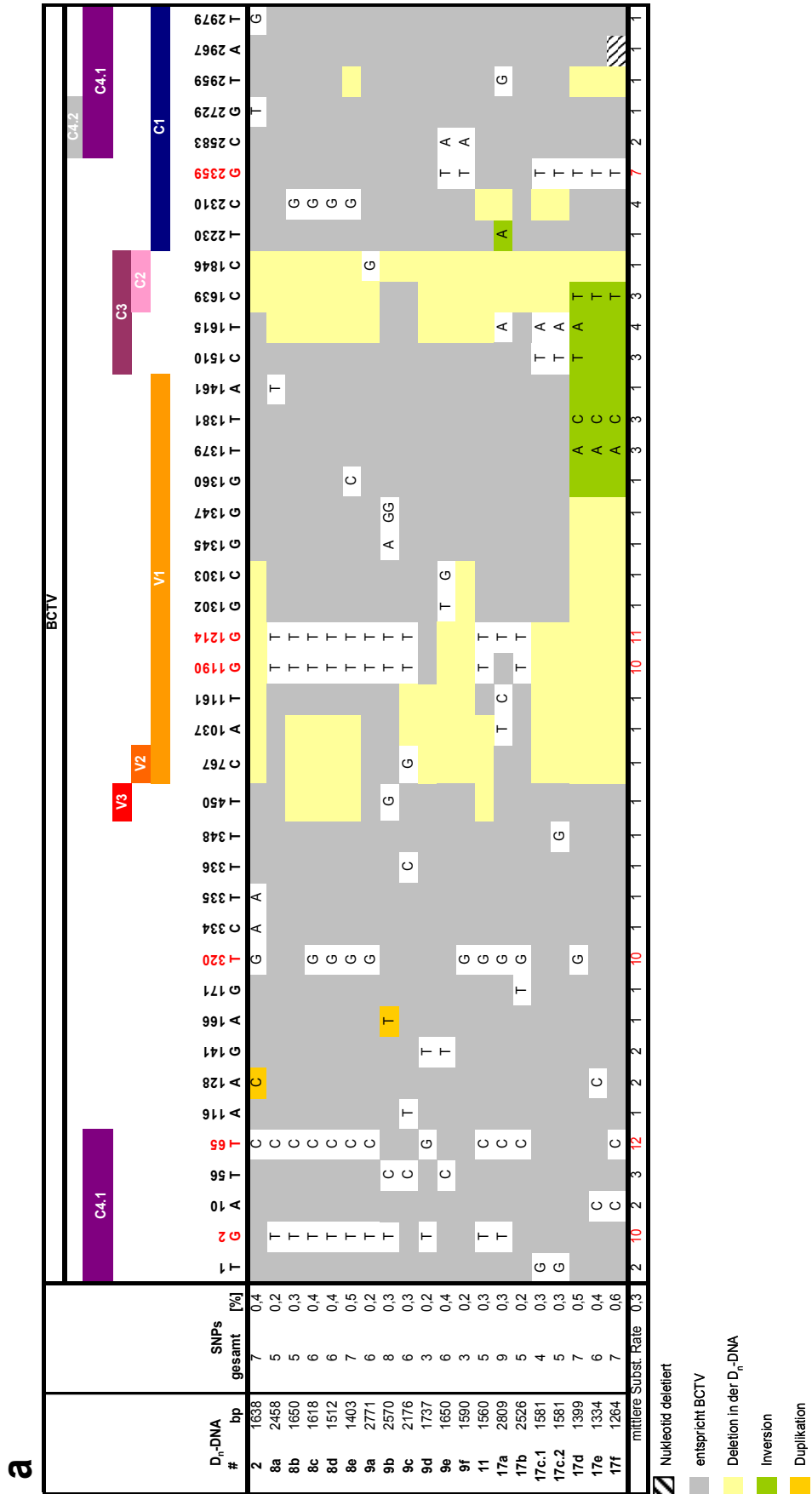


Abbildung 21: Sequenzvariation in D_n-DNA [17a]. **a:** Zur Analyse von Duplikationen wurden die viral orientierten Sequenzen von BCTV (horizontale Achse; X) und die der D_n-DNAs (vertikale Achse; Y) miteinander verglichen. **b:** Für die Darstellung von Inversionen wurde die virale Sequenz von BCTV im Vergleich mit der revers komplementären Sequenz der D_n-DNA dargestellt. Die Positionen von Mutationsereignissen sind als P(X/Y) angegeben. Die Analysen wurden mit dem Onlineprogramm „Nucleic Acids Dot Plots“ durchgeführt (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/dnadot/>).

Die Verteilung der Einzelnukleotidaustausche (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) der D_n-DNAs wurde ausgewertet. Es gab sechs *hot spots*, an denen häufig Austausche stattfanden. G₂ wurde in 50 % der D_n-DNAs gegen T substituiert. T₆₅C trat in 55 % auf, T₆₅G wurde einmal gefunden. T₃₂₀ wurde in zehn D_n-DNAs gegen G ausgetauscht (50 %). G₁₁₉₀ und G₁₂₁₄ waren in 50 bzw. 55 % von Substitutionen betroffen, und sieben Austausche von Guanin nach Thymin traten an Position 2359 auf (s. Abbildung 22a). Fünf der sechs *hot spots* lagen in kodierenden Regionen des BCTV-Genoms (außer T₃₂₀). Für die D_n-DNAs wurden Mutationsraten von $1,7 \times 10^{-3}$ bis $5,5 \times 10^{-3}$ (0,2 bis 0,6 %) Austausche pro Nukleotid ermittelt. Durchschnittlich wurden während der Bildung der D_n-DNAs 0,3 % ($3,3 \times 10^{-3}$) der Nukleotide modifiziert. Die Austausche wurden für alle D_n-DNAs summiert und wie in Abbildung 22b dargestellt, war C:G→A:T mit 42 % am häufigsten. Mit 19 % bzw. 17 % folgten A:T→C:G und A:T→G:C. A:T→T:A (12 %), C:G→G:C (7 %) und C:G→T:A (4 %) waren weniger häufig vertreten. Die graphische Zuordnung der Substitutionsraten zu den D_n-DNAs (vgl. Abbildung 22c) macht deutlich, dass die Austauschhäufigkeiten innerhalb einer Pflanze variierten (P# 8: 0,2-0,5 %, P# 9: 0,2-0,4 %, P# 17: 0,2-0,6 %). Außerdem zeigt die Zuordnung der Substitutionshäufigkeiten zu den D_n-DNAs, dass mit sinkender Molekülgröße vermehrt Punktmutationen auftraten. Am deutlichsten ist dies an den D_n-DNAs aus Pflanze 8 und 17 zu sehen.



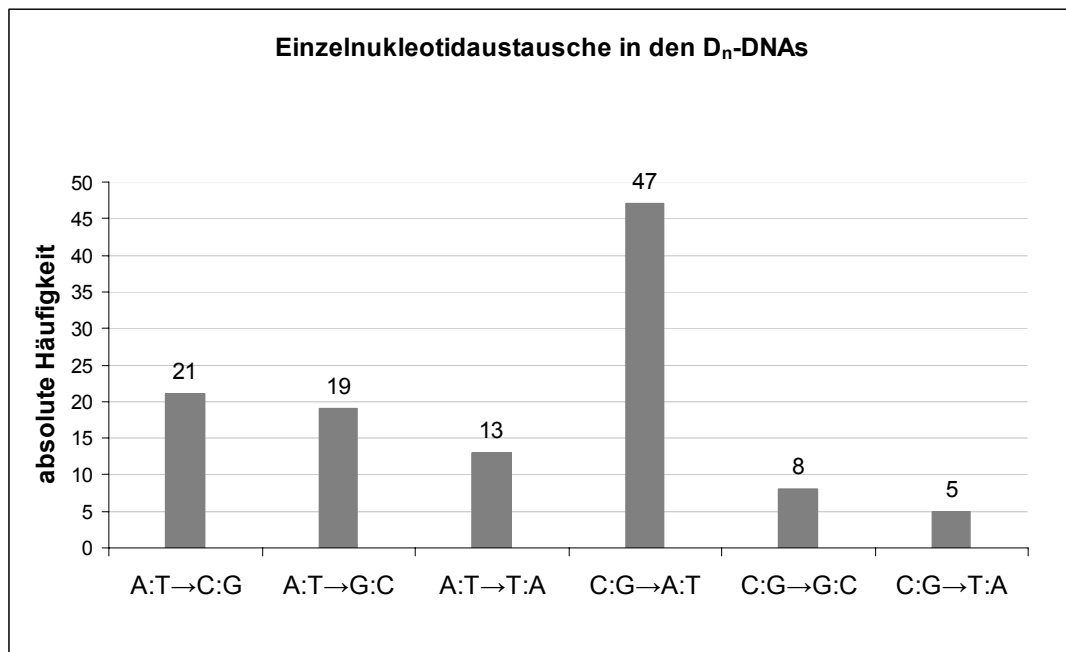
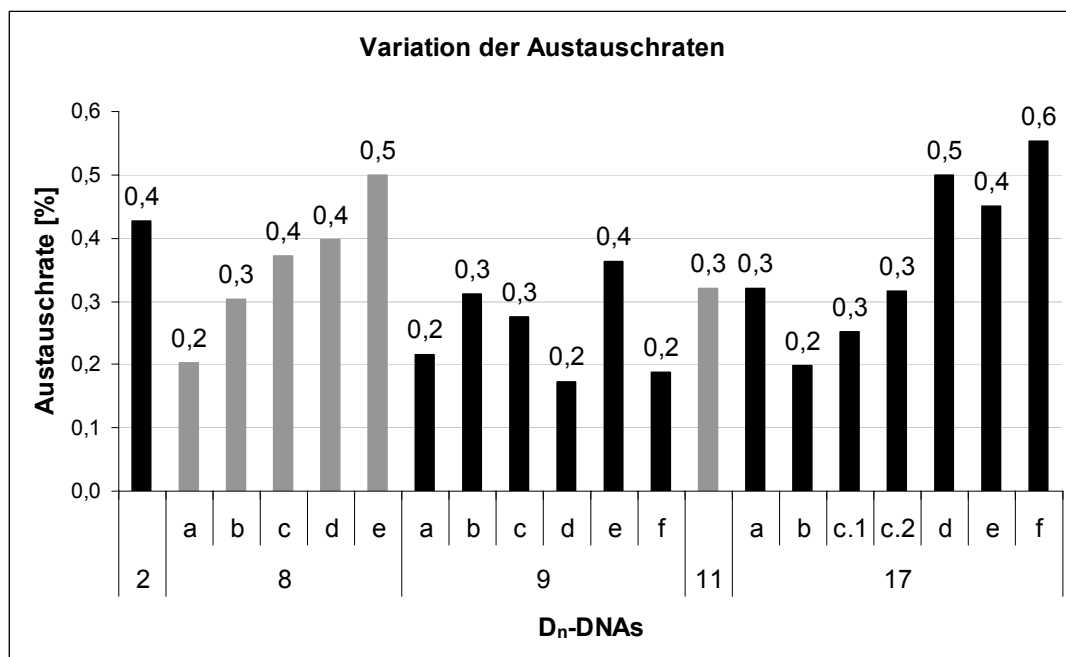
b**c**

Abbildung 22: SNPs in den D_n-DNAs. a: Einzelnukleotidaustausche und -insertionen in den D_n-DNAs. Die Positionen der ORFs sind in Form von Balken angegeben. Die Anzahlen der Austausche wurden als absolute und relative (SNPs/Länge der D_n-DNA) Werte angegeben. Die mittlere Substitutionsrate (Subst.-Rate) wurde als Mittelwert aus allen Raten berechnet. Zusätzlich sind in der unteren Reihe die Anzahlen der Austausche pro Position angegeben. Die sechs *hot spots* (Positionen 2, 65, 320, 1190, 1214 und 2359) wurden rot markiert. b: Summe der Austausche in allen D_n-DNAs. Angegeben sind die absoluten Werte. Insgesamt wurden 113 Austausche festgestellt. Austausche auf Strang- und Gegenstrang wurden addiert, da sie in der Analyse nicht unterschieden werden konnten, z.B. A→C und T→G. c: Austauschraten (%) auf die einzelnen D_n-DNAs bezogen. Die aus einer Pflanze isolierten Moleküle wurden als Block einer Grauschattierung dargestellt.

Die aus den Deletionen resultierenden Verknüpfungsstellen der D_n -DNAs wurden analysiert (Daten nicht gezeigt). Jeweils 20 Nukleotide um den Verknüpfungspunkt und 20 Nukleotide der entsprechenden Position der Ursprungssequenzen wurden auf prozentuale Übereinstimmung und identische Nukleotidfolgen hin untersucht. Von den 20 Nukleotiden der ursprünglichen Sequenzen war dabei eine Hälfte durch die Deletion verloren gegangen, während die andere Hälfte an der Verknüpfungsstelle zu finden war. Durchschnittlich stimmten 10 bis 40 % der Nukleotide von Verknüpfungsstelle und Ursprungssequenzen überein. Für den Verknüpfungspunkt von D_n -DNA [11] im Bereich der viral orientierten ORFs betrug die Identität 60 % und stellte damit das Maximum aller Werte dar. Für die gleiche Position von D_n -DNA [11] wurde eine Folge von fünf identischen Nukleotiden zwischen den drei verglichenen Sequenzen gefunden, dies war ebenso im Bereich des C4-ORFs in D_n -DNA [17d] der Fall. Zur Kontrolle wurden 20 zufällige Paare von je 20 Nukleotiden aus der Referenzsequenz von BCTV miteinander verglichen. Die höchste Identität betrug 50 % und die längste identische Nukleotidfolge umfasste vier Basen. Im Durchschnitt lag nach dieser Analyse eine Identität von 31 % vor, und zwei Nukleotide in Folge waren zwischen den Sequenzen identisch. Der GC-Gehalt von 15 bis 60 % mit einem durchschnittlichen Wert von 44 % unterschied die Sequenzen der Verknüpfungsstellen nicht von den zufällig ausgewählten Kontroll-Sequenzen ($\bar{x} = 39 \%$).

Eine zweite Folge von Sequenzanalysen wurde durchgeführt, um zu hinterfragen, ob der Bildung von D_n -DNAs eine *hairpin*-Bildung an den Deletionsbereichen vorausgeht. Jeweils 40 Nukleotide wurden gewählt, die um die beiden verknüpften Positionen lagen. Von diesen wurde eine Hälfte in der D_n -DNA konserviert, die andere Hälfte wurde durch das Deletionseignis entfernt. Die möglichen Basenpaarungen wurden bestimmt. Die D_n -DNAs wiesen durchschnittlich 4,6 (konservierter Bereich) und 5,0 Basenpaare (ausgeschnittener Bereich) auf. Diese Werte stimmten mit den Zahlen für fünf zufällige Paare aus der Referenzsequenz von BCTV überein (konserviert: 4,8, ausgeschnitten: 5,0 Basenpaare). Dies zeigte, dass keine erhöhte Stabilität im Bereich der konservierten Nukleotide zu finden ist, die in Kombination mit einer Instabilität im ausgeschnittenen Bereich Einfluss auf die Deletionseignisse hatte.

Zusammenfassend zeigten die Sequenzanalysen, dass sich während der Kultivierung der infizierten Zuckerrüben spontan eine Vielzahl unterschiedlicher D_n -DNAs bildete. Zwischen den untersuchten Molekülen gab es eine große Zahl an Variationen bezüglich deren Länge, ihrer Deletionen, Inversionen und Duplikationen. Punktmutationen traten mit einer durchschnittlichen Rate von 0,3 % ($3,3 \times 10^{-3}$) auf. Die Substitutionsraten waren innerhalb einer Pflanze variabel und kleinere D_n -DNAs wiesen höhere Raten auf als große. Oft wurden Nukleotide in *hot spots* verändert und der häufigste Austausch war die Transversion C:G→A:T. Der Vergleich der aus Deletionen resultierenden Verknüpfungsstellen der D_n -DNAs lieferte keinen Hinweis dafür, dass dieser Typ von Mutation bevorzugt an bestimmten Sequenzmotiven auftritt.

2. Entwicklung eines Mikrochips zur Detektion von Geminiviren

Das Versuchsziel der im Folgenden dargestellten Experimente war die Entwicklung eines Nachweissystemes für Geminiviren, bei dem spezifische Primer an eine Oberfläche gebunden sind und die Signalverstärkung durch RCA nach Bindung der geminiviralen DNA an den Primer stattfindet. Ziel war zum einen die Unterscheidung von BCTV und seiner D_0 -DNA (vgl. VI.1.1) und zum anderen eine sensitive Unterscheidung einer Auswahl an Geminiviren. Durch die Experimente sollten unterschiedliche Nachweismethoden der RCA-Produkte und verschiedene Oberflächen bzw. Oberflächenmodifikationen auf ihre Anwendbarkeit hin beurteilt werden.

2.1 Direkte Markierung von RCA-Produkten

Der Nachweis eines RCA-Produktes auf der Oberfläche ist wesentlich für die Entwicklung eines Mikrochips zur Detektion von Geminiviren. Es wurde zunächst in Lösung getestet, ob eine Markierung des RCA-Produktes durch den $\Phi 29$ -DNA-Polymerase-vermittelten Einbau modifizierter Nukleotide möglich ist. Die Reaktionslösung enthielt Cy3-AP3-dUTP, das bei 400-500 nm angeregt wird oder Biotin-16-dUTP, welches durch ein Konjugat von Streptavidin und alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden kann. Bei allen Versuchen wurde das Plasmid pAbA1.0 (AbMV DNA A in pBluescript II KS(+), s. V.1.4) als Matrize eingesetzt und das RCA-Produkt mittels RCA/RFLP-*EcoRI*-Analyse untersucht.

Einbau von Biotin-dUTP durch die Φ 29-DNA-Polymerase

Für die Beurteilung der Biotin-Markierung wurden der Reaktionslösung 0 %, 35 % oder 100 % markiertes dUTP anstelle von dTTP zugegeben (vgl. V.2.4.3). Die RCA/RFLP-Analyse zeigte, dass pAbA1.0 in allen drei Proben amplifiziert werden konnte (s. Abbildung 23a, Pfeile); mit annähernd gleichen Mengen an spezifischen Fragmenten. Damit ist eine Störung der Reaktion durch die markierten Nukleotide ausgeschlossen. Ob die Fragmente markiert waren, wurde anschließend nach *Southern blotting* und Streptavidin/alkalischer Phosphatase Detektion geprüft (s. Abbildung 23b). Zum Vergleich wurde virale DNA aus Gesamtnukleinsäuren einer AbMV-infizierten Pflanze mittels illustra TempliPhi™ Kit (GE Healthcare) unter Zugabe von Biotin-16-dUTP amplifiziert und in getrennten Ansätzen mit *Hpa*II und *Pst*I geschnitten. Diese Restriktionsprodukte wurden vereinigt und mit den *Eco*RI-geschnittenen RCA-Produkten verglichen (Abbildung 23b).

Sowohl für die Amplifikation der AbMV-DNA mit dem illustra TempliPhi™ Kit (GE Healthcare; Abbildung 23b, Spur M2, s. Fragmentgrößenangaben), als auch für die Amplifikation des Plasmids pAbA1.0 mit der Φ 29-DNA-Polymerase von NEB (s. Abbildung 23b, Spuren 2 und 3, s. Pfeile) konnten die erwarteten Fragmente detektiert werden. Dies zeigt, dass das markierte Nukleotid effizient in die DNA eingebaut wurde. Wegen der hohen Konzentration der eingesetzten Matrizen-DNA entstand ein beträchtlicher Hintergrundschmier aus Abbruchprodukten oder unvollständig amplifizierter DNA, die in ihren einzelsträngigen Bereichen von den Restriktionsenzymen nicht geschnitten werden kann. Die Effizienz der vollständigen Amplifikation war bei Verwendung des GE Healthcare Kits deutlich höher (vgl. Abbildung 23b, Spuren M2 und Spuren 1-3)

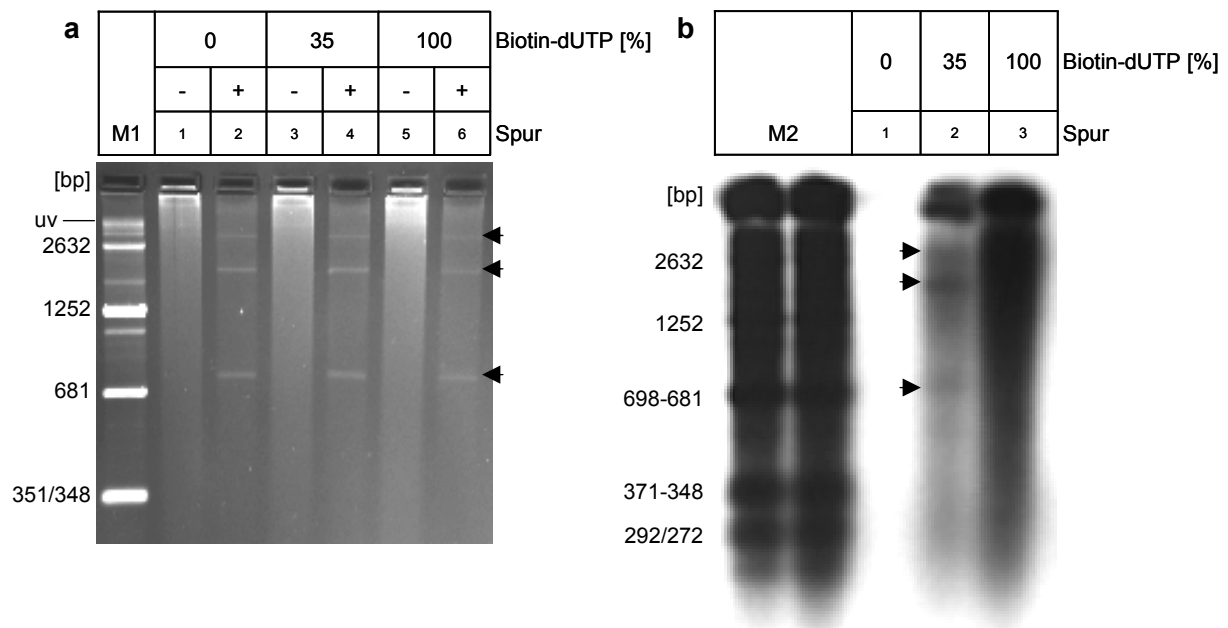


Abbildung 23: Direkte Markierung des Plasmids pAbA1.0 mit Biotin-16-dUTP. **a:** Vor den Versuchen wurde das Plasmid pAbA1.0 für 5 min bei 95 °C denaturiert und mit Hilfe des illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt. Aliquots von je 1,3 µg wurden bei -20 °C gelagert und zur weiteren Verwendung auf Eis aufgetaut. Je ein Aliquot wurde für die Kontrollreaktion ohne Biotin-16-dUTP (0 %) bzw. die beiden Markierungsreaktionen (35 % bzw. 100 % Biotin-16-dUTP eingesetzt (vgl. V.2.4.3). Die RCA-Produkte der einzelnen Reaktionen (0, 35 und 100 % Biotin-16-dUTP) wurden für die weitere Analyse halbiert. Je ein Teil wurde mit *EcoRI* geschnitten (+) bzw. nicht zur Restriktion eingesetzt (-). Die Fragmente wurden in einem 2 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt, das wie in Abbildung 3 beschrieben gefärbt wurde. Als Marker (M1) wurde eine Mischung aus *HpaII*- bzw. *PstI*-geschnittener Gesamt-DNA von AbMV aufgetragen (vgl. Abbildung 40a). **b:** Zur Herstellung eines Biotin-markierten Standards für die *Southern blot*-Analyse wurde virale DNA aus Gesamtnukleinsäuren einer AbMV A und B-infizierten Pflanze mittels illustra TempliPhi™ Kit (GE Healthcare) unter Zugabe von 0,5 µl Biotin-16-dUTP (1 mM Stammlösung) amplifiziert und in getrennten Ansätzen mit *HpaII* und *PstI* geschnitten. Anschließend wurden die Restriktionsprodukte vereinigt (M2). Die gleichen Restriktionsansätze wie in **a** wurden zusammen mit diesem Standard in einem 2 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. Die markierten Nukleinsäuren wurden in der *Southern blot*-Analyse durch ein Streptavidin-AP-Konjugat nachgewiesen (s. V.2.5.6).

Wie die Versuche zeigten, stellt Biotin-16-dUTP ein geeignetes Substrat für die Φ 29-DNA-Polymerase dar und kann für Markierungsreaktionen basierend auf RCA eingesetzt werden.

Einbau von Cy3-dUTP durch die Φ 29-DNA-Polymerase

Nachdem ein Einbau von Biotin-16-dUTP durch die Φ 29-DNA-Polymerase in geminivirale und Plasmid-DNA gezeigt werden konnte, wurden die Versuche mit dem modifiziertem Nukleotid Cy3AP3-dUTP wiederholt. Das Plasmid pAbA1.0 wurde mit dem kommerziell erhältlichen RCA-Kit (GE Healthcare) oder der NEB Φ 29-DNA-Polymerase amplifiziert. Für beide Enzyme wurden jeweils drei Reaktionen angesetzt: Die Kontrollreaktion (K) enthielt nur unmodifiziertes dTTP, ein Reaktionsansatz (C)

enthielt das modifizierte Nukleotid Cy3-AP3-dUTP und einem Ansatz wurde wie im vorherigen Versuch Biotin-16-dUTP (B) beigelegt (s. Abbildung 24).

Abbildung 24a zeigt die Gegenüberstellung der *EcoRI*-Fragmente der RCA-Produkte von pAbA1.0 bei Anregung der im Agarosegel enthaltenen Cy3-Moleküle bei 400-500 nm (a) und 312 nm (b). Die größte Signalstärke war bei 400-500 nm zu erwarten, da das Absorptionsmaximum von Cy3 bei 550 nm liegt (Herstellerangaben: GE Healthcare). Bei beiden Wellenlängen konnte Cy3 jedoch ausschließlich in Form freier Nukleotide detektiert werden. Dies wurde sowohl für die RCA mit illustra Templi Phi™ Kit (GE Healthcare) beobachtet, in der neben dem zugegebenen markierten Nukleotid auch unmarkiertes dTTP enthalten war, als auch für die Reaktion, in der ausschließlich markierte Nukleotide enthalten waren (NEB). In keiner der beiden Reaktionsansätze fand ein Einbau des modifizierten dUTPs in die RCA-Produkte statt.

Parallel wurde die Reaktion mit Biotin-16-dUTP durchgeführt. Für beide markierten Nukleotide wurde aufgrund der höheren Molekulargewichte (dTTP: 482 g/mol Biotin-16-dUTP: 972 g/mol, Cy3-AP3-dUTP: 1135 g/mol) eine Veränderung der Fragmentlaufstrecken im Agarosegel erwartet, was nicht nachgewiesen wurde (Abbildung 24b, Spuren 2 und 5). Es fand jedoch in der dTTP-freien Reaktion zum Einbau von Cy3-AP3-dUTP eine Amplifikation des Plasmids statt (Abbildung 24b, Spur 6).

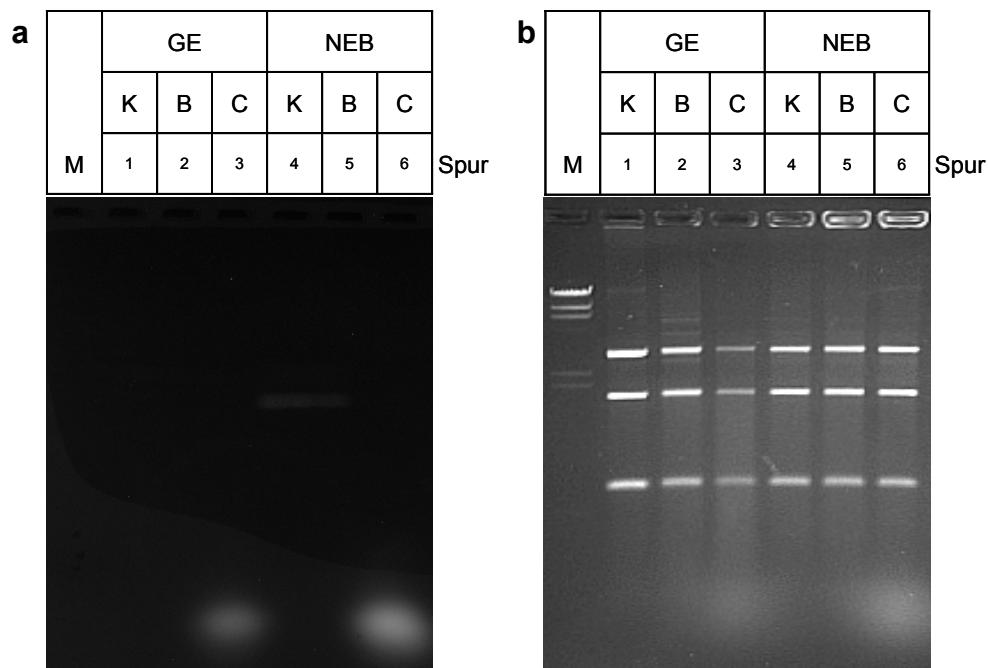


Abbildung 24: Markierung des Plasmids pAbA1.0 mit Cy3-AP3-dUTP und Biotin-16-dUTP. Dem illustra TempliPhi™ Kit (GE) wurden keine (K), 0,5 µl Biotin-16-dUTP (B) oder Cy3-AP3-dUTP (C) (je 1 mM) Nukleotide zugegeben. Die Reaktion mit der Φ29-DNA-Polymerase (NEB) wurde mit 100 % dTTP (K), 35 % Biotin-16-dUTP zu 65 % dTTP (B), oder 100 % Cy3-AP3-dUTP (C) durchgeführt (vgl. V.2.4.3). Die RCA-Produkte wurden mit *EcoRI* geschnitten und die Fragmente in einem 1 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt: Detektion der Cy3-Signale bei 400-500 nm auf dem DarkReader® (a) und nach anschließender Färbung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid bei 312 nm (b). Als Marker (M) wurde *HindIII*-geschnittene λDNA verwendet (s. IX.2).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Cy3-AP3-dUTP im Gegensatz zu Biotin-16-dUTP nicht durch die Φ29-DNA-Polymerase als Substrat akzeptiert wird.

Detektion der RCA-Produkte durch SybrGold® und DAPI

Neben den Versuchen zur direkten Markierung eines RCA-Produktes mit modifizierten Nukleotiden wurde experimentell untersucht, wie effizient eine nachfolgende Anfärbung mit SybrGold® oder DAPI ist. Eine serielle Verdünnung des Plasmids pUC19 und eines geminiviralen RCA-Produktes wurde auf einen Glasobjektträger aufgetragen und nach dem Trocknen gefärbt (Daten nicht gezeigt). 0,8 bis 25 pg des Plasmids konnten weder mit SybrGold® noch mit DAPI nachgewiesen werden. Für das RCA-Produkt lag die Nachweisgrenze von SybrGold® zwischen 7,8 und 15,6 ng, für DAPI hingegen zwischen 15,6 und 31,3 ng.

Die Ergebnisse zeigten, dass SybrGold[®] eine höhere Sensitivität als DAPI bietet. Neben dem Einbau von Biotin-16-dUTP durch die Φ 29-DNA-Polymerase während der RCA stellt somit die Anfärbung oberflächengebundener RCA-Produkte mit SybrGold[®] eine geeignete Detektionsmethode dar.

2.2 Oberflächengebundene RCA

2.2.1 Aldehydmodifizierte Glasobjektträger

Optimierung der Bedingungen für die RCA-Reaktion

Das Ziel der Versuche war, geminivirale DNA-Zirkel spezifisch an oberflächen-immobilisierte Oligonukleotide zu hybridisieren und RCA zur Signalverstärkung einzusetzen. Zunächst wurden die Bedingungen ausgetestet, um die RCA auf einem Objektträger durchzuführen zu können (Daten der Versuche nicht gezeigt). RCA/RFLP-Analysen wiesen darauf hin, dass die RCA-Reaktion mit dem illustra TempliPhi[™] Kit (GE Healthcare) nicht zwischen Objektträger und Deckgläschen stattfinden kann. Vermutlich hatte das Enzym an das Deckgläschen adhärert oder die Reaktionskomponenten wurden nicht durchmischt.

In einem weiteren Ansatz wurden so genannte *gene frames*[®] (Thermo Scientific) eingesetzt, um eine Kammer für die Reaktion zu schaffen. Hierbei handelt es sich um selbstklebende Gummirahmen, die auf dem Objektträger aufgebracht werden und nach Einbringen der Reaktionslösung mit einem Plastikdeckgläschen dicht verschlossen werden können. Anfängliche Versuche zeigten, dass die DNA an das Plastikdeckgläschen bindet und daher die Reaktion unterbleibt. Im Weiteren wurden die Deckgläschen der *gene frames*[®] zuvor mit HS-DNA abgesättigt, was die Reaktion deutlich begünstigte. Ein weiterer Vorteil der dichtschießenden *gene frames*[®] liegt darin, dass die Objektträger in 50 ml-Reaktionsgefäße eingesteckt werden und auf einem Inkubator gedreht werden können. Dies könnte die Mischung der Reaktionskomponenten fördern.

Oberflächengebundene RCA auf aldehydmodifizierten Objektträgern

Da die Rahmenbedingungen für die RCA auf einer planaren Oberfläche definiert werden konnten, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob die Reaktion an

aminomodifizierten Oligonukleotiden nach Binden der homologen geminiviralen DNA erfolgt. Als Testviren wurden ACMV-[Nig], BCTV, CaLCuV, CLCrV, SiGMCRV, SiYVV und TGMV_{yy} ausgewählt. Nach Sequenzvergleichen wurden Primer in wenig konservierten Bereichen entworfen. In Vorversuchen konnte durch Hybridisierung mit komplementären Sonden gezeigt werden, dass die Oligonukleotide auf der aldehydmodifizierten Oberfläche gebunden waren. Hierbei wurde deutlich, dass die Verdünnung der Primer (20 µM, 100 µM-Stammlösung in H₂O) im Nexterion Spot-Puffer ringförmige Kreise auf den Objektträgern lieferte. Durch Auftragen unverdünnter Primer (100 µM in H₂O), während der Objektträger in einer als feuchte Kammer dienenden Petrischale lag, wurde die Ausbildung von gleichmäßigeren Punkten (*spots*) erzielt (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die Bindung der Oligonukleotide an die Oberfläche bestätigt wurde, sollten die Hybridisierung und anschließende Amplifikation homologer Virus-DNA durch die Φ 29-DNA-Polymerase nachgewiesen werden. Dazu wurden Gesamtnukleinsäuren infizierter Pflanzen in Hybridisierungslösung auf die vorbereiteten Objektträger aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit wurden die Objektträger gewaschen und die Reaktionslösung zur RCA aufgetragen. In mehreren Versuchen wurden keine Amplifikate nachgewiesen. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob und wie die Bindung der geminiviralen DNA an die Oligonukleotide und/oder die Amplifikationsreaktion beeinflusst wurden.

2.2.2 Streptavidinmodifizierte magnetische Kügelchen

Da die Versuche, die RCA auf einer planaren Oberfläche ablaufen zu lassen, nicht das gewünschte Ergebnis zeigten (s. VI.2.2.1), wurde nach einem alternativen Substrat gesucht, dessen Struktur möglicherweise besser geeignet ist. Die Wahl fiel dabei auf Kügelchen mit einem Durchmesser im µm-Bereich, da eine große Oberfläche bei kleinem Volumen vorhanden ist. Zudem besteht die Möglichkeit, die Lösung in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß auf einem Schüttler zu inkubieren, was eine bessere Durchmischung der Reaktionskomponenten wie Nukleotide, Polymerase usw. erlaubt. Weiterhin sind magnetische Kügelchen kommerziell erhältlich und können einfach vom Überstand mit einem magnetischen Halter getrennt werden. Streptavidinbeschichtete magnetische Kügelchen wurden ausgewählt, so dass die Oligonukleotide über eine 5'-Biotingruppe gebunden werden konnte. Diese nicht-

kovalente Bindung hat den Vorteil, dass die Interaktion zwischen Streptavidin und Biotin durch Erhitzen auf 70 °C aufgehoben werden kann (Holmberg *et al.*, 2005), was die Wiederverwendung der magnetischen Kügelchen und/oder die Analyse des reinen Reaktionsproduktes erlaubt.

Versuchsziel war die Unterscheidung von D₀-DNA und viraler BCTV-DNA aus transgenen Zuckerrüben (vgl. VI.1.1) mit Hilfe eines Microarrays. Dazu wurde der Primer BCTV_FL entworfen, der im Bereich des V1-ORFs die gesamtgenomische DNA bindet, während der D₀-DNA dieser Bereich fehlt, und der Primer nicht binden kann. Der zweite Primer BCTV_FL_D₀ bindet zwischen den beiden möglichen Startcodons des C4-ORFs und sollte mit beiden Molekülklassen interagieren (vgl. Genomorganisation der D₀-DNA in Abbildung 14). Als Kontrolle wurde ein AbMV A-spezifischer Primer (AbMV_RecA, s. Tabelle 8) benutzt.

Verschiedene Varianten wurden getestet, um die spezifische DNA durch die gebundenen Primer zu fischen und die RCA auf der Oberfläche bzw. nach Ablösen von Primer und gebundenem Zirkel in Lösung stattfinden zu lassen. In allen Fällen konnte eine Amplifikation weder mit Anfärben durch SybrGold[®], noch durch Auftropfen der *bead*-Lösung auf ethidiumbromidhaltige Agarosegele detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Um zu testen, ob die Kügelchen die Reaktion beeinträchtigen, wurde eine Standard-RCA mit Gesamtnukleinsäuren einer AbMV-infizierten Pflanze in Gegenwart und in Abwesenheit der Kügelchen durchgeführt. Die Analyse mittels RCA/RFLP-*Hpa*II (s. Abbildung 25) zeigte, dass die Kügelchen keinen wesentlichen Einfluss auf die DNA-Synthese hatten. Im Vergleich zur Wasserkontrolle war die Reaktionsausbeute nur leicht erniedrigt. Für die weiteren Versuche wurden die Reaktionsprodukte nicht mehr mit SybrGold[®] angefärbt oder auf ethidiumbromidhaltige Platten aufgetropft. Stattdessen wurden Aliquots der Kügelchen nach RCA zur Restriktion mit geeigneten Endonukleasen eingesetzt und die erhaltenen Fragmente durch Agarosegelelektrophorese charakterisiert.

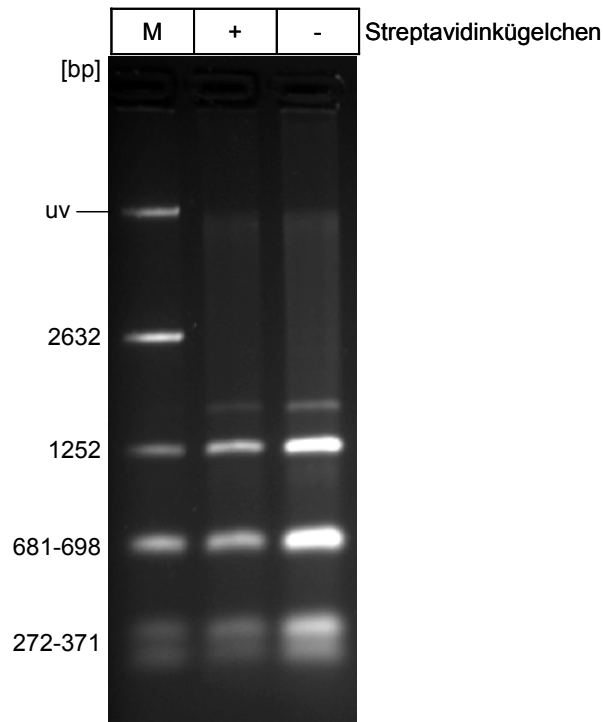


Abbildung 25: Vergleich der RCA mit und ohne streptavidinbeschichtete *beads* in der Reaktionslösung. Gesamtnukleinsäuren einer AbMV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze wurden mit dem illustra TempliPhiTM Kit (GE Healthcare) amplifiziert. Entweder wurden der Reaktion 10 μ l Streptavidin-Kügelchen („+“; ca. 4×10^5 Kügelchen) oder 10 μ l H₂O („-“) zugegeben. Die RCA-Produkte wurden mittels RCA/RFLP-*Hpa*II in einem 1,5 %-igen TBE-Agarosegel überprüft, das wie in Abbildung 3 beschrieben gefärbt wurde. Als Marker (M) wurde *Hpa*II- und *Pst*I-geschnittene Gesamt-DNA von AbMV aufgetragen (vgl. Abbildung 40a).

In weiteren Versuchen wurde den Reaktionen RecA beigefügt, um eine mögliche Steigerung der Effizienz der DNA-Hybridisierung zu bewirken. Auf der Oberfläche der Kügelchen sollte RecA die Interaktion der zirkulären DNA mit den oberflächen-gebundenen Primern vermitteln. Zunächst wurde ein 5'-biotinyliertes Oligonukleotid (AbMV_RecA, BCTV_FL bzw. BCTV_FL_D₀) mit RecA inkubiert, anschließend zu den homologen oder heterologen Gesamtnukleinsäuren gegeben und mit Streptavidin-Kügelchen gefischt. Die RCA wurde in Vorversuchen mit der Φ 29-DNA-Polymerase von NEB durchgeführt. Da virale DNA nicht amplifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde für weitere Versuche das illustra TempliPhiTM Kit (GE Healthcare) verwendet. Damit sollte zunächst gezeigt werden, ob eine spezifische Interaktion zwischen *bead*-gebundenen Oligonukleotiden und viraler DNA stattfindet. In diesem Falle wäre der nächste Schritt eine Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Φ 29-DNA-Polymerase von NEB.

Abbildung 26 zeigt das Ergebnis einer exemplarischen RCA/RFLP-*Hpa*II-Analyse. Aliquots der Streptavidin-*beads* wurden mit den 5'-biotinylierten Primern AbMV_RecA,

BCTV_FL bzw. BCTV_FL_D₀ beschichtet (= aktivierte Kügelchen), je eine Kontrolle ohne Primer wurde parallel bearbeitet. Freie Stellen wurden mit 2 % BSA blockiert, wonach RecA zugegeben wurde. Ein Aliquot mit gebundenem Primer wurde als Negativkontrolle ohne RecA-Zugabe mitgeführt. Anschließend wurden Gesamtnukleinsäuren infizierter und Mock-inokulierter Pflanzen zugegeben. Dabei wurde je eine Primer- und RecA-positive Probe mit der Mock-Kontrolle bzw. dem heterologen Virus behandelt. Die übrigen drei Aliquots (Primer und RecA, Primer ohne RecA, RecA und kein Primer) wurden mit dem homologen Virus inkubiert. Nach Inkubation und Waschen der Kügelchen wurden ungebundene (Überstand) und gebundene, zirkuläre DNA mit dem illustra TempliPhi™ Kit (GE Healthcare) vervielfältigt und durch RCA/RFLP-*Hpa*II untersucht (s. Abbildung 26).

Die Analyse zeigte, dass RecA keinen Einfluss auf die Bindung homologer Virus-DNA durch aktivierte Kügelchen hat (Abbildung 26, Spuren 1 und 2, 7 und 8 bzw. 12 und 13). Sowohl mit als auch ohne RecA wurde virale DNA gefischt. Allerdings waren auch *beads* ohne Primer dazu in der Lage (Spuren 3, 9 und 14). Außerdem konnte mit den immobilisierten Oligonukleotiden heterologe DNA gebunden werden (Spuren 4, 10 und 15). In den Kontrollansätzen mit Gesamtnukleinsäuren aus uninfizierten Pflanzen (Spuren 5, 11 und 16) konnte keine Amplifikation unspezifisch gebundener pflanzlicher zirkulärer DNA nachgewiesen werden. Wie eine zusätzliche RCA/RFLP-Analyse mit *Sal*I und *Nco*I zeigte, wurden durch die BCTV-spezifischen Primer gesamtgenomische DNA und D₀-DNA unspezifisch gebunden (Daten nicht gezeigt).

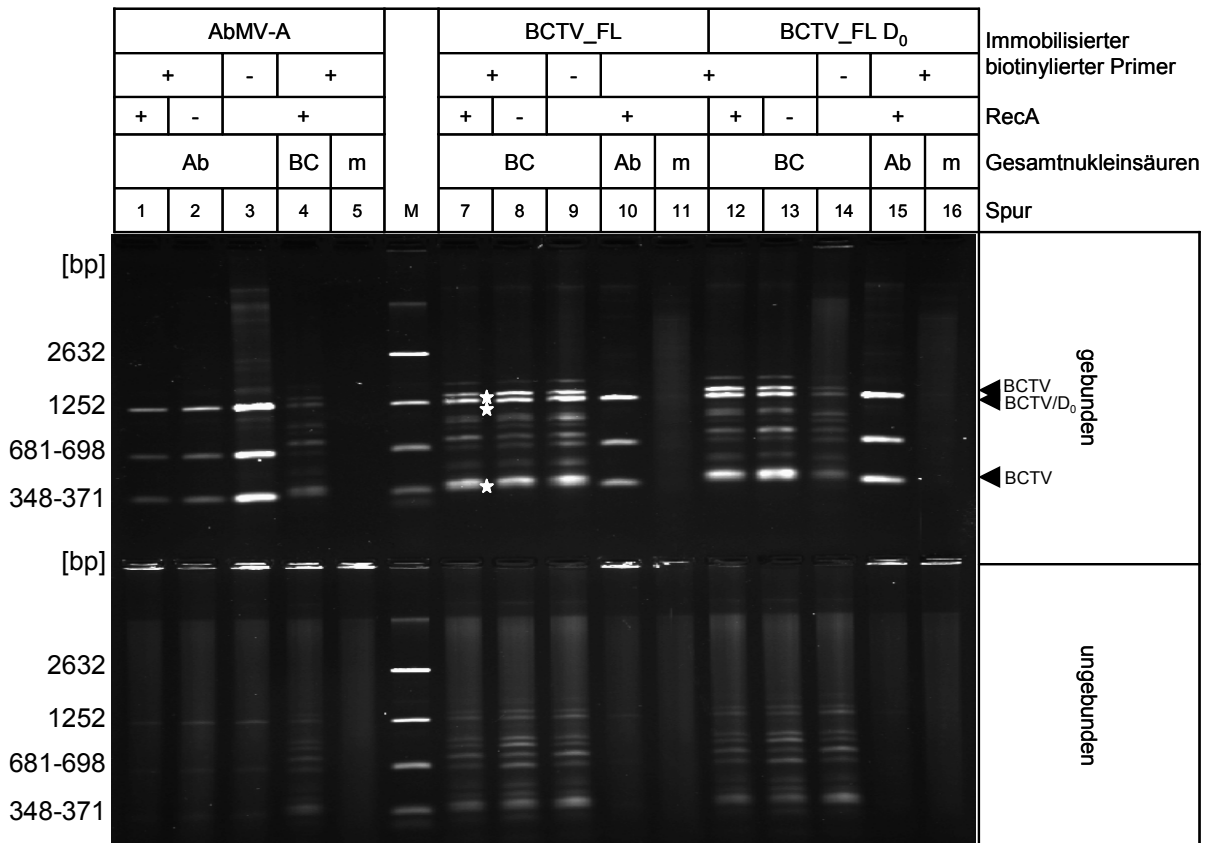


Abbildung 26: RCA auf streptavidinbeschichteten magnetischen Kügelchen. Es wurden fünf Ansätze pro Primer (AbMV-A, BCTV_FL bzw. BCTV_FL_D₀) getestet. Jeweils vier Aliquots der Streptavidin-*beads* wurden mit den Primern beschichtet („Primer +“), ein weiteres wurde ohne Primer belassen („Primer -“). Die Blockierung fand über Nacht in 2 % BSA in TBS statt. Anschließend wurden die aktivierten Kügelchen mit RecA inkubiert („RecA +“), wobei ein Aliquot nicht in die Behandlung eingeschlossen wurde („RecA-“). Nach Inkubation mit den Gesamtnukleinsäuren (AbMV A und B aus *N. benthamiana* „Ab“, BCTV- „BC“ und Mock-inokulierte *B. vulgaris*; „m“ in Spuren 5, 11 und 16) wurde die RCA mit dem illustra TempliPhi™ Kit (GE Healthcare) durchgeführt und die gewaschenen *beads* bzw. der RCA-Überstand durch RCA/RFLP-*Hpa*I in einem 2 %-igen TBE-Agarosegel untersucht. Das Gel wurde wie in Abbildung 3 beschrieben gefärbt. Als Marker (M) wurde *Hpa*I- und *Pst*I-geschchnittene Gesamt-DNA von AbMV aufgetragen (vgl. Abbildung 40a). Die erwarteten Fragmente für BCTV sind durch weiße Sterne markiert.

Zur Optimierung der Blockierung freier Oberflächen auf den Kügelchen wurden am Beispiel des Primers AbMV_RecA verschiedene BSA-Konzentrationen von 0 bis 5 % w/v verglichen. Trotzdem lagerte sich die virale DNA bevorzugt an *beads* ohne Primer an (Daten nicht gezeigt). Auch eine Blockierung durch HS-DNA und/oder tRNA wurde getestet und ebenso band die virale DNA wahllos an die Kügelchen. Dieser Effekt trat bei *beads* von 1 und 2,8 µm Durchmesser auf und wurde auch ohne Blockierung beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse deuten an, dass virale DNA unspezifisch an die *beads* gebunden hat. Bei einem Durchmesser von 1 µm und einer glatten Oberfläche wäre der Umfang eines Streptavidin-Kügelchens ca. 3 µm, der eines Kügelchens mit 2,8 µm Durch-

messer ca. $9 \mu\text{m}$ ($U=2\pi r$). Da zehn Basen in der DNA-Helix 3,4 nm entsprechen, konnte für AbMV A (2632 nts) ein Umfang von ca. 895 nm und für BCTV (2993 nts) eine Länge von etwa 1020 nm berechnet werden. Die geminiviralen Zirkel könnten sich unspezifisch um die Kügelchen gewunden haben oder an Oberflächenunebenheiten verfangen haben.

Um die unspezifische Bindung zu unterbinden, wurden magnetische Kügelchen ohne Primer mit tRNA blockiert und anschließend mit RecA behandelt. Nach Zugabe von Gesamtnukleinsäuren infizierter Pflanzen wurden alle gebundenen zirkulären DNAs durch RCA vervielfältigt. Überstände und Aliquots der *beads* wurden mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Sowohl im Überstand, als auch an den Kügelchen waren perlschnurartige Stränge zu sehen (vgl. Abbildung 27a-d). Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich dabei um RCA-Produkte, die durch die Beladung mit Protein (Φ 29-DNA-Polymerase- und RecA-Moleküle) zu erkennen waren. Zwischen einzelnen Kügelchen hatten sich Netzwerke aus DNA/Protein-Strängen ausgebildet (s. Abbildung 27c und d). In diesen Versuchen wurde das illustra TempliPhi™ Kit (GE Healthcare) verwendet, welches Hexanukleotid-Primer enthält. Da diese unspezifisch auf der eingesetzten DNA-Matrize und den neu synthetisierten Strängen binden, startet die Amplifikation gleichzeitig an vielen Stellen, und es ergibt sich eine verzweigte Struktur des RCA-Produktes. Kügelchen, die nur mit RecA und Gesamtnukleinsäuren behandelt wurden und nicht zur RCA eingesetzt wurden (s. Abbildung 27e und f), zeigten im Gegensatz zu unbehandelten Kügelchen (vgl. Abbildung 27g) eine strukturiertere Oberfläche. Dies ließ darauf schließen, dass RecA-beladene virale DNA trotz der Blockierung an die Oberfläche gebunden hatte.

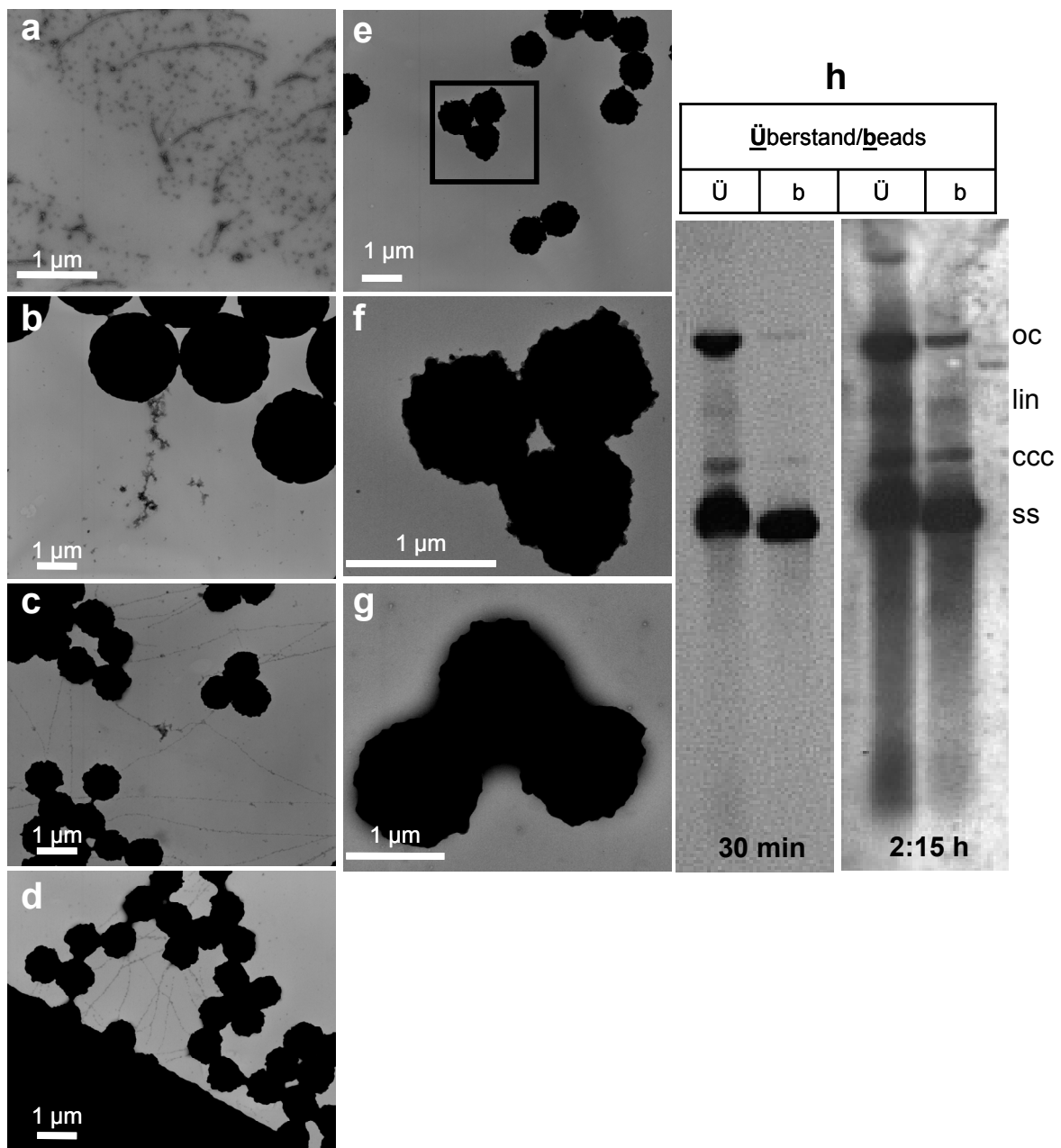


Abbildung 27: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen nach RCA auf streptavidinmodifizierten magnetischen Kügelchen. *Beads* ohne Primer wurden mit tRNA blockiert und in folgenden Ansätzen verwendet: Nach Inkubation mit RecA wurden Gesamtnukleinsäuren einer AbMV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze zu den Kügelchen (M-280: 2,8 µm Durchmesser) gegeben. Nach RCA wurden der Überstand (a) und die *beads* (b) untersucht. c und d: *beads* (T1: 1 µm Durchmesser) wurden wie für b dargestellt, behandelt; e: *beads* (T1) wurden mit RecA und Gesamtnukleinsäuren behandelt, es wurde keine RCA durchgeführt; f: Vergrößerung aus e; g: unbehandelte *beads* T1 als Negativkontrolle. h: *Beads* (1 µm) wurden mit RecA und Gesamtnukleinsäuren einer AbMV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze inkubiert. Nach Abnehmen der ungebundenen DNA und Waschen der *beads* mit W&B-Puffer wurde Ladepuffer zugegeben und für 10 min auf 65 °C erhitzt. Die Proben wurden in einem 1 %-igen TBE-Agarosegel in Gegenwart von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Nukleinsäuren wurden durch *Southern blot*-Analyse mit einer AbMV-A spezifischen Dig-markierten Sonde nachgewiesen (s. V.2.5.6). Die Expositionszeiten auf Röntgenfilme wurden wie angegeben variiert.

Um zu untersuchen, ob ein bestimmtes replikatives Intermediat bevorzugt an die *beads* gebunden hatte, wurden Kügelchen (1 μm) mit RecA und Gesamtnukleinsäuren AbMV-infizierter und nicht-infizierter Pflanzen inkubiert. Die nichtgebundenen Überstände wurden abgenommen und an die Kügelchen gebundene DNAs abgelöst. Beide Fraktionen wurden parallel durch *Southern blot*-Analyse untersucht (s. Abbildung 27h, nicht gezeigt: Kontrolle mit Gesamtnukleinsäuren der nicht-infizierten Pflanze). Eine AbMV A-spezifische Sonde zeigte nach 30 min und 2,25 h Exposition des Röntgenfilmes in der *bead*-Fraktion vermehrt zirkuläre ssDNA. Im Überstand hingegen waren alle DNA-Formen in erwarteter Verteilung zu finden.

Um die präferentielle Bindung von ssDNA zu unterdrücken, wurden diese DNA-Moleküle aufgefüllt. Für die Komplementärstrang-Synthese dienten die drei biotinylierten Primer (AbMV_RecA, BCTV_FL bzw. BCTV_FL_D₀). Jeder Primer wurde mit den homo- oder heterologen Gesamtnukleinsäuren gemischt. Außerdem wurde eine Kontrolle mit Gesamtnukleinsäuren einer nicht-infizierten Pflanze mitgeführt. Nach Bindung der Primer wurde die ssDNA durch T4-DNA-Polymerase verlängert, die keine Strangverdrängungs-Aktivität besitzt (s. V.2.8.2). In Vorversuchen hatte sich nämlich gezeigt, dass das Klenow-Fragment ungeeignet ist, da es lange einzelsträngige DNA-Stränge synthetisiert, die sich wieder bevorzugt an die Mikrokügelchen anlagern können (nicht gezeigt). Um noch verbliebene Einzelstränge aufzufüllen, wurden anschließend Hexanukleotid-Primer zugegeben und in gleicher Weise mit T4-DNA-Polymerase verlängert. Durch Inkubation der Reaktionsprodukte mit Streptavidin-Kügelchen konnten DNA-Moleküle mit gebundenen oder verlängertem biotinylierten Primern gefischt, und mittels RCA amplifiziert werden.

Die RCA/RFLP-*Hpa*II-Analyse zeigte (s. Abbildung 28), dass die Auffüllreaktion mit Hexanukleotid-Primern die unspezifischen Bindungen nicht verhindern konnte (Spuren 2, 4 und 7).

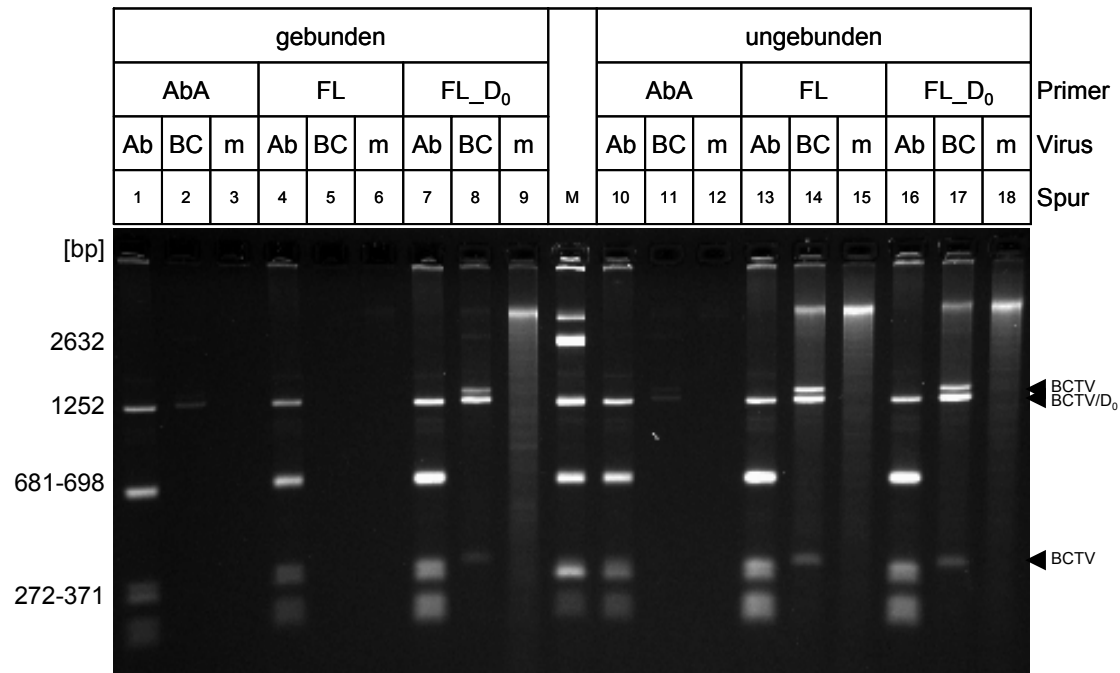


Abbildung 28: Auffüllen von ssDNA durch T4-DNA-Polymerase und Hexanukleotidprimer, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Gesamtnukleinsäuren aus AbMV-infizierten *N. benthamiana*- (Ab), BCTV-infizierten *B. vulgaris*- (BC) und uninfizierten *B. vulgaris* (m)-Pflanzen wurden mit den biotinylierten Primern (AbA, FL, FL_D₀) für 20 min bei 68 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf 4 °C wurden dNTPs und T4-DNA-Polymerase zugegeben und für 1 h bei 16 °C inkubiert. Danach wurden 625 ng Hexanukleotid-Primern zugegeben und für 1 h bei 16 °C inkubiert. Mit streptavidinmodifizierten Kügelchen wurden alle biotinylierten Moleküle gebunden (vgl. V.2.8.2) und im Vergleich mit den ungebundenen Molekülen analysiert: Nach RCA/RFLP-*HpaII* wurden die Fragmente in einem 2 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt, das wie in Abbildung 3 beschrieben gefärbt wurde. Als Marker (M) wurde *HpaII*- und *PstI*-geschnittene Gesamt-DNA von AbMV aufgetragen (vgl. Abbildung 40a).

Zusammenfassend zeigten die Experimente, dass die Wechselwirkungen zwischen Oberfläche, Primer, viralen DNAs und weiteren beteiligten Komponenten sehr komplex sein kann.

In Lösung konnte zwar die Φ 29-DNA-Polymerase Biotin-markiertes dUTP in hoher Menge einbauen (vgl. Abbildung 23), aber es konnte kein System zum Nachweis von Geminiviren auf Substraten mittels RCA etabliert werden. Auf den planaren Oberflächen konnte virale DNA nicht gebunden und/oder amplifiziert werden. Durch ihre Eigenschaft, ssDNA unspezifisch auch in Abwesenheit von gebundenem Primer zu binden, stellen die Mikrokügelchen zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine bessere Oberfläche für ein hochspezifisches Nachweissystem für Geminiviren dar. Um die Spezifität zu erhöhen, muss die Blockierung wohl weiter optimiert werden.

3. Geminivirale DNA-Formen als Matrizen für die RCA

Bei den Experimenten zur Entwicklung eines microarraybasierten Nachweissystemes für Geminiviren (s. VI.2) konnte eine Amplifikationsmethode für Plasmid-DNA entwickelt werden, bei der im Gegensatz zu dem gebrauchsfertigen illustra Templi Phi™ Kit (GE Healthcare) die Reaktionskomponenten wie u.a. Polymerase und Primer in variabler Konzentration kombiniert werden können. Diese Amplifikationsstrategie sollte dahingehend abgewandelt werden, dass anstelle von Plasmid-DNA geminivirale DNA-Formen in Gesamtnukleinsäuren infizierter Pflanzen als Matrizen für die RCA dienen können. Weiterhin sollte die Reaktionslösung keine Primer enthalten, um zu testen ob und welche replikativen Intermediate der Geminiviren aufgrund ihrer molekularen Struktur durch die Φ 29-DNA-Polymerase verwendet werden können.

Vor der praktischen Durchführung der Versuche wurde angenommen, dass die Polymerase freie 3'-OH-Enden an den *nicks* offen zirkulärer DNA-Moleküle erkennen und verlängern kann (s. Abbildung 29: „oc“). Für unterschiedliche Geminiviren wurde durch 2D-Gelelektrophorese und nachfolgende *Southern blot*-Analyse gezeigt, dass während der Replikation Zwischenstufen von einzelsträngiger zu doppelsträngiger DNA vorhanden sind (Alberter *et al.*, 2005; Erdmann *et al.*, 2010; Preiss und Jeske, 2003). Intermediate zwischen linearer ss und dsDNA (vgl. Abbildung 29: „ds linear“ und „ss linear“) könnten soweit aufgefüllt werden, bis sie vollständig doppelsträngig vorliegen. Zirkuläre ssDNA kann verlängert werden, wenn sie durch die CSR teilweise aufgefüllt wurde. Zum anderen könnten sich kurze Wirts-RNAs an homologe Bereiche angelagert haben und als Primer für die Polymerase dienen (s. Abbildung 29: „ss zirkulär“). Auch multimere DNA könnte als Matrize dienen (s. „2x ss“). Es wurde außerdem angenommen, dass zirkuläre, superspiralisierte DNA aufgrund fehlender freier 3'-OH-Enden nicht amplifiziert werden kann (vgl. Abbildung 29: „(2x)ccc“ und „rccc“). Eine weitere Matrize für die Reaktion stellen Intermediate der RDR und RCR dar (Abbildung 29: „RDR-Intermediate“ und „RCR-Intermediate“).

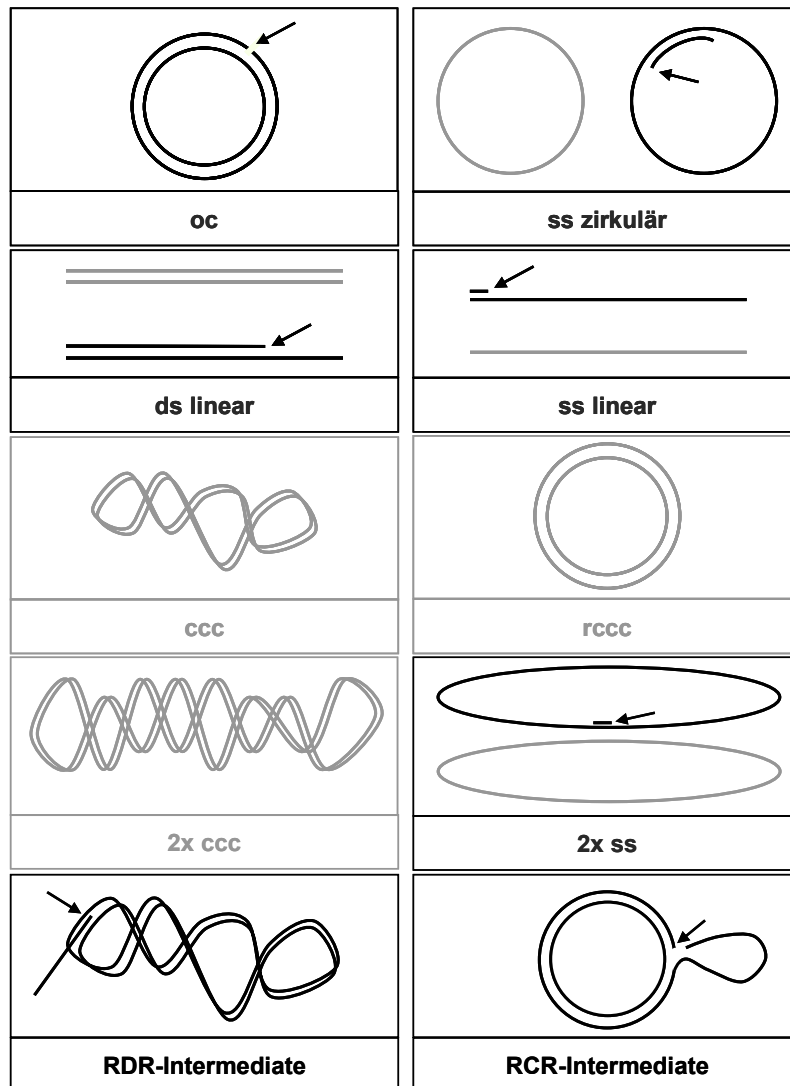


Abbildung 29: Geminivirale DNA-Formen als mögliche Matrizen für die Φ 29-DNA-Polymerase. Die Pfeile zeigen freie 3'-OH-Enden an, die verlängert werden können. DNA-Formen, von denen angenommen wurde, dass sie nicht zugänglich für die Polymerase sind, sind grau dargestellt. Kennzeichnung der DNA-Formen: oc: offen zirkulär, ds: doppelsträngig, ccc: kovalent geschlossen zirkulär, ss: einzelsträngig, rccc: entspannt kovalent geschlossen zirkulär/*relaxed covalently closed*.

Die DNA-Polymerase des Bakteriophagen Φ 29 weist neben ihrer Polymerisierungs- und Desoxynukleotidylierungsfunktion auch eine Pyrophosphorolyse- und 3'→5'-Exonukleolyseaktivität auf (Lagunavicius *et al.*, 2008). Eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes in Richtung DNA-Synthese kann durch Zugabe der anorganischen Pyrophosphatase aus Hefe erreicht werden (s. V.2.4.3), denn bei der DNA-Synthese fällt pro eingebautem Nucleosidtriphosphates (NTP) ein Molekül Pyrophosphat (PP_i) an. Da der Vorgang reversibel ist, hemmt er die Φ 29-DNA-Polymerisation. Anorganische Pyrophosphatase entzieht der Reaktion das PP_i , indem sie es in Orthophosphat umwandelt (Abbildung 30). Dadurch sollte die Effizienz der Amplifikation gesteigert werden.

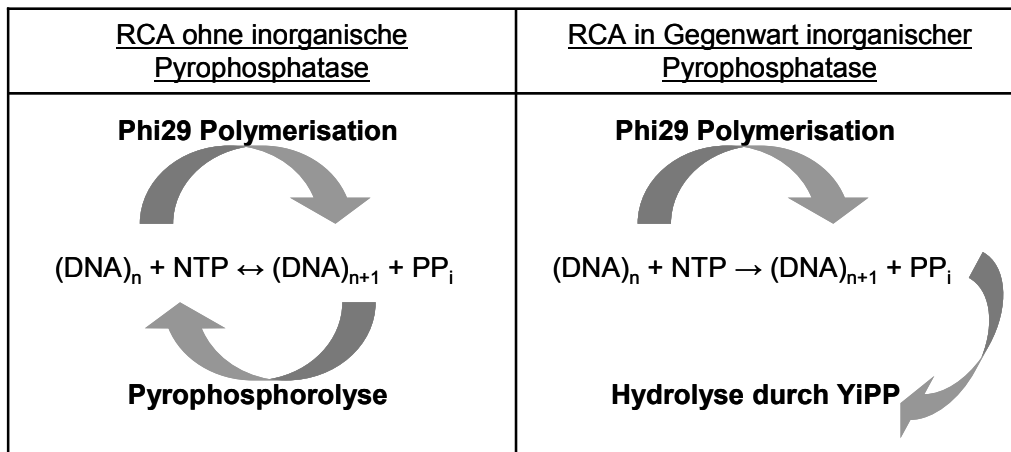


Abbildung 30: Vergleich der Reaktionsschemata von RCA ohne und mit anorganischer Pyrophosphatase aus Hefe (YiPP). PP_i: Pyrophosphat, n: Länge der DNA in Nukleotiden, n+1: Verlängerung der DNA um ein Nukleotid.

Gesamtnukleinsäuren einer AbMV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze wurden mit Φ 29-DNA-Polymerase, anorganischer Pyrophosphatase und dNTPs inkubiert (s. V.2.4.3). Proben wurden direkt nach Mischen der Reaktionsbestandteile (= Nullkontrolle) und nach 1, 4 bzw. 16 h entnommen und die Reaktion gestoppt. Die viralen DNA-Formen wurden nach eindimensionaler Chloroquinelektrophorese mittels *Southern blot*-Hybridisierung nachgewiesen (vgl. Abbildung 31).

Bereits eine 60-minütige Inkubation führte zu einem erkennbaren Anstieg der Konzentration von RCA-Produkten und DNA-Multimeren im Vergleich zur Nullkontrolle (Abbildung 31, Spuren 1 und 2). Wie zu erwarten war, stieg die Amplifikation der viralen DNA über den untersuchten Zeitraum weiter an (4 h: Spur 3; 16 h: Spuren 4 und 5). Die Effizienz der Reaktion zeigte sich auch daran, dass die Probe nach 16-stündiger Inkubation zähflüssig wurde. Die Konzentration an zirkulärer ssDNA sank schon nach ein und vier Stunden ab (Abbildung 31, „ss“). Zwischen vier und sechzehn Stunden fand keine weitere Reduktion statt. Die Topoisomer-Verteilung der cccDNA veränderte sich. Über den Untersuchungszeitraum nahmen die weniger spiralisierten Formen in ihrer Intensität ab (Abbildung 31, „ccc“ und dazugehörige weiße Pfeilspitzen). Die Konzentration der ocDNA hingegen blieb auch nach 16 Stunden konstant (Abbildung 31, „oc“ und schwarze Pfeilspitze).

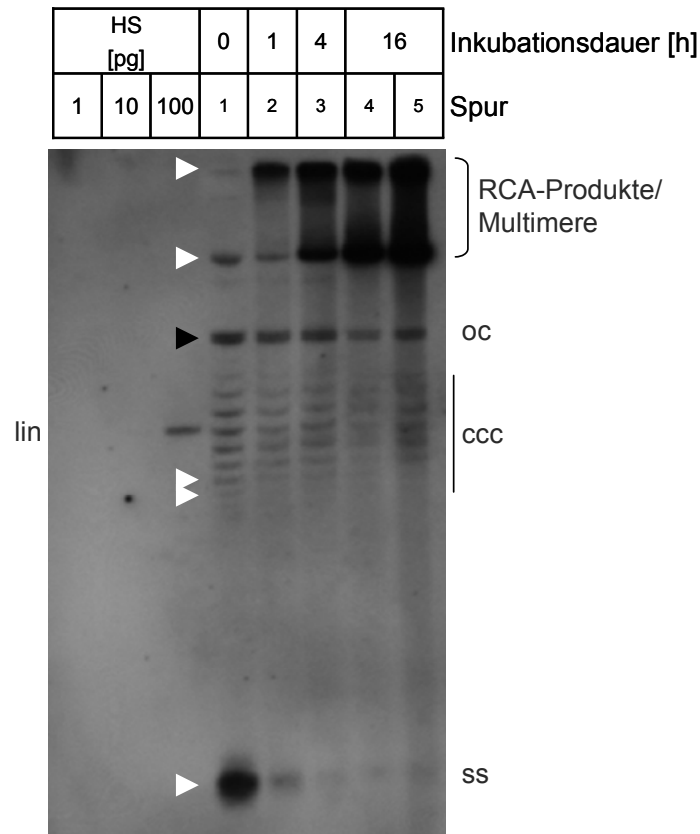


Abbildung 31: DNA-Formen von AbMV nach RCA für unterschiedliche Zeitpunkte. Gesamtnukleinsäuren einer AbMV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze wurden mit Φ 29-DNA-Polymerase, anorganischer Pyrophosphatase und dNTPs für 0, 1, 4 bzw. 16 h inkubiert (s. V.2.4.3). Die Reaktionen wurden zum Abstoppen mit Ladebuffer gemischt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die DNA-Formen wurden in einem 1,4 %-igen TBE-Agarosegel in Gegenwart von $15\text{ }\mu\text{g/ml}$ Chloroquin aufgetrennt (s. V.2.5.4). Von dem Ansatz mit einer Inkubationsdauer von 16 h wurden $1/3$ (Spur 4) und $1/2$ (Spur 5) aufgetrennt. Als Hybridisierungsstandard dienten 1, 10 und 100 pg lineare DNA von AbMV A. Die Nukleinsäuren wurden durch *Southern blot*-Analyse mit einer DNA A-spezifischen Sonde nachgewiesen (s. V.2.5.5 und V.2.5.6). Kennzeichnung der DNA-Formen wie in Abbildung 29; lin: linear doppelsträngig, ss: einzelsträngig zirkulär. Eine Veränderung der Konzentration wurde durch weiße Pfeilspitzen, gleich bleibende Konzentrationen durch dunkle Pfeile gekennzeichnet.

Ob die RCA-Produkte doppel- oder einzelsträngig sind, wurde mit Gesamtnukleinsäuren einer AbMV-infizierten *N. benthamiana*- und von vier BCTV-infizierten *B. vulgaris*-Pflanzen überprüft, die mit Φ 29-DNA-Polymerase, anorganischer Pyrophosphatase und dNTPs für 16 h inkubiert und durch RCA/RFLP-*Hpa*II (AbMV) bzw. -*Sal*I (BCTV) analysiert wurden (s. Abbildung 32). Die gewählten Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige, nicht aber einzelsträngige DNA. Die Fragmente, die nach RCA/RFLP erhalten wurden (Abbildung 32, Spuren 1 und 3) zeigen somit, dass es sich bei den RCA-Produkten um dsDNA oder ssDNA mit doppelsträngigen Bereichen handelte. Die Ausbeute des Amplifikationsansatzes war jedoch sehr gering, wie der Vergleich zum Größenstandard („M“) zeigt, der durch RCA mit dem illustra TempliPhi™ Kit (GE Healthcare) gewonnen wurde.

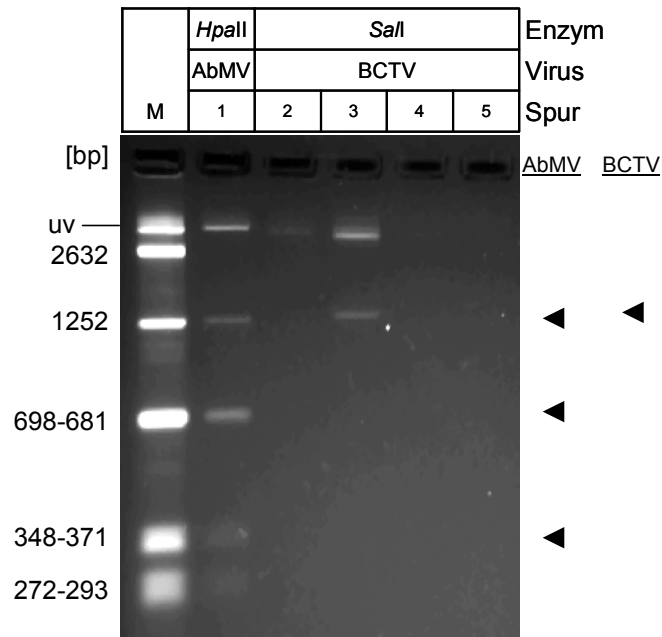


Abbildung 32: Nachweis der Replikation von AbMV und BCTV durch RCA/RFLP-Analyse mit *Hpa*II bzw. *Sal*I. Gesamtnukleinsäuren einer AbMV-infizierten *N. benthamiana*- und von vier BCTV-infizierten *B. vulgaris*-Pflanzen wurden mit Φ 29-DNA-Polymerase, anorganischer Pyrophosphatase und dNTPs für 16 h inkubiert. Nach RCA/RFLP-*Hpa*II (AbMV) und -*Sal*I (BCTV) wurden die Fragmente in einem 1 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt, das wie in Abbildung 3 beschrieben gefärbt wurde. Der Marker (M) war *Hpa*II- und *Pst*I-geschnittene Gesamt-DNA von AbMV (s. Abbildung 40a). Die Pfeilspitzen zeigen die erwarteten Fragmente von AbMV bzw. BCTV.

Die unterschiedliche Verwendung der replikativen Intermediate als Matrizen für die RCA sollte charakterisiert werden. Die Tendenz zur Überspiralisierung der topologischen Isoformen der **cccDNA** nach RCA kann dadurch erklärt werden, dass Vorstufen der RDR verlängert wurden. Bei dieser Replikationsstrategie dringen lineare ssDNA-Moleküle in superspiralisierte zirkuläre DNA ein, binden an homologe Bereiche der cccDNA und bilden dort einen kurzen *Displacement-loop*. Durch RCA können die 3'-Enden der linearen DNA verlängert werden. Während der Verlängerung der linDNA werden die beiden Stränge der cccDNA lokal getrennt. Die resultierende Molekülspannung setzt sich über die gesamte Länge der cccDNA fort und drängt den 5'-gelegenen Anteil der linDNA aus dem *Displacement-loop* heraus. Somit bleibt die Anzahl der gepaarten Basen zwischen cccDNA und linDNA während der Amplifikation konstant, während die Länge des ungepaarten 5'-Endes stetig wächst. Zudem kann dieser einzelsträngige Bereich aufgefüllt werden, wonach das Produkt ähnliche elektrophoretische Eigenschaften wie die Multimere besitzt. Folglich bleiben nur die stärker überspiralisierten Topoisomere übrig. Auch nach 16-stündiger Inkubationsdauer konnte **ssDNA** nachgewiesen werden. Dies beruht darauf, dass ssDNA, die mittels Chloroquinelektrophorese und *Southern blot*-Analyse dar-

gestellt werden kann, aus zwei Populationen besteht. Zum einen nackte zirkuläre ssDNA aus Viruspartikeln und zum anderen DNA mit überwiegend einzelsträngigem Anteil, die jedoch kurze doppelsträngige Bereiche aufweist. Die Polymerase konnte partiell doppelsträngige ssDNA als Matrize verwenden. Der Anteil an ssDNA, der auch nach RCA nachgewiesen werden konnte, stellt somit vollständig einzelsträngige zirkuläre DNA dar, die nicht als Matrize dient. Weiterhin kann der *spot* auch lineare ssDNA enthalten, die keinen Primer für die Polymerase aufweist.

Unklar war jedoch, warum für die **ocDNA** nach RCA keine Konzentrationsänderung festgestellt werden konnte, obwohl angenommen wurde, dass der *nick* als Startpunkt für die Φ 29-DNA-Polymerase dienen kann. Es kamen drei mögliche Ursachen in Frage, die in den nachfolgenden Experimenten untersucht werden sollten: 1. Die Polymerase kann den *nick* der ocDNA nicht als Ausgangspunkt der Amplifikation nutzen, weil er zu klein ist. 2. Eine 5'-Modifikation des genickten Stranges hindert die Polymerase am Zugang zum freien 3'-Ende. 3. Aufgrund einer 3'-Modifikation kann keine Verlängerung stattfinden.

Für eine Modifikation am 5'-Ende des genickten Zweitstranges kommt primär Rep in Frage, das während der RCR kovalent an dieses Ende gebunden bleibt. Weitere Proteine, die kovalent an die Enden der DNA gebunden sein können, sind Topoisomerasen. Diese Enzyme bestimmen den Spiralisierungsgrad von DNA, indem sie entweder Windungen einführen oder die DNA relaxieren. Dabei trennen sie entweder einen oder beide DNA-Stränge und führen den Gegenstrang bzw. einen Doppelstrang hindurch. Während dieses Vorganges sind die Topoisomerasen kovalent an eines der beiden Enden gebunden. Topoisomerasen des Typ IA bilden zwischen einem Tyrosinrest im aktiven Zentrum und dem 5'-Ende der geschnittenen DNA eine Phosphodiesterbindung, während Typ IB-Enzyme auf gleiche Weise an das 3-Ende binden (Champoux, 2001).

Um zu untersuchen, warum die ocDNA nicht als Matrize der RCA diene, wurden Gesamtnukleinsäuren infizierter Pflanzen vor der RCA mit einer von zwei Exonukleasen vorbehandelt. Exonuklease III entfernt Mononukleotide in 3'→5'-Richtung, während T7-Exonuklease in 5'→3'-Richtung aktiv ist. Beide Enzyme besitzen zudem eine RNase H-Aktivität und können modifizierte Mononukleotide nicht entfernen. Im Falle, dass der *nick* zu klein für die Polymerase ist (1., s.o.), kann seine Öffnung

durch beide Exonukleasen die Reaktion begünstigen. Blockiert eine 5'-Modifikation den Zugang der Polymerase zum *nick* (2., s.o.), kann dieser durch die Exonuklease III-, nicht jedoch T7-Exonuklease-Behandlung erweitert werden, und die Amplifikation kann stattfinden. Im Falle der 3'-Modifikation (3., s.o.) würde keine der beiden Behandlungen eine Amplifikation ermöglichen. Beide Exonukleasen könnten die entsprechende Modifikation nicht entfernen, und somit stünde kein freies 3'-OH-Ende zur Amplifikation zur Verfügung.

Weiterhin wurde ein Effekt der Vorbehandlungen auf die ssDNA erwartet. Geminivirale ssDNA kann in der Pflanze auf zwei mögliche Arten für die RCA geprimt werden. Zum einen kann Wirts-RNA an homologe Bereiche binden. Andererseits werden während des Replikationszyklus der Geminiviren kurze RNA-Stränge durch RNA-Polymerase oder DNA-Primase an der ssDNA synthetisiert, die durch eine DNA-Polymerase verlängert werden (Hull, 2009). Wie bereits erwähnt, besitzen ssDNA-Moleküle mit kurzem doppelsträngigem Anteil, die wahrscheinlich die Hauptmatrize für die RCA darstellten, ähnliche elektrophoretische Eigenschaften wie reine ssDNA. Da beide Exonukleasen zusätzlich eine RNase H-Funktion besitzen, sollten die partiell doppelsträngigen DNAs damit vollständig als Matrizen entfernt werden. Daneben wurde eine Vorbehandlung mit RNase H durchgeführt, womit RNA-Stränge in DNA/RNA-Hybriden entfernt werden sollten. Die ssDNA-Moleküle, an denen durch Primase ein RNA-Strang gebildet wurde, welcher bereits durch DNA verlängert wurde, könnten trotz RNase H-Behandlung weiter als Matrize verwendet werden. Zurzeit ist nicht bekannt, ob Φ 29-DNA-Polymerase eine Strangverdrängungsaktivität für RNA besitzt. Eine Entfernung des RNA-Primers aus CSR-Intermediaten durch RNase H könnte dies zeigen, indem die DNA-Formen zur RCA freigegeben werden.

Gesamtnukleinsäuren einer AbMV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze wurden mit T7-Exonuklease, Exonuklease III oder RNase H vorbehandelt und nach Inaktivierung der Enzyme in eine RCA mit Φ 29-DNA-Polymerase und anorganischer Pyrophosphatase eingesetzt. Die Exonuklease-Behandlungen wurden für eine limitierte Zeit durchgeführt, die im Vorfeld optimiert wurde (Daten nicht gezeigt), um nicht den vollständigen Zweitstrang der ocDNA zu entfernen. Die DNA-Formen vor und nach RCA wurden durch eindimensionale Chloroquingelelektrophorese mit anschließender *Southern blot*-Analyse nachgewiesen (vgl. Abbildung 33).

Im Vergleich zur unbehandelten Probe (Abbildung 33, Spur 1) nahm die Konzentration an ssDNA nach Vorbehandlung der Gesamtnukleinsäuren mit **T7-Exonuklease** (Spur 4) leicht ab, ocDNA konnte nicht detektiert werden und die Konzentration heterogener DNA (hDNA, Multimere) war stark erniedrigt. Nach RCA wurden die Intensitäten aller DNA-Formen erhöht und die Effektivität der Reaktion zeigte sich im Wesentlichen im Konzentrationsanstieg der RCA-Produkte. Die **Exonuklease III**-Behandlung hatte keine Auswirkung auf die Konzentration der ssDNA, während ocDNA nicht nachgewiesen werden konnte und hDNA fast vollständig verschwand. Für die cccDNA wurde nach Vorbehandlung ein Konzentrationsanstieg im Vergleich zur unbehandelten Probe (Spuren 1 und 5) beobachtet. Nach RCA sank der Anteil der ssDNA und cccDNA, während RCA-Produkte und Multimere vermehrt auftraten. Außerdem fand durch RCA eine (teilweise) Entspiralisierung der cccDNA statt, was sich in einer Abnahme der Topoisomere im oberen Bereich des Clusters äußerte. Nach **RNase H**-Behandlung war der Anteil an linearer dsDNA im Vergleich zur unbehandelten Probe und den Exonuklease-Vorbehandlungen erhöht. Dies trat nicht auf, wenn RNase H und eine der Exonukleasen kombiniert wurden (Daten nicht gezeigt). Multimere DNA wurde nicht durch das Enzym angegriffen. Nach RCA sank der Anteil an ssDNA leicht und mehrere DNA-Formen konnten detektiert werden, die ausgehend von einer Position unterhalb der ssDNA eine „Leiter“ bildeten, die auf Höhe der linearen dsDNA endete, welche deutlich an Intensität zugenommen hatte (s. Abbildung 33, Spur 8, schwarze Pfeilspitzen). Außerdem nahm die Konzentration der cccDNA ab. Es wurde kein Konzentrationsanstieg an Multimeren und RCA-Produkten nach RCA festgestellt.

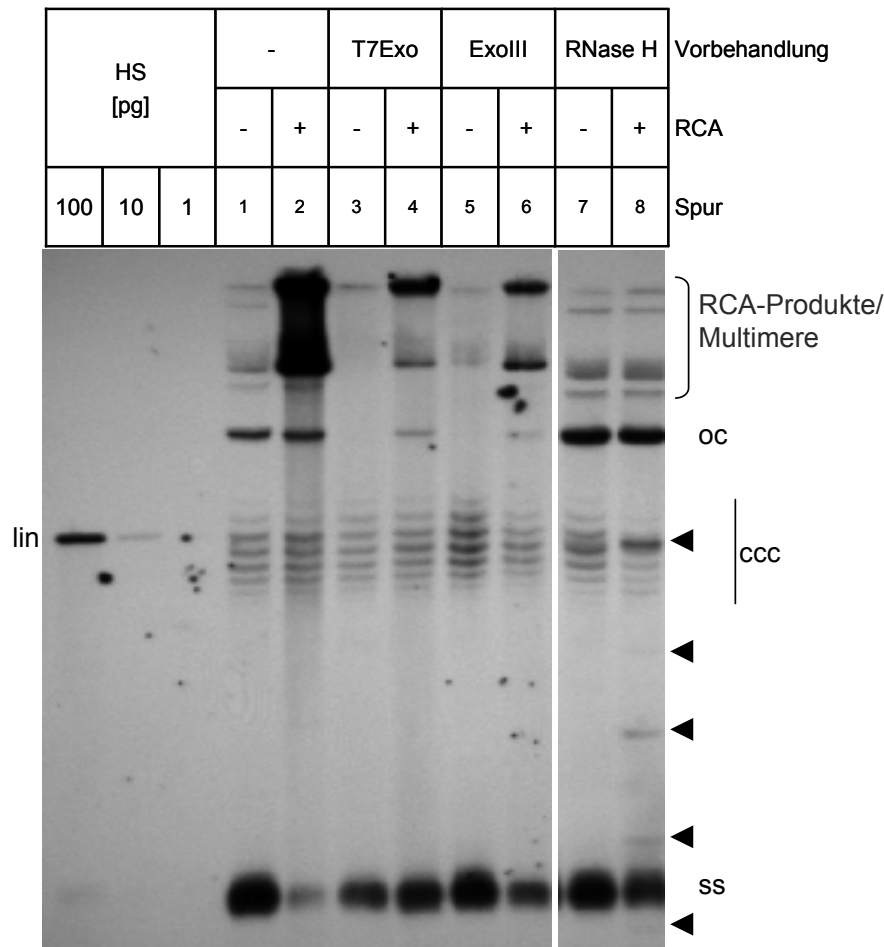


Abbildung 33: DNA-Formen von AbMV nach Vorbehandlung der Gesamtnukleinsäuren mit T7-Exonuklease (T7-Exo), Exonuklease III (Exo III) oder RNase H. Gesamtnukleinsäuren wurden mit Exonuklease III (30 min, „Exo III“), T7-Exonuklease (3 min, „T7-Exo“) oder RNase H (1 h) inkubiert (vgl. V.2.4.3). Die Enzyme wurden durch Phenolisierung entfernt und die Nukleinsäuren in Gegenwart von HS-DNA gefällt (s. V.2.5.1). Eine Kontrolle wurde nicht vorbehandelt, jedoch phenolisiert und zur Fällung eingesetzt (Spuren 1 und 2). Eine Hälfte der Proben wurde mit Φ 29-DNA-Polymerase, anorganischer Pyrophosphatase und dNTPs für 16 h inkubiert (s. V.2.4.3), während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Chloroquinelektrophorese und *Southern blot*-Analyse mit einer AbMV A-spezifischen Sonde wurden wie in Abbildung 31 durchgeführt.

Nachdem die Exonuklease- und RNase H-Behandlungen vor der RCA interessante Einblicke in die Art der verwendeten Topoisomere gaben, wurden zur Optimierung der Reaktionsausbeute weitere Vorbehandlungen mit RNase A und dem *nicking*-Enzym *Nb.BbvCI* getestet, welches an doppelsträngiger DNA sequenzspezifisch einen Einzelstrangbruch setzt. Außerdem wurden vollständige Exonuklease-Behandlungen sowie die Kombination beider Exonukleasen miteinander oder mit RNase H durchgeführt. Allerdings konnten keine erhöhten Konzentrationen an RCA-Produkten erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigten die Versuche, dass partiell doppelsträngige ssDNA als Matrize für Φ 29-DNA-Polymerase diene. Erstaunlicherweise konnte ocDNA trotz des *nicks* nicht durch die Polymerase als Matrize verwendet werden. Exonuklease- und RNase H-Behandlung der Gesamtnukleinsäuren vor RCA stellten eine praktikable und interessante Methode dar, um geminivirale Intermediate durch eindimensionale Gelelektrophorese und nachfolgende *Southern blot*-Analyse zu charakterisieren. Um die RCA auf geminiviralen DNA-Intermediaten als Diagnostikwerkzeug verwenden zu können, besteht jedoch Optimierungsbedarf hinsichtlich der Menge des erzielten RCA-Produktes.

VII Diskussion

1. Defekte DNAs von BCTV korrelieren unterschiedlich mit Symptomen in Zuckerrübe

1.1 DNA-Interferenz in transgenen Zuckerrüben

Während des Infektionsverlaufes treten bei einigen Geminiviren D-DNAs auf (Casado *et al.*, 2004; Frischmuth und Stanley, 1992; Frischmuth *et al.*, 2001; MacDowell *et al.*, 1986; Paprotka *et al.*, 2010d; Patil *et al.*, 2007; Stenger, 1994). Dies wurde auch für pflanzliche RNA-Viren (Roossinck *et al.*, 1992) und manche humane Viren gezeigt (Hennes-Stegmann und Schroder, 1982; Yuan *et al.*, 1998). D-DNAs einiger Geminiviren, darunter BCTV, konnten die Replikation ihres Elternvirus in *N. benthamiana* hemmen (vgl. IV.1.1.4). Um DNA-Interferenz in dem natürlichen Wirt von BCTV zu untersuchen, wurde *B. vulgaris* var. *altissima* mit einer D-DNA (D₀-DNA) von BCTV transformiert (Lauster, 2000). Die statistische Auswertung der Gesamtheit der infizierten Pflanzen (ohne Unterscheidung der Linienzugehörigkeit) zeigte zwar eine Symptomabschwächung für transreplizierende Pflanzen im Gegensatz zu nicht-transreplizierenden oder nicht-transformierten Pflanzen (Horn *et al.*, 2011). In der Zuckerrübe wurde jedoch nicht die Effektivität erreicht, welche für die Modellpflanze *N. benthamiana* beobachtet wurde (Frischmuth und Stanley, 1994; Frischmuth *et al.*, 1997a). Weiterhin wurde durch die PCR-Analyse keine klare Unterscheidung zwischen D₀-DNA und spontan gebildeten D_n-DNAs getroffen, so dass deren Einfluss auf die Replikation des Elternvirus nicht getrennt analysiert werden konnte (Horn *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die infizierten Zuckerrüben mittels RCA/RFLP-Analyse untersucht, was die Wechselwirkungen von D₀-, D_n-DNA und Elternvirus detaillierter wiedergab, als es durch PCR möglich war. Allerdings zeigten die Untersuchungen, dass das Transgen nicht mit der Replikation von BCTV interferierte und damit keine Symptomabschwächung zu sehen war (Horn *et al.*, 2011).

Für die Mehrzahl der Pflanzen konnte zum Zeitpunkt 3 wpai eine annähernd äquimolare Replikation von Elternvirus und D₀-DNA festgestellt werden. Es wurde daher zunächst angenommen, dass der Wettbewerb zwischen viraler DNA und Transgen um Ressourcen für Replikation zu einem späteren Zeitpunkt einsetzen könnte, wenn

die Amplifikation der D₀-DNA ein Maximum erreicht hätte. In der Tat trat BCTV in den späteren Analysen in den Hintergrund und D-DNAs dominierten in der RCA/RFLP-Analyse. Die erwartete Erholung von der Infektion, wie sie in *N. benthamiana* zu sehen war (Frischmuth und Stanley, 1994; Frischmuth *et al.*, 1997a), konnte in den untersuchten transgenen Linien nur selten beobachtet werden. Nur wenige Pflanzen der Linien 84107K und 84124T zeigten diesen Effekt. Eine Regeneration trat zudem in der nicht-transgenen Linie 9K9010 auf. Da das Transgen erwiesenermaßen nicht an der Symptomabschwächung beteiligt war, können z.B. somaklonale Effekte als Auslöser der Regeneration infizierter Pflanzen in Betracht gezogen werden. Diese genetischen und phänotypischen Variationen können in klonal vermehrten Pflanzen während der Zellkultur auftreten (Kaepler *et al.*, 2000).

Zur Beurteilung der beobachteten Effekte auf die Symptomausprägung ist wichtig, den Begriff Resistenz klar zu definieren. Grundsätzlich sind die meisten Pflanzen gegen die meisten Pathogene widerstandsfähig (Dangl und Jones, 2001). Die erste Barriere für Pathogene sind passive Mechanismen wie die schützende Wachsschicht der Kutikula oder antimikrobielle Verbindungen, die von der Pflanze abgesondert werden. Wird trotzdem z.B. ein Geminivirus durch das Überträgerinsekt in die Pflanze eingebracht, können vier Situationen eintreten. 1. Die Pflanze ist „immun“, die Entpackung der Viren findet statt, jedoch ist die Replikation komplett unterbunden. 2. Die Pflanze ist resistent. Die Ausbreitung unterbleibt, und das Virus bleibt auf die infizierten Zellen beschränkt. 3. Die Pflanze ist empfänglich (Suszeptibilität). Die Viren replizieren und breiten sich systemisch aus. Suszeptibilität lässt sich wie folgt gliedern. Sensitive Pflanzen bilden Symptome aus, tolerante Pflanzen sind nach außen hin nicht als infiziert erkennbar, replizieren jedoch das Virus. Des Weiteren kann eine empfangliche Pflanze sich erholen (*recovery*), und neue Sprosstriebe lassen keine Symptome erkennen und sind virusfrei. 4. Das Virus induziert erworbene Resistenz in seiner Wirtspflanze (SAR = *systemic acquired resistance*). Während der Ausprägung der SAR wird die Expression einiger Gene verändert, deren Produkte in die Pathogenabwehr involviert sind (Ryals *et al.*, 1996).

Da tolerante Pflanzen das Virus vermehren, stellen sie ein Reservoir für Mutationen innerhalb des viralen Genoms, Rekombination zwischen möglichen parallel vorhandenen Pathogenen oder zwischen Virus und Pflanze dar. Ein Überträgerinsekt, kann

folglich an einer toleranten, infizierten Pflanze entweder das unmutierte Virus oder eine veränderte Form aufnehmen und auf andere Wirte übertragen. Durch den Anbau toleranter Pflanzen kann somit die Ausbreitung von Geminiviren oder Pflanzenviren im Allgemeinen begünstigt werden. Bei transgenen Pflanzen sollten zusätzliche Risiken abgewogen werden. Die Versuche von Frischmuth und Stanley (1998) zeigten, dass es zwischen Virus und Pflanze zu Rekombination kommen kann. In diesem Fall erwarben ACMV-Konstrukte mit einer Deletion im AV1-ORF den deletierten Bereich aus CP-transgenen Pflanzen. Ein weiterer Aspekt, der bei der Herstellung von transgenen Nutzpflanzen bedacht werden muss, ist die Frage der Akzeptanz durch Anbaubetriebe und Verbraucher (Ferber, 1999).

Bei allen Zuckerrübenlinien konnte durch RCA/RFLP-Analyse die Virusreplikation über einen Zeitraum von 13 Wochen nachgewiesen werden. Man kann also von Suszeptibilität sprechen. Bei Linie 9K9010 sollte der Begriff Toleranz zur Beschreibung der Effekte verwendet werden, da auch in systemischen Blättern virale DNA repliziert wurde, jedoch Symptome wie Blattrollen und Wachsminderung fehlten. Bei den Linien, die einen Erholungseffekt zeigten, wurde ebenfalls eine Virusreplikation in systemischen Blättern nachgewiesen. Somit kann nicht von einer echten Erholung von der Infektion gesprochen werden, und diese Linien (v.a. Linie 9K9010) sind aufgrund der bereits beschriebenen Risiken nicht für den Anbau geeignet.

Neben somaklonalen Effekten kommen auch andere Faktoren für den Rückgang der Symptome in Frage. Im Verlauf der Experimente wurde eine Veränderung der Viruspopulation beobachtet. Oft trat das Elternvirus in den Hintergrund und unterschiedliche D-DNAs wurden repliziert, was auf intensive Mutationsereignisse rückschließen lässt. Durch genetische Variation wird es einer Art ermöglicht, sich einer wechselnden Umgebung anzupassen, wobei Viren genetisch besonders variabel sind (Schneider und Roossinck, 2001). Dabei kann es innerhalb eines Organismus zur Bildung von Quasispezies kommen. Dieser Begriff beschreibt eine Viruspopulation, die ein Spektrum an Mutanten umfasst, die jedoch untereinander eng verwandt sind (Domingo *et al.*, 1998). Die Population wird kontinuierlich durch genetische Variation, Konkurrenz und Selektion verändert. Das Auftreten von Quasispezies kann sich auf zwei Arten auf das Virus auswirken (Forns *et al.*, 1999). Auf

der einen Seite können Mutationen einem schlecht angepassten Organismus helfen, sich an seine Umgebung anzupassen. Dies tritt unter konstanten Umweltbedingungen bei einem Wettbewerb innerhalb der Population auf (Domingo und Holland, 1997). Andererseits führen Mutationen in einer Viruspopulation oft zum Verlust der Fitness (Forns *et al.*, 1999), dies wird auch mit dem Begriff der Muller-Ratsche oder Muller-Sperrklinke beschrieben (Muller, 1964). Ist die Mutationsrate hoch und ein signifikanter Anteil der Mutationen schädlich, können durch *bottleneck*-Ereignisse Virusvarianten selektiert werden, welche die allgemeine Leistungsfähigkeit des Virus reduzieren (Duarte *et al.*, 1992). Bei Viren stellt die Übertragung ein *bottleneck* dar (Clarke *et al.*, 1994), da nicht die gesamte Population, sondern einzelne Varianten weitergegeben werden. Kleine Populationen oder asexuell reproduzierende Organismen sind im Gegensatz zu sexuell reproduzierenden Lebewesen nicht in der Lage, den Fitnessverlust durch Rekombination auszugleichen. Die Häufigkeit, mit der D_n-DNAs von BCTV in den Infektionsexperimenten auftraten zeigt, dass die Mutationsrate für dieses Virus sehr hoch ist, was auch Untersuchungen an anderen Geminiviren belegten. Die experimentell bestimmten Mutationsraten liegen zwischen $2,9 \times 10^{-4}$ (Duffy und Holmes, 2008), $7,9 \times 10^{-4}$ (van der Walt *et al.*, 2008) und $1,7 \times 10^{-3}$ /Nukleotid/Jahr (Duffy und Holmes, 2009). Nawaz-ul-Rehman und Fauquet (2009) zeigten durch ihre Untersuchungen, dass die Werte abhängig von Virus, Wirtspflanze, Alter der inokulierten Pflanze und Homogenität des Inokulums sind. Ein *bottleneck*-Ereignis in der Pflanze kann der systemische Transport sein, wie es für das RNA-Virus CMV nachgewiesen wurde (Ali und Roossinck, 2010). Eine artifizielle Population von CMV-Mutanten konnte nach einigen Tagen aus inokulierten Blättern unterschiedlicher Wirtspflanzen isoliert werden, allerdings wurden nicht alle Mutanten in systemisch infizierten Blättern wiedergefunden, was auf *bottlenecks* während des Transportes hinweist. In ähnlicher Weise können in den Zuckerrüben mit Erholungseffekt durch Zufall solche Elternvirus- und D-DNA-Varianten beim Transport selektiert worden sein, welche die Fitness der gesamten Viruspopulation herabsetzten.

Es wurde angenommen, dass Mutationen des C4-ORFs in den D_n-DNAs für eine Symptomabschwächung verantwortlich sein könnten. Wie die Auswertung der Versuchsergebnisse zeigte, war die Amplifikation von D_n-DNAs im Gegensatz zur D₀-DNA mit schwächeren Symptomen assoziiert. Die Zusammenhänge zwischen C4-Protein und den Symptomen in natürlichen und experimentellen Wirten wurden

bereits dargestellt (s. IV.1.1.3). Da der C4-ORF in der transgenen D₀-DNA unverändert vorliegt und zudem von der eingebrachten viralen DNA exprimiert wird, wurde angenommen, dass diese übermäßige Konzentration an C4-Protein die verstärkten Symptome in transreplizierenden Pflanzen auslösen kann. Daher wurden einige D_n-DNAs zur Charakterisierung kloniert und sequenziert. Außerdem wurde das transreplizierte Transgen zur Kontrolle isoliert und sequenziert.

1.2 Sequenzanalyse der D₀-DNA

Die Sequenz der transreplizierten D₀-DNA stimmte mit der theoretischen Sequenz überein (Frischmuth und Stanley, 1994). Lediglich der Nukleotidaustausch G₂₃₅₉T wurde *in planta* eingeführt. Wie erwartet, waren beide möglichen C4-ORFs komplett. Da nicht experimentell belegt ist, welcher ORF genutzt wird, wurde die Sequenz analysiert. Dabei konnten vier ATGs identifiziert werden, die theoretisch als Startcodon dienen können (s. Abbildung 15) und im gleichen Leseraster wie das Stoppcodon liegen. Zwei der Startcodons werden wahrscheinlich nicht genutzt, da sie vor TATA-Box und Transkriptionsstart liegen. Für die beiden ATGs, die hinter dem Transkriptionsstart liegen, ist nicht gesichert, welches das Startcodon von C4 ist.

Fondong *et al.* (2007) zeigten, dass AC4 des EACMCV vorrangig an die Plasmamembran bindet, jedoch auch an zytosolischen Membranen nachgewiesen werden kann. Da eine Membranbindung typisch für acylierte Proteine ist, wurde die Aminosäuresequenz von AC4 mit verschiedenen Algorithmen analysiert. Hiermit konnte ein konserviertes *N*-Myristylierungsmotiv vorausgesagt werden (Fondong *et al.*, 2007). Myristylierungen können verschiedene Funktionen in Proteinen erfüllen, darunter Vermittlung von Membranbindung und -targeting (Resh, 1999). Für AC4 aus EACMCV wurde ein Zusammenhang zwischen Myristylierungsmotiv und Membranbindung vermutet.

Alle Proteine, die durch Myristylierung modifiziert werden, besitzen ein N-terminales Glycin, was auch für AC4 von EACMCV zutrifft. Jedoch werden nicht generell alle N-terminalen Glycine myristyliert. Nach der kotranslationalen Entfernung des ersten Methionins des Proteins, wird Myristylsäure kovalent an das Glycin gebunden (Resh, 1999). Myristylierungen sind notwendig, jedoch alleine nicht zur stabilen Membranbindung ausreichend (Peitzsch und McLaughlin, 1993). Als zweites Signal wird eine

Anhäufung basischer Aminosäuren (polybasischer Cluster) oder die Palmytylierung eines N- oder C-terminalen Cysteins benötigt. Die Membranbindung von AC4 des EACMCV beruht wahrscheinlich auf der Myristylierung des Glycinrestes und einer Palmytylierung des direkt folgenden Cysteinrestes (vgl. Abbildung 34), wobei der experimentelle Nachweis einer Modifizierung, z.B. durch massenspektrometrische Analysen aussteht. Fondong *et al.* konnten durch Mutationsstudien belegen, dass AC4 nach Austausch von Gly₂ gegen Alanin nicht mehr an Membranen binden kann. Stattdessen wurde durch die Mutation ein Transportsignal für Chloroplasten geschaffen. Der Austausch von Cys₃ gegen Alanin bewirkte eine vorrangige Bindung an zytosolische Membranen und perinukleäre Vesikel. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass AC4 an Gly₂ tatsächlich myristyliert wird, die bereitgestellte Energie aber zu schwach ist, um die Plasmamembranbindung zu stabilisieren. Der Austausch Gly₂Ala in AC4 wirkte sich weiterhin auf die Symptome in *N. benthamiana* aus, was nicht für Cys₃Ala gezeigt wurde (Fondong *et al.*, 2007). Daher ist anzunehmen, dass Membranbindung und Pathogenität zusammen hängen. Weitere Versuche der Arbeitsgruppe um Fondong zeigten, dass AC4 systemisches *silencing* unterdrückt, indem es die Ausbreitung von siRNAs verhindert. Da AC4 zurzeit das einzige bekannte plasmamembrangebundene Protein ist, welches RNA-*silencing* unterdrückt, ist der Zusammenhang zwischen Membranbindung und Suppression des PTGS (posttranskriptionelles Gen-*silencing*) nicht geklärt.

Fondong *et al.* (2007) zeigten für einige Geminiviren, dass das N-Myristylierungsmotiv konserviert ist. Abbildung 34 zeigt den Vergleich der (A)C4-Proteinsequenzen dieser Geminiviren und BCTV bzw. ACMV-[Nigeria Ogo]. Für das AC4-Protein des letztgenannten Virus gibt es wie bei BCTV eine mögliche verlängerte Variante. In der Proteinsequenz von C4 aus BCTV, die von einem Translationsstart am ersten ATG ausgeht, kann kein N-terminales Myristylierungsmotiv gefunden werden. Für die verkürzte Proteinvariante hingegen liegen mehrere Faktoren gleichzeitig vor, welche die beschriebenen Voraussetzungen erfüllen. Zum einen folgt auf das erste Methionin ein Glycin, das nach kotranslationaler Abspaltung des Methioninrestes myristyliert werden könnte. Die siebte Aminosäure in Folge ist ein Cystein, welches palmytyliert werden kann. In der Nähe befinden sich zudem drei basische Reste (CFNSKEKFR), die eine Membranbindung stabilisieren könnten. Beide möglichen C4-Proteinsequenzen von BCTV wurden zusätzlich mit Hilfe zweier

Bei der Expression verschiedener Konstrukte von AC4 aus ACMV-[Nigeria Ogo] in *S. pombe* wurde eine Membranbindung nur für das verkürzte C4-Protein beobachtet (persönliche Mitteilung Peter Rau). Auch für dieses Protein wurde eine mögliche Myristylierungs- und Palmitoylierungsstelle mit polybasischem Cluster vorausgesagt. Ausgehend von den Arbeiten an AC4 von EACMCV (Fondong *et al.*, 2007) und ACMV-[Nigeria-Ogo] kann angenommen werden, dass die Proteine myristyliert werden, obwohl der direkte Nachweis der Modifikation aussteht. Die verkürzte Variante von C4 des BCTV beinhaltet ebenfalls ein konserviertes *N*-Myristylierungsmotiv mit einem Glycin- und Cysteinrest und drei benachbarten basischen Resten. Die von Stanley *et al.* (1992) definierte *core*-Region umfasst exakt die verkürzte Proteinvariante. Aufgrund der Übereinstimmungen stellt C4 aus BCTV ein interessantes Forschungsobjekt dar, um die Rolle der möglichen Myristylierung bei der Pathogenität zu untersuchen. Für das Protein wurde gezeigt, dass es mit zellulären Komponenten interagiert (vgl. IV.1.1.3). Teng *et al.* (2010) konnten für BSCTV zeigen, dass C4 an der systemischen Ausbreitung und am Transport zwischen Zellkern und Zytosol beteiligt ist. Es ist jedoch nicht bekannt, welche DNA (viral oder pflanzlich) dabei transportiert wird. Möglicherweise ist eine Membranbindung des Proteins für die beschriebenen Funktionen erforderlich.

1.3 Sequenzanalyse später D_n -DNAs

Die Korrelation der Daten über Replikation von Elternvirus und D-DNAs in den transgenen Zuckerrüben mit den Symptomen und die Evaluation durch statistische Methoden zeigten, dass einige D_n -DNAs in der Lage waren, einen positiven Einfluss auf den Infektionsverlauf zu nehmen (s. V.1.1 und VII.1.1). Zwar war die Replikation des Elternvirus gegenüber den D_n -DNAs in langzeitüberlebenden Pflanzen reduziert, was für eine Konkurrenz sprechen könnte. Jedoch wurden solche Unterschiede zwischen Virus- und D-DNA-Titer schon zu früheren Zeitpunkten gesehen, die betroffenen Pflanzen starben jedoch nach relativ kurzer Zeit ab. Daher müssen andere Mechanismen für den Rückgang der Symptome in Betracht gezogen werden.

Anstelle einer Konkurrenz kommt z.B. RNA-Interferenz als Ursache der Symptomabschwächung in langzeitüberlebenden Zuckerrüben in Frage, da in den meisten Pflanzen das Elternvirus (schwach) repliziert wurde. Die Expression viraler Gene könnte allerdings durch diesen Mechanismus beeinträchtigt worden sein. In Gemini-

viren treten während des Replikationszyklus keine doppelsträngigen RNA-Moleküle auf, daher kommen andere Ursachen für die Bildung von siRNAs in Frage. Durch die bidirektionale Transkription kann es zur Überlappung von Transkripten viraler und komplementärer Gene kommen, was als Ausgangspunkt für das PTGS dienen kann (Jeske, 2009). Erstaunlicherweise konnten siRNAs auch auf der intergenen Region lokalisiert werden (Pooggin und Hohn, 2004; Pooggin *et al.*, 2003). Wie bereits erwähnt, können somaklonale Effekte in klonal vermehrten Pflanzen auftreten (vgl. VII.1.1). Im Falle der langzeitüberlebenden Zuckerrüben wäre eine Verstärkung der Wirkung des PTGS durch solche Ursachen oder aufgrund der D_n -DNAs möglich.

Die untersuchten Moleküle wiesen eine Größe von durchschnittlich 1550 Nukleotiden auf (Bach *et al.*, in Vorbereitung), was typisch für geminivirale D-DNAs ist (Frischmuth *et al.*, 1997a). Fünf der D_n -DNAs hingegen waren zwischen 2180 und 2810 Nukleotide groß. Aufgrund der Größe der D_n -DNAs ist es wahrscheinlich, dass sie aus dem Elternvirus und nicht dem Transgen hervorgegangen sind. Dies wird auch dadurch gezeigt, dass in der D_0 -DNA die Nukleotide 585 bis 2206 deletiert waren, alle sequenzierten D_n -DNAs jedoch Fragmente des C2- bzw. C3-ORFs enthielten, die in diesem Bereich gelegen sind (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 17). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die D_n -DNAs aus Rekombinationen zwischen Transgen und Elternvirus entstanden sind, wie es für eine Mutante von ACMV gezeigt wurde, die eine Deletion im V1-ORF enthielt (Frischmuth und Stanley, 1998). Da RDR ein verbreiteter Replikationsmechanismus unter Geminiviren ist (Jeske *et al.*, 2001), kommt dieser Vorgang auch für die Entstehung der hier beschriebenen D_n -DNAs in Frage. Für D-DNAs von ICMV wurde angenommen, dass eine Rekombination zwischen DNA A und B durch RDR stattfand, und die defekten Moleküle Nebenprodukte der Replikation darstellen können (Patil *et al.*, 2007).

Die Analyse der Sequenzen der Deletionsstellen gab keinen Hinweis darauf, dass diese Art der Mutation an bestimmten Sequenzmotiven auftritt, oder dass nach Ausbildung eines *hairpins* der instabile Bereich ausgeschnitten und die neuen Enden ligiert werden. Eine mögliche Erklärung für die Deletionen können jedoch Untersuchungen an AbMV liefern. Für dieses Geminivirus wurde gezeigt, dass die virale dsDNA in Minichromosomen verpackt wird, wobei die Nukleosomen definierte

Bereiche im Genom einnehmen (Pilartz und Jeske, 1992, 2003). Es wurden mindestens zwei Verteilungen der Nukleosomen gefunden, die sich in Phase und Periode unterscheiden. Die Perioden von 161 bis 210 Nukleotide stellen dabei die Länge an DNA pro Nukleosomeneinheit dar. Für AbMV wurde gezeigt, dass hypersensitive Stellen für DNase I existieren, die für beide Genomkomponenten im Bereich der Promotoren und bei DNA A zusätzlich stromaufwärts des Transkriptionsstarts der zweiten komplementären Transkripte liegen (Pilartz und Jeske, 2003). Außerdem konnte durch ein- und zweidimensionale Chloroquinelektrophorese und *Southern blot*-Analyse dargestellt werden, dass der Großteil der Topoisomere der cccDNA zwölf Nukleosomen enthält, obwohl dreizehn Einheiten nötig sind, um DNA A vollständig zu bedecken. Elektronenmikroskopische Analysen der Minichromosomen lieferten zuvor ähnliche Ergebnisse (Abouzid *et al.*, 1988). Zusammen genommen deutet dies darauf hin, dass die Bereiche der Promotoren frei von Nukleosomen sind, um die Bindung von Transkriptionsfaktoren zu ermöglichen. Da Minichromosomen von AbMV geordnete Strukturen darstellen und ähnliche Strukturen auch bei den *Caulimoviridae* gefunden wurden (Olszewski *et al.*, 1982; Olszewski und Guilfoyle, 1983), kann angenommen werden, dass ein konservierter Mechanismus zugrunde liegt und gleiche Bedingungen für BCTV gelten. Es ist anzunehmen, dass der Bereich der Transkriptionsstartpunkte von BCTV ebenfalls frei von Nukleosomen ist (vgl. Abbildung 15 und Frischmuth *et al.*, 1993), mehrere Phasen der Nukleosomenanordnung auftreten können und die Länge einer gewickelten DNA-Einheit etwa der von AbMV entspricht. Werden Nukleosomen nach diesen Vorgaben über das BCTV-Genom verteilt wird auffällig, dass die äußeren Enden der deletierten Nukleotide und die Bereiche zwischen einzelnen Nukleosomen oft übereinstimmen. Ähnlich einer verdrillten Perlenkette können Bereiche zwischen den Nukleosomen in Kontakt zueinander gekommen sein, was die Deletion und die neue Verknüpfung auslöste. Die Verpackung der dsDNA als Minichromosomen kann auch eine Erklärung für die Inversionen liefern, die in D_n -DNAs [17d-f] auftraten. Es ist möglich, dass es zu einer Verdrillung kam und die Nukleotidfolge nicht deletiert, sondern in umgekehrter Reihenfolge verknüpft wurde.

In zehn der Moleküle (50 %) wurden Sequenzbereiche mit einer Länge von 44 bis 76 Nukleotide dupliziert (vgl. Abbildung 17). Diese befanden sich bei acht D_n -DNAs rechtsseits des Nonanukleotides, bei [17a] und [17d] startete die Duplikation bereits

im Nonanukleotid (TAATATTAC). Aufgrund der Häufigkeit und Ähnlichkeit dieser Sequenzvariation kann davon ausgegangen werden, dass die Bildung von D-DNAs zumindest für BCTV konservierten Mechanismen unterliegt. Eine Erklärung für die Duplikation bietet eine Kombination aus CSR und RDR. Wurde der RNA-Primer in der intergenen Region von BCTV rechtsseits der künftigen Duplikation synthetisiert, konnte der Zweitstrang in der CSR bis zu diesem Punkt aufgefüllt werden. Nach Entfernung des RNA-Primers fand die Auffüllung des Zweitstranges durch eine DNA-Polymerase statt (vgl. Abbildung 35a und b). Anstatt einer Ligation der beiden Enden ist eine abgebrochene Replikation möglich. Der Zweitstrang wechselt stattdessen die Matrize und bindet an den komplementären Bereich eines DNA-Moleküles (s. Abbildung 35c). Wird der Strang ausgehend von der Sequenz der cccDNA um einige Nukleotide verlängert, kann an 5'- und 3'-Ende eine identische Sequenz wiedergefunden werden (= Duplikation) (vgl. Abbildung 35d).

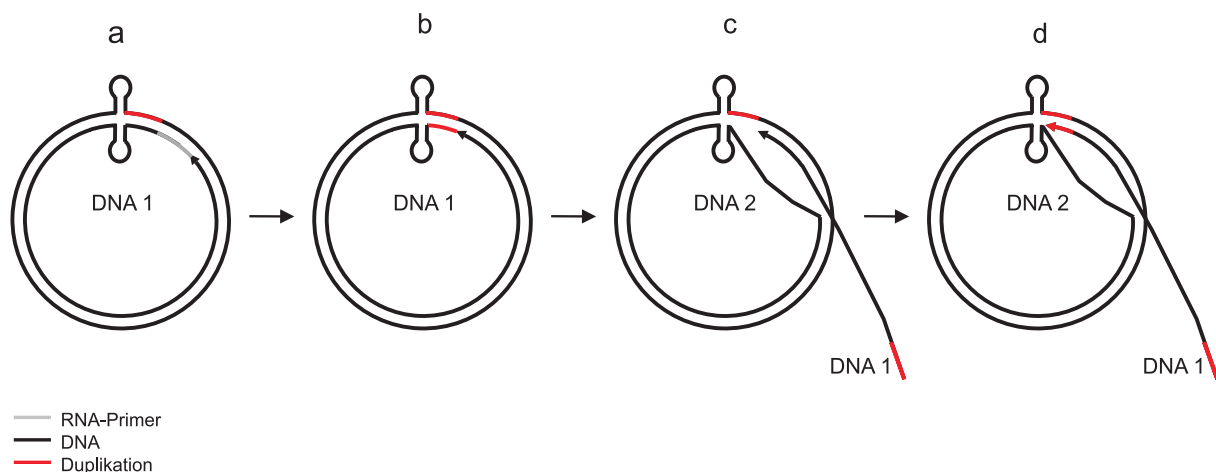


Abbildung 35: Modell zur Entstehung der Duplikationen in den D_n -DNAs. a: Ein RNA-Primer wurde rechtsseits des künftig duplizierten Bereiches (rot) synthetisiert und der Zweitstrang bis zu dessen 5'-Ende aufgefüllt. b: Der RNA-Primer wurde durch RNase H entfernt und der Zweitstrang durch DNA-Polymerase komplettiert. c: Anstelle einer Ligation der Enden des Zweitstranges findet eine RDR statt. Der Zweitstrang wechselt von DNA 1 zu einem zweiten Molekül (DNA 2) und bindet an komplementäre Bereiche. d: Durch eine Weiterführung der Replikation kommt es zur Duplikation.

Die Sequenzanalyse der D_n -DNAs zeigte, dass die meisten Moleküle einen vollständigen C4-ORF enthielten. Wie Abbildung 19 zeigt, befand sich die Mehrheit der Aminosäureaustausche in der verlängerten Variante des C4-Proteins. Wie zuvor dargestellt (vgl. VII.1.2), legt der Vergleich mit (A)C4 anderer Geminiviren nahe, dass die Transkription am zweiten ATG startet, der experimentelle Nachweis steht jedoch aus. Alle D_n -DNAs mit vollständigem C4-ORF wiesen für die verkürzte Variante eine unveränderte Aminosäuresequenz auf. Lediglich in den D_n -DNAs [9e] und [9f] wurde

durch die Substitution R₁₆₇L eine basische gegen eine hydrophobe/unpolare Aminosäure ausgetauscht. Da R₁₆₇ jedoch den letzten Aminosäurerest darstellt und auch bei anderen Geminiviren variabel ist (Stanley *et al.*, 1992), sollte sich diese Mutation nicht auf die Faltung und Funktionalität von C4 auswirken. Unter den fünf untersuchten langzeitüberlebenden Zuckerrüben gab es keine Pflanze, in der keine Quelle für C4-Protein vorhanden war. Stets wurde das Elternvirus (schwach) repliziert, und mindestens eine D_n-DNA hatte einen vollständigen C4-ORF. Einige der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten D_n-DNAs stellen mögliche Kandidaten für weitere Untersuchungen an DNA-Interferenz in der Zuckerrübe dar. Hierzu könnten D_n-DNAs mit nichtfunktionellem C4-ORF zusammen mit BCTV koinokuliert werden. Gleichzeitig kann untersucht werden, ob es in Gegenwart der D_n-DNAs aus langzeitüberlebenden Pflanzen verstärkt zur Bildung von siRNAs und damit zum *silencing* der viralen Genexpression kommt.

Es kann angenommen werden, dass [9a] die jüngste D_n-DNA zum Untersuchungszeitpunkt war, da sie lediglich eine Deletion aufwies und vollständige C1- und V1-ORFs besaß. Diese D_n-DNA war somit als einzige autark bezüglich Replikationsinitiierung und Verpackung und damit dem Elternvirus näher als den anderen defekten Molekülen. Außerdem fehlte die Duplikation, die in drei der untersuchten D_n-DNAs der Pflanze #9 gefunden wurde. Unter Umständen ist die Bildung von D_n-DNAs ein schrittweiser Prozess von Deletionen und anderen Mutationsereignissen. Des Weiteren lag die Mutationsrate von D_n-DNA [9a] mit $2,2 \times 10^{-3}$ Austausche pro Nukleotid signifikant unter dem Durchschnitt ($3,3 \times 10^{-3}$).

Die Analyse der Punktmutationen zeigte ein Übermaß an C:G→A:T Transversionen (42 % aller Austausche), die auch während der experimentellen Evolution von MSV (van der Walt *et al.*, 2008) und bei der Analyse von MSV-Isolaten (Isnard *et al.*, 1998) dominierten. DNA kann unter anderem durch Produkte des Stoffwechsels geschädigt werden, d.h. reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Aber auch spontane Hydrolyse und exogene Einflüsse wie physikalischer und chemischer Stress wirken mutagen (van Loon *et al.*, 2010). Reaktive Sauerstoffspezies werden konstitutiv, z.B. während Zellatmung und Photosynthese gebildet, steigen jedoch in ihrer Konzentration an, sobald der Organismus einer Stresssituation (z.B. Infektion) ausgesetzt wird. H₂O₂, das zwar weniger reaktiv als andere reaktive Sauerstoffspezies (*reactive*

oxygen species, ROS) ist, trägt hauptsächlich zur oxidativen Schädigung von DNA bei, da es leicht durch Membranen diffundieren kann (Boveris *et al.*, 2006). Oxidative Schädigungen betreffen vor allem Guanin, da dieses ein geringes Redoxpotential besitzt (David *et al.*, 2007). Die Hauptprodukte sind 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin (8-Oxoguanin) und 2,6-Diamino-4-Hydroxy-5-Formamidopyrimidin (faPy-Guanin), wobei 8-Oxoguanin die am besten untersuchte Veränderung auf genetischer Ebene ausgelöst durch ROS darstellt (van Loon *et al.*, 2010). Während der Replikation kann dieses zusätzlich mit Adenin Basenpaarungen eingehen, was im Austausch G→T bzw. C→A auf dem Gegenstrang resultiert. Offensichtlich erhöht sich die Häufigkeit von Transversionen mit der Zeitspanne, die ein Molekül im einzelsträngigen Zustand verbringt (van der Walt *et al.*, 2008). Da die D-DNAs die gleichen replikativen Intermediate wie das Elternvirus aufweisen und somit als ssDNA vorkommen, können damit die Beobachtungen erklärt werden. Chen *et al.* (2010) zeigten nach Inokulation von *A. thaliana* mit BSCTV eine Aktivierung von Genen der Salicylsäurekaskade, die an der Pathogenabwehr beteiligt ist (Vlot *et al.*, 2009). Salicylsäure ist an der Abwehr von Pathogenen (z.B. Pflanzenviren) dadurch beteiligt, dass sie die Aktivität und die Konzentration von Enzymen herabsetzt, die der Entgiftung von ROS dienen (Apel und Hirt, 2004). Die deutlich erhöhte Zahl an Transversionen in den untersuchten D_n-DNAs von BCTV lässt sich vermutlich auf einen ausgeprägten oxidativen Stress in *B. vulgaris* L. zurückführen, also eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen prooxidativen und antioxidativen Mechanismen in Richtung der oxidativen Reaktionen (Bartosz, 1997). Während der Versuche wurde beobachtet, dass die Zuckerrüben im Vergleich zu Pflanzen wie *N. benthamiana* äußerst sensitiv auf Verletzung reagieren und das Pflanzenmaterial nach Verletzung rasch Symptome oxidativen Stresses zeigte, z.B. Braunfärbung. Daher ist anzunehmen, dass in diesem Wirt auch während der Pathogenabwehr ein höherer oxidativer Stress vorherrscht. Zudem wurden stetig für die Pflanze neuartige Moleküle gebildet (D_n-DNAs), die sich ausbreiteten und zusätzliche Auslöser für oxidativen Stress darstellten. Die Ergebnisse der Analysen stehen im Gegensatz zu den Versuchen von Duffy und Holmes (2008; 2009) und Ge *et al.* (2007), die eine Dominanz von G:C→A:T Transitionen zeigten. Auch für das Nanovirus FBNSV wurde dieser Austausch mit großer Häufigkeit detektiert (Grigoras *et al.*, 2010). Die Rate spontaner Desaminierung von Cytosinen in ssDNA liegt bei 37 °C bei einer in 200 Jahren (Frederico *et al.*, 1990). Für BCTV in den Langzeitexperimenten ergibt

dies eine theoretische spontane Desaminierung von 10 Cytosinen in 20 Monaten und 7 Cytosinen in 14 Monaten. Für die D_n-DNA [2] (20 Monate) bzw. die übrigen D_n-DNAs (14 Monate) beträgt die mögliche Anzahl desaminiertes Cytosine fünf bzw. 83. Die resultierende C:G→T:A Transition trat jedoch lediglich fünfmal bei einer Gesamtzahl von 113 Austauschen auf. Insgesamt kann gefolgert werden, dass die Art des dominanten Nukleotidaustausches (Transversion oder Transition) von der Art der Wirtspflanze und des Virus bestimmt wird.

Für die D_n-DNAs von BCTV wurden Mutationsraten von $1,7 \times 10^{-3}$ bis $5,5 \times 10^{-3}$ (durchschnittlich $3,3 \times 10^{-3}$) Austauschen pro Nukleotid bestimmt, welche um zwei bis drei Größenordnungen höher sind als die Fehlerrate der $\Phi 29$ -DNA-Polymerase, die zwischen $4,0 \times 10^{-6}$ und $2,2 \times 10^{-5}$ liegt (Esteban *et al.*, 1993). Daher können artifizielle Substitutionen während der RCA/RFLP-Analyse ausgeschlossen werden. Für das Nanovirus FBNSV ermittelten Grigoras *et al.* (2010) eine Substitutionsrate von $1,8 \times 10^{-3}$ /Nukleotid/Jahr. Auch für die *East African cassava mosaic disease* wurden mit $1,6 \times 10^{-3}$ für DNA A und $1,3 \times 10^{-4}$ für DNA B ähnliche Werte gefunden (Duffy und Holmes, 2009). Die erhöhten Nukleotidaustauschraten für die untersuchten D_n-DNAs von BCTV lassen sich dadurch erklären, dass es in den Pflanzen zu einer freilaufenden Mutationsanhäufung ohne Selektion kam.

2. Entwicklung eines Mikrochips zur Detektion von Geminiviren

2.1 Direkte Markierung von RCA-Produkten

Die Arbeitsgruppen um Nallur bzw. Smolina (2001; 2005) konnten durch ihre Experimente zeigen, dass die Integration von modifizierten Nukleotiden durch die $\Phi 29$ -DNA-Polymerase möglich ist. Ein abgewandelter Versuchsansatz sollte auf Geminiviren übertragen werden. Dabei zeigte sich, dass Cy3-markierte Nukleotide nicht durch die $\Phi 29$ -DNA-Polymerase akzeptiert wurden. Sowohl bei Verwendung des illustra TempliPhi™ Kit (GE Healthcare), als auch bei Kombination der separat erhältlichen Reaktionskomponenten, wie Polymerase, dNTPs usw. konnte nur freies Cy3-AP3-dUTP bei 400-500 nm detektiert werden. Für Biotin-16-dUTP hingegen wurde die erfolgreiche Integration der Nukleotide in RCA-Produkte durch die $\Phi 29$ -DNA-Polymerase gezeigt. Sowohl bei der Verwendung des illustra TempliPhi™ Kits (GE Healthcare) als auch unter Verwendung der $\Phi 29$ -DNA-Polymerase von NEB

konnten diese modifizierten Nukleotide durch *Southern blot*-Analyse nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 23). Zur direkten Markierung der RCA-Produkte auf einer Microarray-Oberfläche müssen allerdings die Versuchsbedingungen angepasst werden. Während die Versuche in Lösung unter kontrollierten Bedingungen stattfanden, könnten sich auf Oberflächen heterogene Bereiche bilden, welche die Markierungseffektivität mindern. So kann die gleichmäßige Durchmischung der Reaktionslösung verhindert werden, oder Reaktionskomponenten binden an Unebenheiten der Oberfläche, so dass Konzentrationsunterschiede entstehen. Die verwendete infizierte Pflanzenprobe kann dahingehend Einfluss auf die Reaktion nehmen, indem z.B. Stoffwechselprodukte inhibierend wirken können. In Kombination mit den Einschränkungen durch die Oberfläche kann dies die Reaktionsausbeute weiter senken.

Erstaunlicherweise konnte modifiziertes dCTP, das mit einer Methylgruppe die kleinstmögliche Seitenkette besitzt, nicht durch die Φ 29-DNA-Polymerase eingebaut werden (persönliche Mitteilung Dr. Björn Krenz). Da diese Polymerase eine starke 3'→5'-gerichtete Korrekturlesefunktion besitzt, ist es wahrscheinlich, dass sie die markierten Nukleotide erkannt und entfernt hatte. Die Untersuchungen von Esteban *et al.* (1993) zeigten, dass die Verlängerung eines unpassenden Nukleotides eine 10^5 - bis 10^6 -fach geringere Effizienz hat als die eines perfekt gepaarten.

Da die Φ 29-DNA-Polymerase ungeeignet für eine direkte Markierung der DNA während der RCA auf einer Oberfläche ist, sollten die RCA-Produkte in weiteren Versuchen demnach mit SybrGold[®] angefärbt werden, was sich als geeignete Alternative zum Nachweis herausstellte.

2.2 Oberflächengebundene RCA

Innerhalb von *gene frames*[®] konnten RCA-Reaktionen auf Oberflächen durchgeführt werden. Diese Art der Hybridisierungskammer stellte eine Möglichkeit dar, das Reaktionsvolumen und die damit verbundenen Kosten zu reduzieren. Wurden jedoch spezifische Oligonukleotide auf die Oberfläche gebunden, Gesamtnukleinsäuren zugegeben und nach Hybridisierung eine RCA durchgeführt, konnten keine Signale detektiert werden. Es konnte nicht aufgeklärt werden, welcher Schritt kritisch ist, da die Bindung der Primer nachgewiesen werden konnte und auch die RCA selbst in

gene frames[®] funktionierte. Möglicherweise war die Durchmischung der Reaktionslösung nicht gewährleistet.

Die Mikrokügelchen (*beads*) boten zwar in der Theorie bessere Bedingungen für eine gleichmäßige Reaktion, da die Lösung während der Inkubation stetig durchmischt werden kann. Durch die Versuche wurde jedoch gezeigt, dass die *beads* unspezifisch einzelsträngige zirkuläre DNA binden, was sich negativ auf die Spezifität der Methode auswirkte. Auch durch unterschiedliche Blockierungen wurde die Affinität der Mikrokügelchen nicht aufgehoben.

In den letzten Jahren konnten Microarrays etabliert werden, die RCA zur Signalverstärkung nutzten. Im Wesentlichen wurden Antigene (v.a. Proteine) durch oberflächenimmobilisierte Antikörper gebunden, und die RCA diente dem indirekten Nachweis. Nach Zugabe eines sekundären Antikörpers mit einem kurzen Primer wurde ein kleiner Zirkel, meist in Form einer *padlock*-Probe, hybridisiert und durch eine Polymerase mit Strangverdrängungsaktivität (z.B. Φ 29-DNA-Polymerase) amplifiziert. Diese Strategie eines Immunoassays war auf planaren Oberflächen (Haab und Lizardi, 2006), Mikrosphären/Mikrokügelchen (Konry *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Schopf *et al.*, 2008) und Nanopartikeln z.B. aus Gold (Huang *et al.*, 2007) erfolgreich. Allerdings wurde in den meisten Fällen eine Mischung aus rekombinant erzeugten, aufgereinigten Proteinen und synthetisch hergestellten DNAs verwendet, wobei die Zirkel (die *padlock*-Probe) etwa 40 bis 80 Nukleotide groß waren (Konry *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Li und Zhong, 2007; Li *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu waren die für die Experimente ausgewählten Geminiviren bis zu 75-mal so groß. Womöglich wird die Hybridisierung kleinerer Zirkel an die Primer begünstigt, und die geminivirale DNA konnte im Gegensatz dazu nicht effektiv binden. Außerdem wurde nicht reine geminivirale ssDNA zur Hybridisierung eingesetzt, sondern ein Gemisch aus DNA-Formen, die verschiedene Stadien der Replikation darstellten. Womöglich war dies neben der Größe der Zirkel ein Faktor, der eine Hybridisierung beeinflusste. Die DNA-Formen könnten um Bindestellen an Oligonukleotiden konkurriert haben, was eine effektive Hybridisierung der zirkulären DNA einschränkte oder auch die RCA verhinderte.

3. Geminivirale DNA-Formen als Matrizen für die RCA

In den Versuchen zur Entwicklung eines diagnostischen Mikrochips (vgl. VI.2.1 und VII.2.1) konnte gezeigt werden, dass Plasmid-DNA alternativ zu dem kommerziell erhältlichen illustra TempliPhi™ Kit auch in einem Reaktionsansatz amplifiziert werden kann, in dem die separat erhältlichen Komponenten wie Φ 29-DNA-Polymerase und Primer kombiniert werden. Virale DNA liegt in der Pflanze als heterogene Mischung verschiedener replikativer Intermediate vor, und einige dieser Formen weisen molekulare Strukturen auf, von denen angenommen wurde, dass sie bereits ausreichend sind, um in Abwesenheit von Primern in der Reaktionslösung als Startpunkt für eine effiziente Amplifikation durch die Φ 29-DNA-Polymerase zu dienen. Dafür in Frage kamen die ocDNA mit ihrem genickten Zweitstrang und damit einem freien 3'-OH-Ende und teilweise doppelsträngige ssDNA, z.B. aus einem anfänglichen Stadium der CSR. Daher wurde der alternative RCA-Ansatz für Plasmid-DNA so abgewandelt, dass zum einen keine Primer zugegeben wurden. Zum anderen wurde anorganische Pyrophosphatase beigefügt, um das Reaktionsgleichgewicht in Richtung DNA-Synthese zu verlagern (vgl. VI.3).

Nach RCA ohne Zugabe von Primern wurden die DNA-Formen von AbMV durch Chloroquinelektrophorese aufgetrennt, und durch *Southern blot*-Analyse konnte gezeigt werden, dass unter den Versuchsbedingungen hauptsächlich ssDNA als Matrize für die Φ 29-DNA-Polymerase dient. Diese Beobachtung stimmt mit den anfänglichen Überlegungen überein, dass ssDNA-Zirkel mit kurzem doppelsträngigem Anteil durch die Polymerase als Matrizen verwendet werden können. Eine solche DNA besitzt eine annähernd gleiche elektrophoretische Mobilität wie reine ssDNA. Die partiell doppelsträngige ssDNA kann aus Anfangsstadien der CSR stammen, wobei ein kurzer RNA-Primer durch die Primase des Primosom-Komplexes synthetisiert und durch eine DNA-Polymerase verlängert wird (Jeske, 2009). Alternativ kann sich Wirts-RNA an homologe Bereiche der geminiviralen DNA anlagern. Für die cccDNA-Topoisomere konnte nach RCA eine Überspiralisierung festgestellt werden. Wie bereits erläutert (vgl. VI.3), wurden Zwischenprodukte der RDR verlängert. Ein DNA-Strang dringt dabei in superspiralisierte DNA ein und bindet an homologe Bereiche. Die lokale Trennung der beiden Stränge der cccDNA durch die eindringende lineare DNA führt zu einer Spannung innerhalb des Moleküls,

die während der Amplifikation zu einer kontinuierlichen Verdrängung des 5'-Bereiches der gepaarten linDNA führt, während die Anzahl der gepaarten Basen am 3'-Ende konstant bleibt. Durch den wachsenden einzelsträngigen DNA-Strang der linDNA, der zudem während der RCA aufgefüllt werden kann, hat das Produkt ähnliche elektrophoretische Eigenschaften wie DNA-Multimere. Daraus lässt sich schließen, dass nicht die beobachtete Überspiralisierung stattfindet. Vielmehr sind die weniger spiralisierten topologischen Isoformen der cccDNA geeignete Partner für ein Eindringen der linDNA während einer RDR. Durch die beschriebenen Folgen einer Amplifikation kommt es zur Verlagerung dieser Topoisomere in Richtung der Multimere während der Elektrophorese, während die nicht an der RDR beteiligten Topoisomere unverändert vorliegen.

Entgegen der Erwartungen war für die ocDNA keine Konzentrationsänderung nach RCA festzustellen. Es wurden drei mögliche Ursachen in die Überlegungen einbezogen: 1. Die Φ 29-DNA-Polymerase kann den *nick* der ocDNA nicht als Startpunkt der Amplifikation nutzen, da er zu klein ist. 2. Eine 5'-Modifikation des genickten Stranges (v.a. kovalent gebundenes Rep oder Topoisomerasen des Typ IA (Champoux, 2001)) hindert die Polymerase am Zugang zum freien 3'-Ende. 3. Aufgrund einer 3'-Modifikation (Topoisomerasen des Typ IB (Champoux, 2001)) kann generell keine Verlängerung stattfinden. Hierzu wurden Gesamtnukleinsäuren einer infizierten Pflanze mit zwei verschiedenen Exonukleasen vor Durchführung der RCA behandelt. Es wurden die T7-Exonuklease (5'→3') und die Exonuklease III (3'→5') verwendet, die beide keine modifizierten Mononukleotide entfernen. Der Anteil an ocDNA, der durch die Exonuklease-Behandlung nicht verändert wird, besitzt dementsprechend ein modifiziertes Ende. Um nicht den gesamten genickten Zweitstrang zu entfernen, wurden die Reaktionskomponenten nach Optimierung der Bedingungen für eine limitierte Dauer inkubiert. Nach beiden Vorbehandlungen konnte keine ocDNA detektiert werden. Durch die Untersuchungen zur Replikation der Geminiviren ist ausreichend belegt, dass ocDNA mit den beschriebenen Proteinmodifikationen in der infizierten Zelle vorliegt. Rep bindet während der RCR kovalent an das 5'-Ende (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999) und Topoisomerasen vermitteln die Spiralisierung der DNA, die anschließend als Minichromosomen verpackt werden kann (Pilartz und Jeske, 1992, 2003). Daher ist anzunehmen, dass modifizierte ocDNA in den infizierten Pflanzen in solch geringen

Konzentrationen vorliegt, dass sie durch eindimensionale Chloroquingelektrophorese und *Southern blot*-Analyse nicht dargestellt werden konnte. Da die ocDNA offensichtlich nur in geringem Ausmaß durch Proteine modifiziert ist, muss davon ausgegangen werden, dass der *nick* des Zweitstranges als Startpunkt für die Φ 29-DNA-Polymerase zu klein ist. Da beide Exonuklease-Vorbehandlungen für eine limitierte Zeit durchgeführt wurden, kann gefolgert werden, dass für die RCA nach Exonukleolyse ocDNA verwendet wurde, deren Zweitstrang nicht vollständig entfernt wurde. Partiiell doppelsträngige ssDNA hingegen liegt nach beiden Exonuklease-Behandlungen vollständig einzelsträngig vor und kann nicht durch die Polymerase amplifiziert werden. Beide Enzyme haben auch eine RNase H-Aktivität, so dass ebenso RNA-geprimte ssDNA durch die Behandlung als Matrize in den Reaktionsansätzen ausgeschlossen wurde.

Die Effektivität der T7-Exonuklease-Behandlung auf andere DNA-Formen zeigte sich auch darin, dass hDNA in ihrer Konzentration abnahm. Zudem sank die Menge an ssDNA. Dies lässt sich leicht erklären, wenn man bedenkt, dass während der eindimensionalen Chloroquingelektrophorese ssDNA und ssDNA mit kurzen doppelsträngigen Bereichen kolokalisieren. Letztere besitzt ein leicht verändertes Laufverhalten und ist minimal in Richtung ocDNA verschoben. Durch die Behandlung wurde der partiell doppelsträngige ssDNA Anteil angegriffen und der *spot* wurde komprimiert. Exonuklease III hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Konzentration der ssDNA, jedoch konnte auch hier eine Abnahme von ocDNA und hDNA gesehen werden. Im Gegensatz zu der T7-Exonuklease-Behandlung konnte für die Exonuklease III nach RCA ein verändertes Laufverhalten der Topoisomere der cccDNA festgestellt werden. Es wurde eine Abnahme der stärker spiralisierten topologischen Isoformen beobachtet. Die Veränderung betrifft cccDNA-Moleküle, die sich im Anfangsstadium der RDR befinden. Da T7-Exonuklease eine 5'→3'-gerichtete Aktivität besitzt, beginnt die Exonukleolyse am äußersten Ende der gepaarten linearen DNA. Exonuklease III hingegen greift direkt am 3'-Ende in dem *Displacement-loop* an. In Folge wird der Strang schneller abgebaut als durch T7-Exonuklease und aus der cccDNA freigesetzt. Somit steht diese Form der cccDNA nicht mehr für die RCA zur Verfügung.

Weiterhin wurden Gesamtnukleinsäuren einer infizierten Pflanze mit RNase H

behandelt. Da für $\Phi 29$ -DNA-Polymerase bekannt ist, dass sie RNA als Primer verwenden kann (Lagunavicius *et al.*, 2008), können auch ssDNA-Moleküle als Matrize für die RCA dienen, an die sich Wirts-RNA an homologen Bereichen angelagert hat, oder an denen ein RNA-Primer synthetisiert wurde (CSR). Durch die RNase H-Vorbehandlung würden diese Moleküle als Matrizen verloren gehen. Nach Inkubation der Gesamtnukleinsäuren mit RNase H und anschließender RCA konnte keine Zunahme an RCA-Produkt und Multimeren gezeigt werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus den Vorversuchen (RCA ohne Vorbehandlung) kann somit geschlossen werden, dass hauptsächlich ssDNA mit einem komplementären RNA-Strang als Matrize dient.

Zurzeit ist nur bekannt, dass die $\Phi 29$ -DNA-Polymerase RNA als Primer verwenden kann (Lagunavicius *et al.*, 2008), ob ihre Strangverdrängungsaktivität neben DNA auch RNA einschließt, konnte noch nicht gezeigt werden. Es wurde bereits diskutiert (s.o., RNase H-Behandlung), dass wahrscheinlich RNA-geprimte ssDNA als Matrize für die Polymerase dient. Dies kann einen Hinweis darauf geben, dass die Strangverdrängungsaktivität neben DNA auch RNA einschließt.

Nach Inkubation mit RNase H war eine Zunahme an linearer dsDNA festzustellen, was sich nach RCA verstärkte. Zusätzlich traten nach der Amplifikation Fragmente zwischen ssDNA und linearer dsDNA auf, die sich leiterförmig anordneten. Nach Exonuklease-Behandlung hingegen traten diese Fragmente nicht auf, auch ein Anstieg an linearer dsDNA wurde nicht detektiert. Ein Mechanismus, der die Zunahme an linearer dsDNA erklärt, ist in Abbildung 36 dargestellt. Während genomische DNA von Mastreviren zusammen mit einem RNA-Primer in der kleinen intergenen Region (SIR) in Partikel verpackt wird, sind Geminiviren der anderen Gattungen auf die *de novo*-Synthese von RNA-Primern durch Wirtsenzyme angewiesen (Jeske, 2009). Nach Verlängerung durch eine DNA-Polymerase wird der RNA-Anteil des Zweitstranges durch RNase H entfernt, und die beiden freien Enden des Zweistranges werden verknüpft.

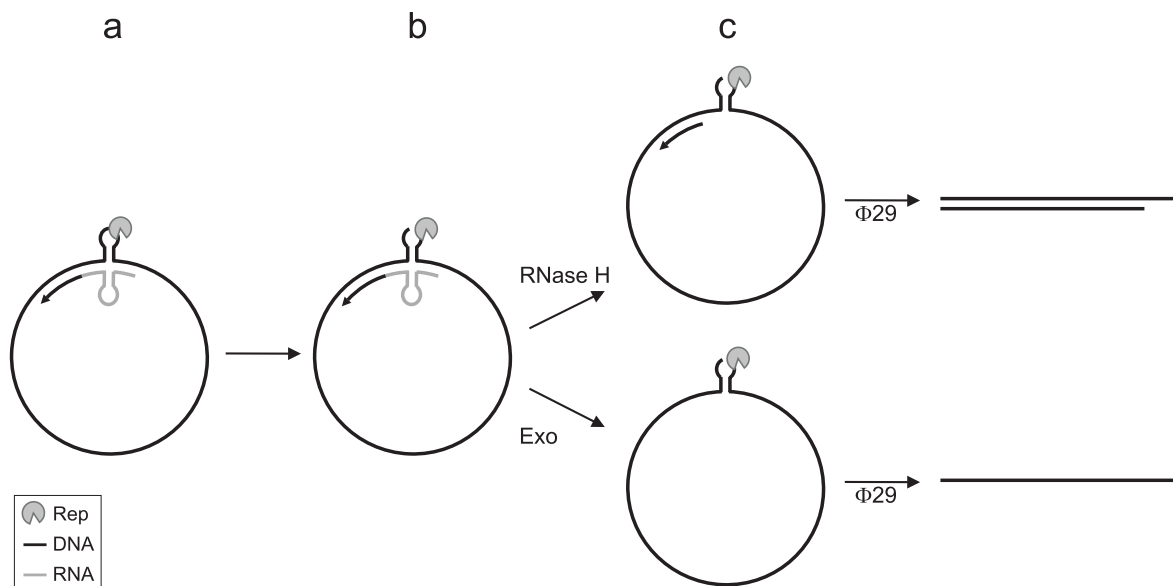


Abbildung 36: Wirkung von RNase H und Exonuklease an Zwischenstufen der CSR und daraus resultierende RCA-Produkte. „Exo“ bezeichnet sowohl T7-Exonuklease als auch Exonuklease III.

Ein ssDNA-Molekül, das einen RNA-Primer im Bereich des Nonanukleotids enthält, der durch einen kurzen DNA-Strang verlängert wurde, besitzt eine ähnliche elektrophoretische Mobilität wie reine ssDNA. In den Versuchen ohne RNase H-Vorbehandlung wurden diese beiden Formen daher nicht unterschieden. Wird in der Pflanze durch Rep ein Einzelstrangbruch im Nonanukleotid gesetzt (Abbildung 36a), und das Protein bindet kovalent an das neu entstandene 5'-Ende (Abbildung 36b), kann der RNA-Strang die zirkuläre Struktur stabilisieren, und das Produkt behält seine Eigenschaften während der Elektrophorese. Die RNase H-Behandlung führt zu einer Öffnung des Zirkels, und die $\Phi 29$ -DNA-Polymerase katalysiert die Synthese des Zweitstranges (Abbildung 36c), was die Zunahme des linearen dsDNA und die leichte Abnahme der ssDNA erklärt. Im Gegensatz dazu besitzen die Exonukleasen auch eine RNase H-Funktion. Sie entfernen den RNA- und DNA-Anteil des kurzen Zweitstranges vollständig (Abbildung 36b), und die $\Phi 29$ -DNA-Polymerase besitzt keinen Startpunkt für die DNA-Synthese (Abbildung 36c), weshalb keine Zunahme an linearer dsDNA festgestellt werden kann. Die (leichte) Zunahme an linearer dsDNA nach RNase H-Behandlung ohne RCA kann ebenfalls mit Hilfe dieses Modells erklärt werden. Ähnlich zu Abbildung 36a liegt der RNA-Primer im Bereich des *hairpins*, jedoch ist die CSR bereits weiter fortgeschritten. Diese Form läuft bei fehlender Vorbehandlung auf Höhe der ocDNA, nach RNase H-Behandlung jedoch zusammen mit linearer dsDNA. Bei der Kombination von RNase H mit einer der

beiden Exonukleasen wird der Zweitstrang dieser DNA-Form weiter verkürzt, und daher konnte keine Zunahme an linearer dsDNA beobachtet werden, da das Produkt eine veränderte elektrophoretische Mobilität besitzt.

Eine mögliche Erklärung für die leiterförmig angeordneten Fragmente, die nach RNase H-Behandlung und RCA auftraten, kann ebenfalls aus dem Modell in Abbildung 36 abgeleitet werden. Möglicherweise findet die Synthese der RNA-Primer während der CSR an diskreten Positionen statt, die in unterschiedlichen Abständen über die ssDNA verteilt sind. Befand sich die DNA-Synthese ähnlich zu Abbildung 36b im Anfangsstadium, resultieren RNase H-Behandlung und RCA in DNA-Fragmenten mit unterschiedlich langen doppelsträngigen Anteilen. Offensichtlich gibt es jedoch eine Präferenz für eine RNA-Synthese im Bereich der intergenen Region, was auch für ACMV gezeigt wurde (Saunders *et al.*, 1992). Nach RNase H-Behandlung und anschließender RCA sank die Konzentration der cccDNA. Wie bereits zuvor diskutiert, dient auch dieses replikative Intermediat als Matrize für die RCA, wenn es sich im Stadium der RDR befindet (s.o.), so dass dieser Effekt nicht auf RNase H zurückzuführen ist.

Die Kombination aus enzymatischer Vorbehandlung von Gesamtnukleinsäuren infizierter Pflanzen und anschließender RCA stellt eine ideale Methode dar, um die Replikation von Geminiviren zu untersuchen und kann etablierte Methoden wie ein- und zweidimensionale Chloroquingelelektrophorese und *Southern blot*-Analyse hervorragend ergänzen. Die Arbeiten sollten mit Geminiviren anderer Genera wiederholt werden, um die Methode zu validieren. Weitere Vorbehandlungen können getestet werden, um nicht effizient genutzte DNA-Formen (v.a. cccDNA) als Matrizen für die RCA zu gewinnen. Die Versuche mit einem *nicking*-Enzym könnten so abgewandelt werden, dass das Enzym nicht inaktiviert wird, sondern aktiv in der Reaktion verbleibt und neue Startpunkte für die RCA setzen kann.

VIII Literaturverzeichnis

- Abel, P.P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T., Beachy, R.N., 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232, 738-743.
- Abouzid, A.M., Frischmuth, T., Jeske, H., 1988. A putative replicative form of the Abutilon mosaic virus (gemini group) in a chromatin-like structure. *Mol. Gen. Genet.* 212, 252-258.
- Alberter, B., Rezaian, A.M., Jeske, H., 2005. Replicative intermediates of ToLCV and its satellite DNAs. *Virology* 331, 441-448.
- Ali, A., Roossinck, M.J., 2010. Genetic bottlenecks during systemic movement of cucumber mosaic virus vary in different host plants. *Virology* 404, 279-283.
- Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3-14.
- An, G., 1985. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 79, 568-570.
- Andresen, H., Bier, F.F., 2009. Peptide microarrays for serum antibody diagnostics. *Methods Mol. Biol.* 509, 123-134.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399.
- Arguello-Astorga, G., Lopez-Ochoa, L., Kong, L.J., Orozco, B.M., Settlege, S.B., Hanley-Bowdoin, L., 2004. A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *J. Virol.* 78, 4817-4826.
- Arguello-Astorga, G.R., Guevara-Gonzalez, R.G., Herrera-Estrella, L.R., Rivera-Bustamante, R.F., 1994. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology* 203, 90-100.
- Ascencio-Ibanez, J.T., Sozzani, R., Lee, T.J., Chu, T.M., Wolfinger, R.D., Cella, R., Hanley-Bowdoin, L., 2008. Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol.* 148, 436-454.
- Baas, P.D., 1985. DNA replication of single-stranded *Escherichia coli* DNA phages. *Biochim. Biophys. Acta* 825, 111-139.
- Bach, J., Krenz, B., Jeske, H., in Vorbereitung. Diversity of defective DNAs derived from beet curly top virus.
- Bahl, A., Davis, P.H., Behnke, M., Dzierszynski, F., Jagalur, M., Chen, F., Shanmugam, D., White, M.W., Kulp, D., Roos, D.S., 2010. A novel multifunctional oligonucleotide microarray for *Toxoplasma gondii*. *BMC Genomics* 11, 603-620.
- Bartosz, G., 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant.* 19, 47-64.
- Beier, M., Hoheisel, J.D., 2000. Production by quantitative photolithographic synthesis of individually quality checked DNA microarrays. *Nucl. Acid. Res.* 28, e11.
- Bennett, C.W., 1967. Epidemiology of leafhopper-transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 5, 87-108.
- Bennett, C.W., 1971. The curly top disease of sugarbeet and other plants. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

- Bennett, C.W., Tanrisever, A., 1957. Sugarbeet curly top disease in turkey. *Plant Dis. Rep.* 41, 721-725.
- Bennett, C.W., Tanrisever, A., 1958. Curly top disease in turkey and its relationship to curly top in north america. *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* 10, 189-211.
- Bergoin, M., Tijssen, P., 2000. Molecular biology of *Densovirinae*. *Contrib. Microbiol.* 4, 12-32.
- Biagini, P., 2009. Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 331, 21-33.
- Bonfim, K., Faria, J.C., Nogueira, E.O., Mendes, E.A., Aragao, F.J., 2007. RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 717-726.
- Boonham, N., Tomlinson, J., Mumford, R., 2007. Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 307-328.
- Böttcher, B., Unseld, S., Ceulemans, H., Russell, R.B., Jeske, H., 2004. Geminate structures of African cassava mosaic virus. *J. Virol.* 78, 6758-6765.
- Boutin, J.A., 1997. Myristoylation. *Cell. Signal.* 9, 15-35.
- Boveris, A., Valdez, L.B., Zaobornyj, T., Bustamante, J., 2006. Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 535-542.
- Brassard, J., Gagne, M.J., Lamoureux, L., Inglis, G.D., Leblanc, D., Houde, A., 2008. Molecular detection of bovine and porcine torque teno virus in plasma and feces. *Vet. Microbiol.* 126, 271-276.
- Brencic, A., Winans, S.C., 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 155-194.
- Briddon, R.W., Watts, J., Markham, P.G., Stanley, J., 1989. The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. *Virology* 172, 628-633.
- Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J., Markham, P.G., 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177, 85-94.
- Briddon, R.W., Bedford, I.D., Tsai, J.H., Markham, P.G., 1996. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology* 219, 387-394.
- Briddon, R.W., Stenger, D.C., Bedford, I.D., Stanley, J., Izadpanah, K., Markham, P.G., 1998. Comparison of a beet curly top virus isolate originating from the Old World with those from the New World. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 77-84.
- Briddon, R.W., Heydarnejad, J., Khosrowfar, F., Massumi, H., Martin, D.P., Varsani, A., 2010. Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. *Virus Res.* 152, 169-175.
- Casado, C.G., Javier Ortiz, G., Padron, E., Bean, S.J., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M.I., 2004. Isolation and characterization of subgenomic DNAs encapsidated in "single" T = 1 isometric particles of Maize streak virus. *Virology* 323, 164-171.

- Catoni, M., Miozzi, L., Fiorilli, V., Lanfranco, L., Accotto, G.P., 2009. Comparative analysis of expression profiles in shoots and roots of tomato systemically infected by tomato spotted wilt virus reveals organ-specific transcriptional responses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 1504-1513.
- Cavalli-Sforza, L., 1980. *Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.* 5th edition; Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- Cerkauskas, R., Kalb, T., Black, L.L., Brown, J.K., Rivera, R.F., Villalon, B., 2004. Pepper diseases. Whitefly-transmitted geminiviruses. AVRDC-The world vegetable center, Shanhua, Taiwan, <http://www.avrdc.org/>.
- Champoux, J.J., 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 369-413.
- Chen, H., Zhang, Z., Teng, K., Lai, J., Zhang, Y., Huang, Y., Li, Y., Liang, L., Wang, Y., Chu, C., Guo, H., Xie, Q., 2010. Up-regulation of LSB1/GDU3 affects geminivirus infection by activating the salicylic acid pathway. *Plant J.* 62, 12-23.
- Chen, L.F., Gilbertson, R.L., 2009. Curtovirus-cucurbit interaction: acquisition host plays a role in leafhopper transmission in a host-dependent manner. *Phytopathology* 99, 101-108.
- Chomczynski, P., Qasba, P.K., 1984. Alkaline transfer of DNA to plastic membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 340-344.
- Clack, N.G., Salaita, K., Groves, J.T., 2008. Electrostatic readout of DNA microarrays with charged microspheres. *Nat. Biotechnol.* 26, 825-830.
- Clark, D.J., Leblanc, B., 2009. Analysis of DNA supercoiling induced by DNA-protein interactions. *Methods Mol. Biol.* 543, 523-535.
- Clarke, D.K., Duarte, E.A., Elena, S.F., Moya, A., Domingo, E., Holland, J., 1994. The red queen reigns in the kingdom of RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4821-4824.
- Dangl, J.L., Jones, J.D., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.
- David, S.S., O'Shea, V.L., Kundu, S., 2007. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447, 941-950.
- de Ternant, A., 1916. Napoleon and sugar. *Notes Queries* s12-II, 308.
- Dean, F.B., Nelson, J.R., Giesler, T.L., Lasken, R.S., 2001. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.* 11, 1095-1099.
- Deregt, D., Gilbert, S.A., Dudas, S., Pasick, J., Baxi, S., Burton, K.M., Baxi, M.K., 2006. A multiplex DNA suspension microarray for simultaneous detection and differentiation of classical swine fever virus and other pestiviruses. *J. Virol. Methods* 136, 17-23.
- Diehl, F., Beckmann, B., Kellner, N., Hauser, N.C., Diehl, S., Hoheisel, J.D., 2002. Manufacturing DNA microarrays from unpurified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 30, e79.
- Domingo, E., Holland, J.J., 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 151-178.
- Domingo, E., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Martin-Hernandez, A.M., Saiz, J.C., Escarmis, C., 1998. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg. Infect. Diseases* 4, 521-527.

- Draycott, A.P., 2006. Sugarbeet. 1st ed. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Duarte, E., Clarke, D., Moya, A., Domingo, E., Holland, J., 1992. Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 89, 6015-6019.
- Duffy, S., Holmes, E.C., 2008. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. *J. Virol.* 82, 957-965.
- Duffy, S., Holmes, E.C., 2009. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *J. Gen. Virol.* 90, 1539-1547.
- Erdmann, J.B., Shepherd, D.N., Martin, D.P., Varsani, A., Rybicki, E.P., Jeske, H., 2010. Replicative intermediates of maize streak virus found during leaf development. *J. Gen. Virol.* 91, 1077-1081.
- Esau, K., 1976. Hyperplastic phloem and its plastids in spinach infected with the curly top virus. *Ann. Bot.* 40, 637-644.
- Esau, K., Hoefert, L.L., 1978. Hyperplastic phloem in sugarbeet leaves infected with the beet curly top virus. *Am. J. Bot.* 65, 772-783.
- Esteban, J.A., Salas, M., Blanco, L., 1993. Fidelity of phi 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *J. Biol. Chem.* 268, 2719-2726.
- Fang, Y., Frutos, A.G., Lahiri, J., 2002. Membrane protein microarrays. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 2394-2395.
- Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., Zhou, X., 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch. Virol.* 153, 783-821.
- Ferber, D., 1999. Risks and benefits: GM crops in the cross hairs. *Science* 286, 1662-1666.
- Fire, A., Xu, S.Q., 1995. Rolling replication of short DNA circles. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 92, 4641-4645.
- Fondong, V.N., Reddy, R.V., Lu, C., Hankoua, B., Felton, C., Czymbek, K., Achenjang, F., 2007. The consensus N-myristoylation motif of a geminivirus AC4 protein is required for membrane binding and pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 380-391.
- Forns, X., Purcell, R.H., Bukh, J., 1999. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol.* 7, 402-410.
- Franke, W., 2007. Nutzpflanzenkunde. Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. 7 ed. Thieme, Stuttgart.
- Frankforter, G.B., 1912. The resins and their chemical relations to the terpenes. *Science* 36, 257-263.
- Frederico, L.A., Kunkel, T.A., Shaw, B.R., 1990. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* 29, 2532-2537.
- Frischmuth, S., Frischmuth, T., Latham, J., Stanley, J., 1993. Transcriptional analysis of the virus-sense genes of the geminivirus Beet curly top virus. *Virology* 197, 312-319.
- Frischmuth, T., Stanley, J., 1991. African cassava mosaic virus DI-DNA interferes with the replication of both genomic components. *Virology* 183, 539-544.

- Frischmuth, T., Stanley, J., 1992. Characterization of beet curly top virus subgenomic DNA localizes sequences required for replication. *Virology* 189, 808-811.
- Frischmuth, T., Stanley, J., 1994. Beet curly top virus symptom amelioration in *Nicotiana benthamiana* transformed with a naturally occurring viral subgenomic DNA. *Virology* 200, 826-830.
- Frischmuth, T., Stanley, J., 1998. Recombination between viral DNA and the transgenic coat protein gene of African casava mosaic geminivirus. *J. Gen. Virol.* 79, 1265-1271.
- Frischmuth, T., Zimmat, G., Jeske, H., 1990. The nucleotide sequence of abutilon mosaic virus reveals prokaryotic as well as eukaryotic features. *Virology* 178, 461-468.
- Frischmuth, T., Engel, M., Jeske, H., 1997a. Beet curly top virus DI DNA-mediated resistance is linked to its size. *Mol. Breed.* 3, 213-217.
- Frischmuth, T., Ringel, M., Kocher, C., 2001. The size of encapsidated single-stranded DNA determines the multiplicity of African cassava mosaic virus particles. *J. Gen. Virol.* 82, 673-676.
- Frischmuth, T., Engel, M., Lauster, S., Jeske, H., 1997b. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, Sida-infecting bipartite geminiviruses in Central America. *J. Gen. Virol.* 78, 2675-2682.
- G.R.K., 1866. Honey used instead of sugar. *Notes and Queries* s3-IX (225), 330.
- Gardner, R.C., Knauf, V.C., 1986. Transfer of agrobacterium DNA to plants requires a T-DNA border but not the *virE* locus. *Science* 231, 725-727.
- Ge, L., Zhang, J., Zhou, X., Li, H., 2007. Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl China virus. *J. Virol.* 81, 5902-5907.
- Gopal, P., Pravin Kumar, P., Sinilal, B., Jose, J., Kasin Yadunandam, A., Usha, R., 2007. Differential roles of C4 and betaC1 in mediating suppression of post-transcriptional gene silencing: evidence for transactivation by the C2 of Bhendi yellow vein mosaic virus, a monopartite begomovirus. *Virus Res.* 123, 9-18.
- Grigoras, I., Timchenko, T., Katul, L., Grande-Perez, A., Vetten, H.-J., Gronenborn, B., 2009. Reconstitution of authentic nanovirus from multiple cloned DNAs. *J. Virol.* 83, 10778-10787.
- Grigoras, I., Timchenko, T., Grande-Perez, A., Katul, L., Vetten, H.J., Gronenborn, B., 2010. High variability and rapid evolution of a nanovirus. *J. Virol.* 84, 9105-9117.
- Grimsley, N., Hohn, T., Hohn, B., 1986a. Recombination in a plant virus: template-switching in cauliflower mosaic virus. *EMBO J.* 5, 641-646.
- Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T., Walden, R., 1986b. "Agroinfection", an alternative route for viral infection of plants by using Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3282-3286.
- Gronenborn, B., 2004. Nanoviruses: genome organisation and protein function. *Vet. Microbiol.* 98, 103-109.
- Haab, B.B., Lizardi, P.M., 2006. RCA-enhanced protein detection arrays. *Methods Mol. Biol.* 328, 15-29.
- Haible, D., Kober, S., Jeske, H., 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *J. Virol. Methods* 135, 9-16.
- Hall, D.A., Ptacek, J., Snyder, M., 2007. Protein microarray technology. *Mech. Ageing Dev.* 128, 161-167.

- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41, 95-98, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>.
- Hanahan, D., 1985. Techniques for transformation of *E. coli*, in: Glover, D.M. (Ed.), DNA cloning. IRL press, Oxford, pp. 109-135.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S., Robertson, D., 1999. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. Crit. Rev. Plant Sci. 18, 71-106.
- Hao, L., Wang, H., Sunter, G., Bisaro, D.M., 2003. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. Plant Cell 15, 1034-1048.
- Hatch, A., Sano, T., Misasi, J., Smith, C.L., 1999. Rolling circle amplification of DNA immobilized on solid surfaces and its application to multiplex mutation detection. Genet. Anal. 15, 35-40.
- He, B., Morrow, T.J., Keating, C.D., 2008. Nanowire sensors for multiplexed detection of biomolecules. Curr. Opin. Chem. Biol. 12, 522-528.
- Heise, C., Bier, F.F., 2006. Immobilization of DNA on microarrays. Top. Curr. Chem. 261, 1-25.
- Heller, M.J., Tu, E., Holmsen, A., Sosnowski, R.G., O'Connell, J., 1999. in: Schena, M. (Ed.), DNA microarrays. A practical approach. Oxford Press, New York, pp. 167-185.
- Hennes-Stegmann, B., Schroder, C.H., 1982. Low infectivity of HSV-1 DNA caused by defective-interfering genomes. J. Gen. Virol. 63, 307-314.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., Korenaga, T., 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucl. Acids Res. 27, 297-300.
- Hino, S., 2002. TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. Rev. Med. Virol. 12, 151-158.
- Holmberg, A., Blomstergren, A., Nord, O., Lukacs, M., Lundeberg, J., Uhlen, M., 2005. The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. Electrophoresis 26, 501-510.
- Homs, M., Kober, S., Kepp, G., Jeske, H., 2008. Mitochondrial plasmids of sugarbeet amplified via rolling circle method detected during curtovirus screening. Virus Res. 136, 124-129.
- Hormuzdi, S.G., Bisaro, D.M., 1993. Genetic analysis of beet curly top virus - Evidence for 3 virion sense genes involved in movement and regulation of single-stranded and double-stranded DNA levels. Virology 193, 900-909.
- Horn, J., Lauster, S., Krenz, B., Kraus, J., Frischmuth, T., Jeske, H., 2011. Ambivalent effects of defective DNA in beet curly top virus-infected transgenic sugarbeet plants. Virus Res. in revision.
- Hsu, H.Y., Huang, Y.Y., 2004. RCA combined nanoparticle-based optical detection technique for protein microarray: a novel approach. Biosens. Bioelectron. 20, 123-126.
- Huang, Y.W., Dryman, B.A., Harrall, K.K., Vaughn, E.M., Roof, M.B., Meng, X.J., 2010. Development of SYBR green-based real-time PCR and duplex nested PCR assays for quantitation and differential detection of species- or type-specific porcine Torque teno viruses. J. Virol. Methods 170, 140-146.

Huang, Y.Y., Hsu, H.Y., Huang, C.J., 2007. A protein detection technique by using surface plasmon resonance (SPR) with rolling circle amplification (RCA) and nanogold-modified tags. *Biosens. Bioelectron.* 22, 980-985.

Hull, R., 2009. *Comparative plant virology*. Academic press.

Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

Isnard, M., Granier, M., Frutos, R., Reynaud, B., Peterschmitt, M., 1998. Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *J. Gen. Virol.* 79, 3091-3099.

Jeske, H., 2007. Replication of geminiviruses and the use of rolling circle amplification for their diagnosis, in: Czosnek, H. (Ed.), *Tomato yellow leaf curl virus disease*. Springer, Dordrecht, pp. 141-156.

Jeske, H., 2009. Geminiviruses, in: zur Hausen, H., de Villiers, E.-M. (Ed.), *Torque Teno Virus: The Still Elusive Human Pathogens*. Springer, Berlin, pp. 185-226.

Jeske, H., Lütgemeier, M., Preiss, W., 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of abutilon mosaic geminivirus. *EMBO J.* 20, 6158-6167.

Jeske, H., Gotthardt, D., Kober, S., 2010. In planta cloning of geminiviral DNA: The true sida micrantha mosaic virus. *J. Virol. Methods* 163, 301-308.

Jovel, J., Preiß, W., Jeske, H., 2007. Characterization of DNA-intermediates of an arising geminivirus. *Virus Res.* 130, 63-70.

Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F., Rhee, Y., 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43, 179-188.

Kanter, J.L., Narayana, S., Ho, P.P., Catz, I., Warren, K.G., Sobel, R.A., Steinman, L., Robinson, W.H., 2006. Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nat. Med.* 12, 138-143.

Khan, J., Bittner, M.L., Chen, Y., Meltzer, P.S., Trent, J.M., 1999. DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1423, M17-M28.

Klein, U., 2004. Beyond the ivory tower: not a pure science: chemistry in the 18th and 19th centuries. *Science* 306, 981-982.

Klute, K.A., Nadler, S.A., Stenger, D.C., 1996. Horseradish curly top virus is a distinct subgroup II geminivirus species with rep and C4 genes derived from a subgroup III ancestor. *J. Gen. Virol.* 77, 1369-1378.

Konry, T., Hayman, R.B., Walt, D.R., 2009. Microsphere-based rolling circle amplification microarray for the detection of DNA and proteins in a single assay. *Anal. Chem.* 81, 5777-5782.

Kumar, Y., Hallan, V., Zaidi, A.A., 2008. Molecular characterization of a distinct bipartite begomovirus species infecting tomato in India. *Virus Genes* 37, 425-431.

Lagunavicius, A., Kiveryte, Z., Zimbaite-Ruskuliene, V., Radzvilavicius, T., Janulaitis, A., 2008. Duality of polynucleotide substrates for Phi29 DNA polymerase: 3'→5' RNase activity of the enzyme. *RNA* 14, 503-513.

- Lahiri, J., Jonas, S.J., Frutos, A.G., Kalal, P., Fang, Y., 2001. Lipid microarrays. *Biomed. Microdevices* 3, 157-164.
- Lai, J., Chen, H., Teng, K., Zhao, Q., Zhang, Z., Li, Y., Liang, L., Xia, R., Wu, Y., Guo, H., Xie, Q., 2009. RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle. *Plant J.* 57, 905-917.
- Lam, N., Creamer, R., Rascon, J., Belfon, R., 2009. Characterization of a new curtovirus, pepper yellow dwarf virus, from chile pepper and distribution in weed hosts in New Mexico. *Arch. Virol.* 154, 429-436.
- Larsen, R.C., Miklas, P.N., 2004. Generation and molecular mapping of a sequence characterized amplified region marker linked with the *bct* gene for resistance to beet curly top virus in common bean. *Phytopathology* 94, 320-325.
- Latham, J.R., Saunders, K., Pinner, M.S., Stanley, J., 1997. Induction of plant cell division by beet curly top virus gene *c4*. *Plant J.* 11, 1273-1283.
- Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, V., Rogers, S.G., Schell, J., Gronenborn, B., 1995. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3879-3883.
- Lauster, S., 2000. Untersuchung DI-DNA vermittelter Resistenz gegen beet curly top Geminivirus (BCTV) in Zuckerrübe und Suche nach neuen Virusvarianten im Anbauggebiet Idaho, USA. Dissertation. Biologisches Institut, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Lee, J., Icoz, K., Roberts, A., Ellington, A.D., Savran, C.A., 2010. Diffractometric detection of proteins using microbead-based rolling circle amplification. *Anal. Chem.* 82, 197-202.
- Lee, M., Xiang, C.C., Trent, J.M., Bittner, M.L., 2007. Performance characteristics of 65-mer oligonucleotide microarrays. *Anal. Biochem.* 368, 70-78.
- Lee, S., Stenger, D.C., Bisaro, D.M., Davis, K.R., 1994. Identification of loci in *Arabidopsis* that confer resistance to geminivirus infection. *Plant J.* 6, 525-535.
- Lehner, A., Loy, A., Behr, T., Gaenge, H., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.H., 2005. Oligonucleotide microarray for identification of *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 133-142.
- Li, J., Chory, J., 1999. Brassinosteroid actions in plants. *J. Exp. Bot.* 50, 275-282.
- Li, J., Zhong, W., 2007. Typing of multiple single-nucleotide polymorphisms by a microsphere-based rolling circle amplification assay. *Anal. Chem.* 79, 9030-9038.
- Li, W., Zhao, B., Jin, Y., Ruan, K., 2010. Development of a low-cost detection method for miRNA microarray. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 42, 296-301.
- Li, X., Luo, J., Xiao, P., Shi, X., Tang, C., Lu, Z., 2009. Genotyping of multiple single nucleotide polymorphisms with hyperbranched rolling circle amplification and microarray. *Clin. Chim. Acta* 399, 40-44.
- Lindsey, K., Gallois, P., 1990. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Exp. Bot.* 41, 529-536.
- Liu, Q., Bai, Y., Ge, Q., Zhou, S., Wen, T., Lu, Z., 2007. Microarray-in-a-tube for detection of multiple viruses. *Clin. Chem.* 53, 188-194.
- Liu, Y., Palma, A.S., Feizi, T., 2009. Carbohydrate microarrays: key developments in glycobiology. *Biol. Chem.* 390, 647-656.

- Liu, Y.L., Robinson, D.J., Harrison, B.D., 1998. Defective forms of cotton leaf curl virus DNA-A that have different combinations of sequence deletion, duplication, inversion and rearrangement. *J. Gen. Virol.* 79, 1501-1508.
- Lopez, M.M., Llop, P., Olmos, A., Marco-Noales, E., Cambra, M., Bertolini, E., 2009. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? *Curr. Issues Mol. Biol.* 11, 13-46.
- Lopez-Ochoa, L., Ramirez-Prado, J., Hanley-Bowdoin, L., 2006. Peptide aptamers that bind to a geminivirus replication protein interfere with viral replication in plant cells. *J. Virol.* 80, 5841-5853.
- MacDowell, S.W., Coutts, R.H.A., Buck, K.W., 1986. Molecular characterization of subgenomic single-stranded and double-stranded DNA forms from plants infected with Tomato golden mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* 14, 7967-7984.
- Mansoor, S., Briddon, R.W., Zafar, Y., Stanley, J., 2003. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends Plant Sci.* 8, 128-134.
- Marlier, D., Vindevogel, H., 2006. Viral infections in pigeons. *Vet. J.* 172, 40-51.
- Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Eisenhaber, F., 2002. N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 317, 541-557.
- McKendry, R., Zhang, J., Arntz, Y., Strunz, T., Hegner, M., Lang, H.P., Baller, M.K., Certa, U., Meyer, E., Guntherodt, H.J., Gerber, C., 2002. Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 99, 9783-9788.
- McKenzie, S.E., Mansfield, E., Rappaport, E., Surrey, S., Fortina, P., 1998. Parallel molecular genetic analysis. *Eur. J. Hum. Genet.* 6, 417-429.
- Mikhailovich, V., Gryadunov, D., Kolchinsky, A., Makarov, A.A., Zasedatelev, A., 2008. DNA microarrays in the clinic: infectious diseases. *Bioessays* 30, 673-682.
- Mills-Lujan, K., Deom, C.M., 2010. Geminivirus C4 protein alters *Arabidopsis* development. *Protoplasma* 239, 95-110.
- Minamoto, K., Caruthers, M.H., Ramamoorthy, B., van de Sande, J.H., Sidorova, N., Khorana, H.G., 1976. Total synthesis of the structural gene for the precursor of a tyrosine suppressor transfer RNA from *Escherichia coli*. 3. Synthesis of deoxyribopolynucleotide segments corresponding to the nucleotide sequence 27-51. *J. Biol. Chem.* 251, 587-598.
- Moffat, A., 1999. Geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science* 286, 1835.
- Monjezi, R., Tey, B.T., Sieo, C.C., Tan, W.S., 2010. Purification of bacteriophage M13 by anion exchange chromatography. *J. Chromatogr.* 878, 1855-1859.
- Mossoba, M.M., Al-Khaldi, S.F., Schoen, B., Yakes, B.J., 2010. Nanoparticle probes and mid-infrared chemical imaging for DNA microarray detection. *Appl. Spectrosc.* 64, 1191-1198.
- Muller, H.J., 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res.* 106, 2-9.
- Nagar, S., Hanley-Bowdoin, L., Robertson, D., 2002. Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. *Plant Cell* 14, 2995-3007.
- Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K.M., Hanley-Bowdoin, L., Robertson, D., 1995. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7, 705-719.

- Nallur, G., Luo, C., Fang, L., Cooley, S., Dave, V., Lambert, J., Kukanskis, K., Kingsmore, S., Lasken, R., Schweitzer, B., 2001. Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays. *Nucl. Acid. Res.* 29, E118.
- Nawaz-ul-Rehman, M.S., Fauquet, C.M., 2009. Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Lett.* 583, 1825-1832.
- Niel, C., Diniz-Mendes, L., Devalle, S., 2005. Rolling-circle amplification of torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *J. Gen. Virol.* 86, 1343-1347.
- Noris, E., Accotto, G.P., Tavazza, R., Brunetti, A., Crespi, S., Tavazza, M., 1996. Resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology* 224, 130-138.
- Olszewski, N., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., 1982. A transcriptionally active, covalently closed minichromosome of cauliflower mosaic virus DNA isolated from infected turnip leaves. *Cell* 29, 395-402.
- Olszewski, N.E., Guilfoyle, T.J., 1983. Nuclei purified from cauliflower mosaic virus-infected turnip leaves contain subgenomic, covalently closed circular cauliflower mosaic virus DNAs. *Nucleic Acids Res.* 11, 8900-8914.
- Palmer, A.G., Gao, R., Maresh, J., Erbil, W.K., Lynn, D.G., 2004. Chemical biology of multi-host/pathogen interactions: chemical perception and metabolic complementation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 439-464.
- Palmer, M., 2007. WatCut: An on-line tool for restriction analysis, silent mutation scanning, and SNP-RFLP analysis.
- Panicker, R.C., Huang, X., Yao, S.Q., 2004. Recent advances in peptide-based microarray technologies. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 7, 547-556.
- Paprotka, T., Metzler, V., Jeske, H., 2010a. A tiny habitat of geminiviruses harboured six bipartite begomovirus isolates together with the first DNA 1 satellite of the New World. manuscript in preparation.
- Paprotka, T., Metzler, V., Jeske, H., 2010b. The complete nucleotide sequence of a new bipartite begomovirus from Brazil infecting *Abutilon*. *Arch. Virol.* 155, 813-816.
- Paprotka, T., Metzler, V., Jeske, H., 2010c. The first DNA 1-like alpha-satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology* 404, 148-157.
- Paprotka, T., Boiteux, L.S., Fonseca, M.E., Resende, R.O., Jeske, H., Faria, J.C., Ribeiro, S.G., 2010d. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Res.* 149, 224-233.
- Park, J., Hwang, H.S., Buckley, K.J., Park, J.B., Auh, C.K., Kim, D.G., Lee, S., Davis, K.R., 2010. C4 protein of beet severe curly top virus is a pathomorphogenetic factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 29, 1377-1389.
- Parthasarathy, N., 1948. Origin of noble sugar-canes (*Saccharum officinarum* L.). *Nature* 161, 608.
- Patil, B.L., Dasgupta, I., 2006. Defective interfering DNAs of plant viruses. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24, 1-18.
- Patil, B.L., Dutt, N., Briddon, R.W., Bull, S.E., Rothenstein, D., Borah, B.K., Dasgupta, I., Jeske, H., 2007. Deletion and recombination events between DNA A and DNA B generate defective molecules in Indian cassava-infecting geminiviruses. *Virus Res.* 124, 59-67.

- Peitzsch, R.M., McLaughlin, S., 1993. Biochemistry 32, 10436-10443.
- Permingeat, H.R., Romagnoli, M.V., 1998. A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. Plant Mol. Biol. Rep. 16, 1-6.
- Pilartz, M., Jeske, H., 1992. Abutilon mosaic geminivirus double-stranded DNA is packed into minichromosomes. Virology 189, 800-802.
- Pilartz, M., Jeske, H., 2003. Mapping of abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. J. Virol. 77, 10808-10818.
- Piroux, N., Saunders, K., Page, A., Stanley, J., 2007. Geminivirus pathogenicity protein C4 interacts with *Arabidopsis thaliana* shaggy-related protein kinase AtSKeta, a component of the brassinosteroid signalling pathway. Virology 362, 428-440.
- Pitzschke, A., Hirt, H., 2010. New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. EMBO J. 29, 1021-1032.
- Podell, S., Gribskov, M., 2004. Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins. BMC Genomics 5, 37.
- Pooggin, M., Hohn, T., 2004. Fighting geminiviruses by RNAi and vice versa. Plant Mol. Biol. 55, 149-152.
- Pooggin, M., Shivaprasad, P.V., Veluthambi, K., Hohn, T., 2003. RNAi targeting of DNA virus in plants. Nat. Biotechnol. 21, 131-132.
- Preiss, W., Jeske, H., 2003. Multitasking in replication is common among geminiviruses. J. Virol. 77, 2972-2980.
- Prestridge, D.S., 1991. SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. Cabios 7, 203-206.
- Qi, X., Bakht, S., Devos, K.M., Gale, M.D., Osbourn, A., 2001. L-RCA (ligation-rolling circle amplification): a general method for genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs). Nucl. Acid. Res. 29, E116.
- Ramsay, G., 1998. DNA chips: state-of-the art. Nat. Biotechnol. 16, 40-44.
- Resh, M.D., 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. Biochim. Biophys. Acta 1451, 1-16.
- Rogers, S.G., Bisaro, D.M., Horsch, R.B., Fraley, R.T., Hoffmann, N.L., Brand, L., Elmer, J.S., Lloyd, A.M., 1986. Tomato golden mosaic A component DNA replicates autonomously in transgenic plants. Cell 45, 593-600.
- Roossinck, M.J., Sleat, D., Palukaitis, P., 1992. Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. Microbiol. Rev. 56, 265-279.
- Rose, J.H., 1893. Napoleon and english commerce. Engl Hist Rev VIII(XXXII), 704-725.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., Hunt, M.D., 1996. Systemic acquired resistance. Plant Cell 8, 1809-1819.
- Safarnejad, M.R., Fischer, R., Commandeur, U., 2009. Recombinant-antibody-mediated resistance against tomato yellow leaf curl virus in *Nicotiana benthamiana*. Arch. Virol. 154, 457-467.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491.

- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 74, 5463-5467.
- Saunders, K., Lucy, A., Stanley, J., 1992. RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus african cassava mosaic virus. Nucleic Acids Res. 20, 6311-6315.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 270, 467-470.
- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P.O., Davis, R.W., 1996. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 93, 10614-10619.
- Schmitz, N., Wilkening, L., Wilkening, C.L., Höring, K., Jatzke, H., Klepper, G., 2003. Bioethanol in Deutschland, in: Schmitz, N. (Ed.), Schriftenreihe "Nachwachsende Rohstoffe". Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster, pp.
- Schneider, W.L., Roossinck, M.J., 2001. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. J. Virol. 75, 6566-6571.
- Schopf, E., Fischer, N.O., Chen, Y., Tok, J.B., 2008. Sensitive and selective viral DNA detection assay via microbead-based rolling circle amplification. Bioorg. Med. Chem. Lett. 18, 5871-5874.
- Sera, T., 2005. Inhibition of virus DNA replication by artificial zinc finger proteins. J. Virol. 79, 2614-2619.
- Shin, D.S., Lee, K.N., Yoo, B.W., Kim, J., Kim, M., Kim, Y.K., Lee, Y.S., 2010. Automated maskless photolithography system for peptide microarray synthesis on a chip. J. Comb. Chem. 12, 463-471.
- Smolina, I.V., Cherny, D.I., Nietupski, R.M., Beals, T., Smith, J.H., Lane, D.J., Broude, N.E., Demidov, V.V., 2005. High-density fluorescently labeled rolling-circle amplicons for DNA diagnostics. Anal. Biochem. 347, 152-155.
- Song, E.H., Pohl, N.L., 2009. Carbohydrate arrays: recent developments in fabrication and detection methods with applications. Curr. Opin. Chem. Biol. 13, 626-632.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.
- Staley, J.R., 2005. The *Proteobacteria*. Part C: The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*., 2nd ed, in: Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.R. (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, volume two: the *Proteobacteria*, parts A-C.
- Stanley, J., Townsend, R., 1985. Characterisation of DNA forms associated with cassava latent virus infection. Nucleic Acids Res. 13, 2189-2206.
- Stanley, J., Latham, J.R., 1992. A symptom variant of beet curly top geminivirus produced by mutation of open reading frame C4. Virology 190, 506-509.
- Stanley, J., Frischmuth, T., Ellwood, S., 1990. Defective viral DNA ameliorates symptoms of geminivirus infection in transgenic plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 6291-6295.
- Stanley, J., Markham, P.G., Callis, R.J., Pinner, M.S., 1986. The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus. EMBO J. 5, 1761-1767.

- Stanley, J., Latham, J.R., Pinner, M.S., Bedford, I., Markham, P.G., 1992. Mutational analysis of the monopartite geminivirus beet curly top virus. *Virology* 191, 396-405.
- Stears, R.L., Getts, R.C., Gullans, S.R., 2000. A novel, sensitive detection system for high-density microarrays using dendrimer technology. *Physiol. Genomics* 3, 93-99.
- Stenger, D.C., 1994. Strain-specific mobilization and amplification of a transgenic defective-interfering DNA of the geminivirus beet curly top virus. *Virology* 203, 397-402.
- Stenger, D.C., Revington, G.N., Stevenson, M.C., Bisaro, D.M., 1991. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for a rolling circle replication of a plant viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 88, 8029-8033.
- Su, Q., Xing, D., Zhou, X., 2010. Magnetic beads based rolling circle amplification-electrochemiluminescence assay for highly sensitive detection of point mutation. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1615-1621.
- Sunter, G., Sunter, J.L., Bisaro, D.M., 2001. Plants expressing tomato golden mosaic virus AL2 or Beet curly top virus L2 transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. *Virology* 285, 59-70.
- Taylor, H.C., 1903. Conditions affecting sugar-beet culture in the United States. *Ann. Amer. Acad. Polit. Soc. Sci.* 22, 179-187.
- Teng, K., Chen, H., Lai, J., Zhang, Z., Fang, Y., Xia, R., Zhou, X., Guo, H., Xie, Q., 2010. Involvement of C4 protein of beet severe curly top virus (family *Geminiviridae*) in virus movement. *PLoS One* 5, e11280.
- Tiwari, N., Padmalatha, K.V., Singh, V.B., Haq, Q.M., Malathi, V.G., 2010. Tomato leaf curl Bangalore virus (ToLCBV): infectivity and enhanced pathogenicity with diverse betasatellites. *Arch. Virol.* 155, 1343-1347.
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Akbergenov, R., Oakeley, E.J., Veluthambi, K., Hohn, T., Pooggin, M.M., 2005. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J. Virol.* 79, 2517-2527.
- van der Walt, E., Martin, D.P., Varsani, A., Polston, J.E., Rybicki, E.P., 2008. Experimental observations of rapid maize streak virus evolution reveal a strand-specific nucleotide substitution bias. *Virol. J.* 5, 104.
- van Loon, B., Markkanen, E., Hübscher, U., 2010. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair* 9, 604-616.
- Vanderschuren, H., Alder, A., Zhang, P., Gruissem, W., 2009. Dose-dependent RNAi-mediated geminivirus resistance in the tropical root crop cassava. *Plant Mol. Biol.* 70, 265-272.
- Vanderschuren, H., Stupak, M., Futterer, J., Gruissem, W., Zhang, P., 2007. Engineering resistance to geminiviruses-review and perspectives. *Plant Biotechnol. J.* 5, 207-220.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J.S., Fauquet, C.M., 2004. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 78, 9487-9498.
- Varsani, A., Shepherd, D.N., Dent, K., Monjane, A.L., Rybicki, E.P., Martin, D.P., 2009. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virol. J.* 6, 36.
- Vasilyev, E.V., Trofimov, D.Y., Tonevitsky, A.G., Ilinsky, V.V., Korostin, D.O., Rebrikov, D.V., 2009. Torque teno virus (TTV) distribution in healthy Russian population. *Virol. J.* 6, 134.

- Venkatasubbarao, S., 2004. Microarrays-status and prospects. *Trends Biotechnol.* 22, 630-637.
- Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R.J., 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucl. Acids Res.* 31, 3688-3691.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., Klessig, D.F., 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 177-206.
- Wang, Z.Y., Wang, Q., Chong, K., Wang, F., Wang, L., Bai, M., Jia, C., 2006. The brassinosteroid signal transduction pathway. *Cell. Res.* 16, 427-434.
- Watson, A., Mazumder, A., Stewart, M., Balasubramanian, S., 1998. Technology for microarray analysis of gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 609-614.
- White, P.R., Braun, A.C., 1941. Crown gall production by bacteria-free tumor tissues. *Science* 94, 239-241.
- Wichman, H.A., Brown, C.J., 2010. Experimental evolution of viruses: *Microviridae* as a model system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 2495-2501.
- Wintermantel, W.M., 2007. Mapping of curly top incidence and determination of genetic variation among viruses responsible for curly top in California. *JSBR* 44, 163-164.
- Wisler, G.C., Duffus, J.E., 2000. A century of plant virus management in the Salinas Valley of California, 'East of Eden'. *Virus Res.* 71, 161-169.
- Wu, C.Y., Lai, Y.C., Lin, N.S., Hsu, Y.H., Tsai, H.T., Liao, J.Y., Hu, C.C., 2008. A simplified method of constructing infectious clones of begomovirus employing limited restriction enzyme digestion of products of rolling circle amplification. *J. Virol. Methods* 147, 355-359.
- Wyant, P.S., Gotthardt, D., Schäfer, B., Krenz, B., Jeske, H., 2011. The genomes of four novel begomoviruses and a new sida micrantha mosaic virus strain from Bolivian weeds. *Arch. Virol.* 156, 347-352.
- Yazdi, H.R., Heydarnejad, J., Massumi, H., 2008. Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes* 36, 539-545.
- Yuan, T.T., Lin, M.H., Chen, D.S., Shih, C., 1998. A defective interference-like phenomenon of human hepatitis B virus in chronic carriers. *J. Virol.* 72, 578-584.
- Zammatteo, N., Jeanmart, L., Hamels, S., Courtois, S., Louette, P., Hevesi, L., Remacle, J., 2000. Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal. Biochem.* 280, 143-150.

IX Anhang

1. Plasmide und Konstrukte

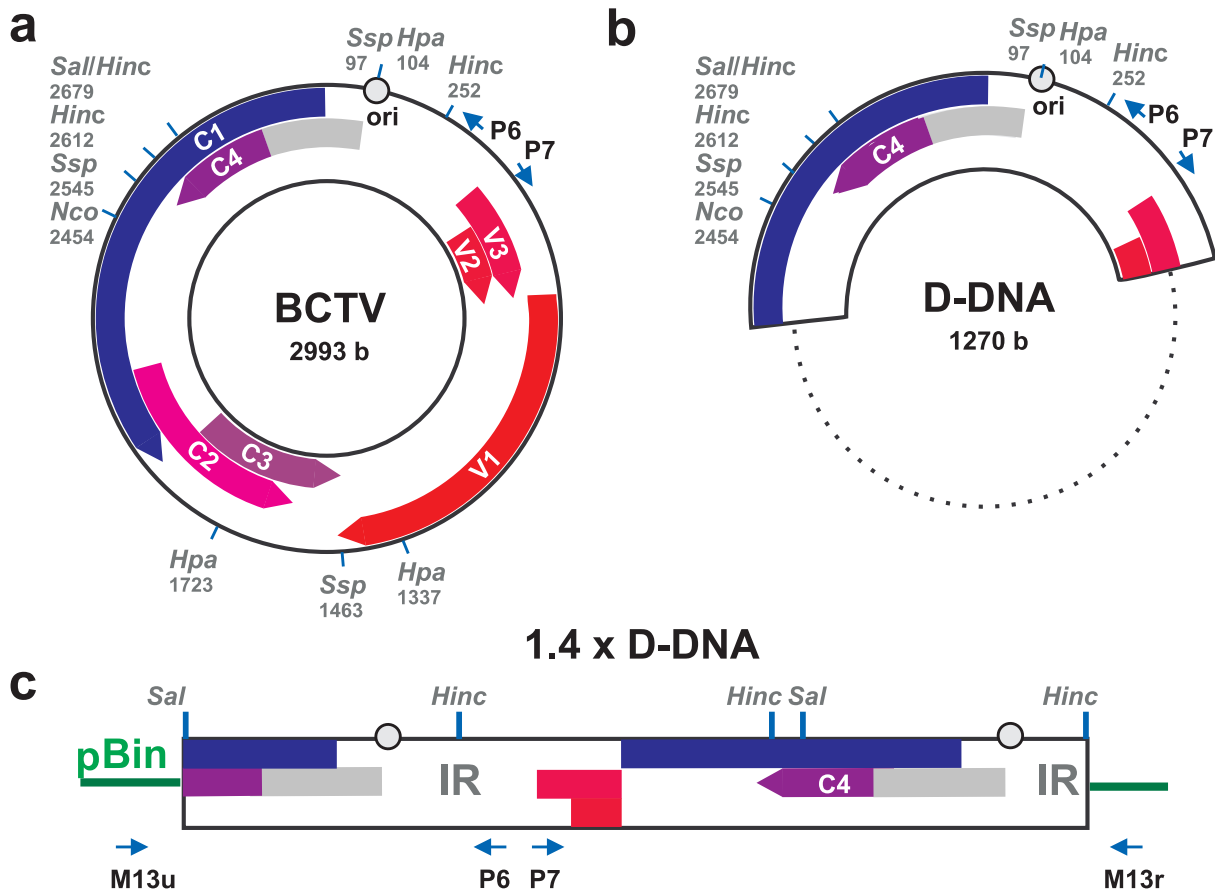


Abbildung 37: Genomorganisation von (a) BCTV und (b) der D₀-DNA. c: Konstrukt pBin1.4sg, das zur Transformation von *B. vulgaris* var. *altissima* verwendet wurde (nach Horn *et al.*, 2011). Wichtige Restriktionsschnittstellen sind in der Karte vermerkt. P6 und P7: spezifische Primer der PCR-Analyse, M13u und M13r: Standardprimer zum Nachweis der Transgenität (Lauster, 2000).

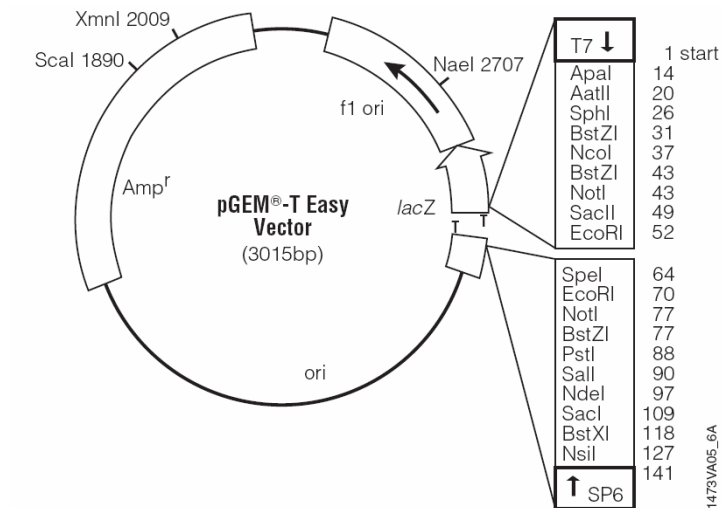


Abbildung 38: Plasmidkarte des Klonierungs-Vektors pGEM®-T Easy (Quelle: Promega).

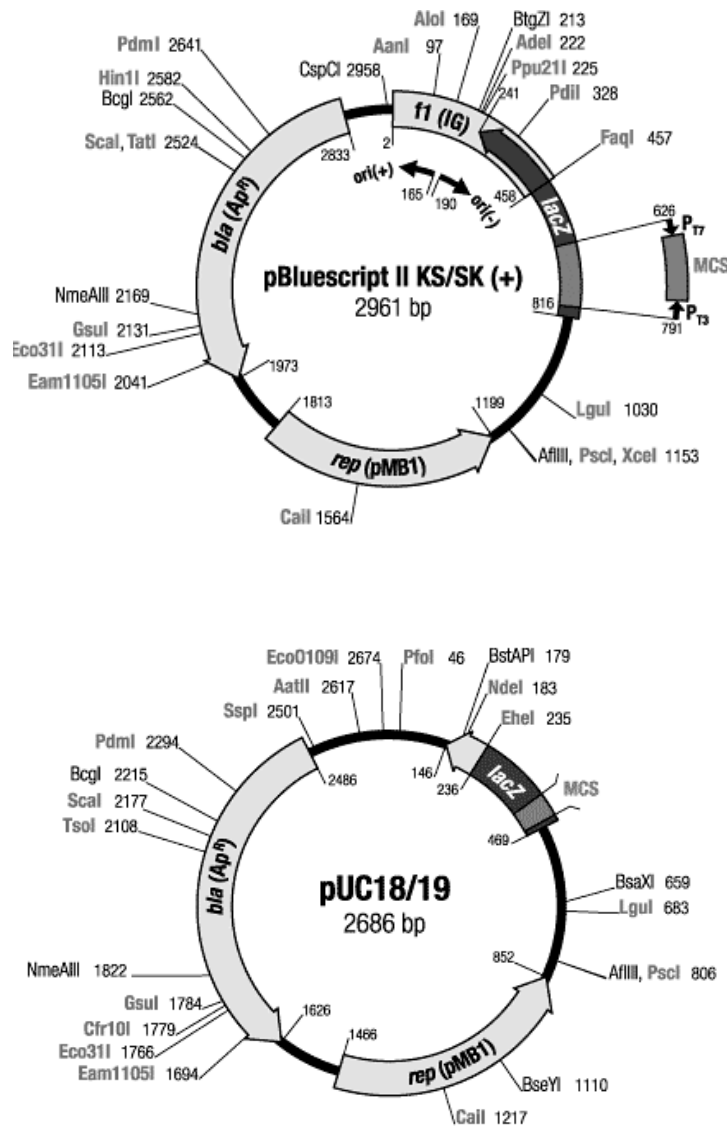


Abbildung 39: Plasmidkarte der Vektoren pBluescript II KS(+) und pUC19 (Quelle: Fermentas).

2. Größenstandards

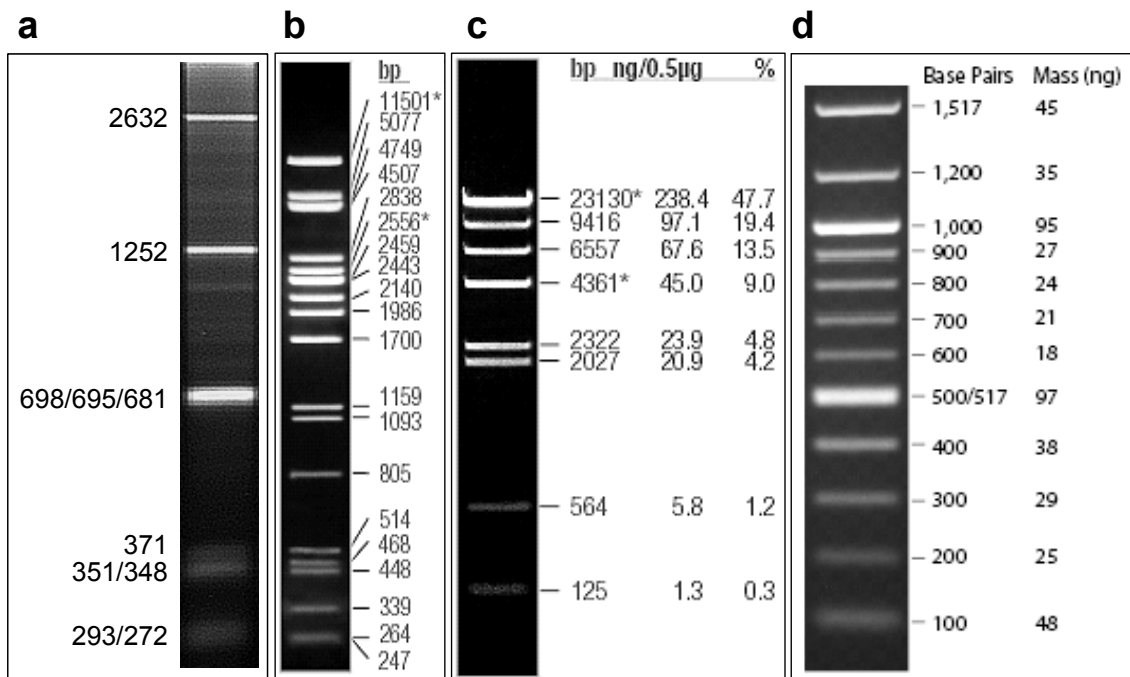


Abbildung 40: Größenstandards. **a: AbMV-Größenstandard.** Das RCA-Produkt von DNA A und B wurde in getrennten Ansätzen mit *Hpa*II bzw. *Pst*I geschnitten und nach Reaktionsstopp vereint. Alternativ wurde ausschließlich DNA A in gleicher Weise verwendet (Fragmente [bp]: 2632, 1252, 681, 351 und 348). **b: λPstI-Größenstandard.** DNA des λ-Phagen wurde mit *Pst*I geschnitten. **c: λHindIII-Größen- und Konzentrationsstandard.** DNA des λ-Phagen wurde mit *Hind*III geschnitten. **d: 100 bp DNA Ladder®.** Der Größenstandard wurde von NEB bezogen.

3. Symptomdokumentation (Gesamtdaten)

Tabelle 21a-e: Symptomdokumentation für das erste Infektionsexperiment von 1 bis 18 wpai.
 n = keine Symptome/*no*; m = milde Symptome; s = schwere Symptome/*severe*; d = tote Pflanzen/*dead*.
 Die Zahlen geben die Nummer der Einzelpflanze an. Kontrollpflanzen, die nicht inokuliert wurden, sind mit „*“ gekennzeichnet.

a: Symptomdokumentation 1-3 wpai.

wpai Linie	1				2				3			
	n	m	s	d	n	m	s	d	n	m	s	d
05-004K	1*, 2-4				1*, 2-4				1*, 2-4			
05-018K		1				1				1		
05-026T	1*, 2				1*		2		1*		2	
05-032T	1*, 2*, 4, 9, 10	3, 5-8			1*, 2*	3-10			1*, 2*	3-10		
05-154T	1*, 2*, 3-6				1*, 2*, 3	4-6			1*, 2*, 3	4-6		
05-157T	1*, 2*, 3-10				1*, 2*	3-10			1*, 2*	3-10		
2R 7629	1*	2			1*	2			1*	2		
7B0091	1, 2, 3*				3*	1, 2			3*	1, 2		
84101T	1*, 2*, 8, 10	3-7, 9			1*, 2*, 8, 10	3-7, 9			1*, 2*	3-10		
84104T	1*, 2-9, 10*				1*, 10*	2, 4-9	3		1*, 10*	2, 4-9	3	
84107K	1, 2, 6, 9*, 10*	3-5, 7, 8			1, 2, 6, 9*, 10*	3-5, 7, 8			1m 2m 9*, 10*	3-8		
84111K	9*, 10*	1-8			9*, 10*	1-5, 7, 8	6		9*, 10*	1-5, 7, 8	6	
84118T	1*, 2-6				1*, 6		2-5		1*, 6		2-5	
84124T	1*, 2*, 4, 6-10	3, 5			1*, 2*	3-6, 8-10	7		1*, 2*	3-6, 8-10	7	
84137T	1*, 2*, 5, 9, 10	3, 4, 6-8			1*, 2*, 8	3-7, 9, 10			1*, 2*, 8	3-7, 9, 10		
84142T	1*, 2*, 3-6, 8-10	7			1*, 2*, 3, 5	4, 6-10			1*, 2*, 3, 5	4, 6-10		
84147T	1*, 2, 3, 6-8, 9*	4, 5, 10			1*, 9*	2-8, 10			1*, 9*	2-8, 10		
84151T	1*, 2-6				1*	2-6			1*	2-6		
84164T	1-6, 7*, 8*	9, 10			4, 7*, 8*	2, 3, 5, 9, 10	1, 6		7*, 8*	2-5, 9, 10	1, 6	
9K9010		1				1				1		

b: Symptomdokumentation 4-6 wpai.

wpai Linie	4				5				6			
	n	m	s	d	n	m	s	d	n	m	s	d
05-004K	1*, 2-4				1*, 2-4				1*, 2-4			
05-018K		1				1				1		
05-026T	1*		2		1*		2		1*			2
05-032T	1*, 2*	3-10			1*, 2*	3-10			1*, 2*	4-8, 10	3, 9	
05-154T	1*, 2*	3-6			1*, 2*	3	4-6		1*, 2*		5	3, 4, 6
05-157T	1*, 2*		3-10		1*, 2*		3-10		1*, 2*		3, 9	4-8, 10
2R 7629	1*	2			1*		2		1*			2
7B0091	3*	1, 2			3*		1, 2		3*		1, 2	
84101T	1*, 2*	3-10			1*, 2*	4-10	3		1*, 2*	8	4, 6, 7, 9, 10	3, 5
84104T	1*, 10*	2, 4-9	3		1*, 10*	2, 5-9	3, 4		1*, 10*	6, 8	2, 3, 5, 7	4, 9
84107K	1, 2, 9*, 10*	5-8	3, 4		1, 2, 9*, 10*	5-8	3, 4		1, 2, 9*, 10*	5-8		3, 4
84111K	9*, 10*	1-5, 7, 8	6		9*, 10*	1-5, 7, 8	6		9*, 10*	2, 4, 8	1, 3, 5-7	
84118T	1*		2-6		1*		2-6		1*		2, 5	3, 4, 6
84124T	1*, 2*	3-6, 8- 10	7		1*, 2*	3-6, 8- 10	7		1*, 2*	3-5, 9, 10	6, 8	7
84137T	1*, 2*	3-10			1*, 2*	3, 8	4-7, 9, 10		1*, 2*	8	3, 7, 9, 10	4-6
84142T	1*, 2*, 3	5, 10	4, 6-9		1*, 2*, 3	5, 10	4, 6-9		1*, 2*, 3	5	4, 6-10	
84147T	1*, 9*	2, 3, 5- 8, 10	4		1*, 9*	2, 3, 5- 8, 10	4		1*, 9*	2, 3, 5, 6, 10	4, 7, 8	
84151T	1*	2-5	6		1*	2, 4, 5	3, 6		1*	2, 4, 5	3	6
84164T	7*, 8*	2-5, 9	1, 6, 10		7*, 8*	2-5	1, 6, 9, 10		7*, 8*	2, 4, 5	3	1, 6, 9, 10
9K9010		1				1				1		

c: Symptomdokumentation 7-12 wpai.

wpai Linie	7				10				12			
	n	m	s	d	n	m	s	d	n	m	s	d
05-004K	1*, 2-4				1*, 2-4				1*, 2-4			
05-018K		1				1				1		
05-026T	1*			2	1*			2	1*			2
05-032T	1*, 2*	3-6, 8, 10	7, 9		1*, 2*	3-10			1*, 2*	4-6, 8- 10	3, 7	
05-154T	1*, 2*		5	3, 4, 6	1*, 2*		5	3, 4, 6	1*, 2*		5	3, 4, 6
05-157T	1*, 2*		3	4-10	1*, 2*		3	4-10	1*, 2*		3	4-10
2R 7629	1*			2	1*			2	1*			2
7B0091	3*	2	1		3*	2	1		3*	2		1
84101T	1*, 2*	8	4, 6, 7, 9, 10	3, 5	1*, 2*	8		3-7, 9, 10	1*, 2*	8		3-7, 9, 10
84104T	1*, 10*	6, 8	5, 7	2-4, 9	1*, 10*	6, 8	5	2-4, 7, 9	1*, 10*	6, 8		2-5, 7, 9
84107K	1, 2, 9*, 10*	7, 8	5, 6	3, 4	1, 2, 8, 9*, 10*		5-7	3, 4	1, 2, 8, 9*, 10*	7	5, 6	3, 4
84111K	9*, 10*	2, 4, 8	1, 3, 5-7		9*, 10*	4	2, 5, 8	1, 3, 6, 7	2, 9*, 10*	4, 8	5	1, 3, 6, 7
84118T	1*		2	3-6	1*			2-6	1*			2-6
84124T	1*, 2*	3-5, 9	6, 8, 10	7	1*, 2*	3-5, 9		6-8, 10	1*, 2*	3-5, 9		6-8, 10
84137T	1*, 2*		3, 7, 8, 10	4-6, 9	1*, 2*			3-10	1*, 2*			3-10
84142T	1*, 2*	3, 5	4, 6-10		1*, 2*		3	4-10	1*, 2*	3		4-10
84147T	1*, 9*	3, 6, 10	2, 4, 5, 7, 8		1*, 9*	3, 4, 10	6	2, 5, 7, 8	1*, 9*	4	3, 6, 10	2, 5, 7, 8
84151T	1*	2, 4, 5	3	6	1*	2, 4		3, 5, 6	1*	2, 4		3, 5, 6
84164T	7*, 8*	2, 4, 5	3	1, 6, 9, 10	4, 5, 7*, 8*	2		1, 3, 6, 9, 10	5, 7*, 8*	2, 4		1, 3, 6, 9, 10
9K9010		1				1				1		

d: Symptombdokumentation 13-17 wpai.

wpai Linie	13				16				17			
	n	m	s	d	n	m	s	d	n	m	s	d
05-004K	1*, 2-4				1*, 2-4				1*, 2-4			
05-018K			1					1				1
05-026T	1*			2	1*			2	1*			2
05-032T	1*, 2*	4, 10	3, 5-9		1*, 2*	4, 10	3, 5-9		1*, 2*	4, 10	3, 6, 7, 9	5, 8
05-154T	1*, 2*			3-6	1*, 2*			3-6	1*, 2*			3-6
05-157T	1*, 2*		3	4-10	1*, 2*		3	4-10	1*, 2*		3	4-10
2R 7629	1*			2	1*			2	1*			2
7B0091	3*	2		1	3*	2		1	3*	2		1
84101T	1*, 2*			3-10	1*, 2*			3-10	1*, 2*			3-10
84104T	1*, 10*	6, 8		2-5, 7, 9	1*, 10*	6, 8		2-5, 7, 9	1*, 10*	6, 8		2-5, 7, 9
84107K	1, 2, 9*, 10*	7, 8	5, 6	3, 4	1, 2, 9*, 10*	7, 8		3-6	1, 2, 9*, 10*	7, 8		3-6
84111K	2, 9*, 10*	8	4, 5	1, 3, 6, 7	2, 9*, 10*	8		1, 3-7	2, 9*, 10*	8		1, 3-7
84118T	1*			2-6	1*			2-6	1*			2-6
84124T	1*, 2*	3-5, 9		6-8, 10	1*, 2*	3-5, 9		6-8, 10	1*, 2*	3-5, 9		6-8, 10
84137T	1*, 2*			3-10	1*, 2*			3-10	1*, 2*			3-10
84142T	1*, 2*	3		4-10	1*, 2*	3		4-10	1*, 2*	3		4-10
84147T	1*, 9*	4	3, 6, 10	2, 5, 7, 8	1*, 9*	4		2, 3, 5- 8, 10	1*, 9*	4		2, 3, 5- 8, 10
84151T	1*	2, 4		3, 5, 6	1*		2, 4	3, 5, 6	1*		2, 4	3, 5, 6
84164T	5, 7*, 8*	2, 4		1, 3, 6, 9, 10	5, 7*, 8*	2, 4		1, 3, 6, 9, 10	5, 7*, 8*	2, 4		1, 3, 6, 9, 10
9K9010	1				1				1			

e: Symptombdokumentation 18 wpai.

wpai Linie	18			
	n	m	s	d
05-004K	1*, 2-4			
05-018K				1
05-026T	1*			2
05-032T	1*, 2*	4, 10	3, 6, 7, 9	5, 8
05-154T	1*, 2*			3-6
05-157T	1*, 2*		3	4-10
2R 7629	1*			2
7B0091	3*		2	1
84101T	1*, 2*			3-10
84104T	1*, 10*	6, 8		2-5, 7, 9
84107K	1, 2, 9*, 10*	7, 8		3-6
84111K	2, 9*, 10*	8		1, 3-7
84118T	1*			2-6
84124T	1*, 2*, 4	3, 5, 9		6-8, 10
84137T	1*, 2*			3-10
84142T	1*, 2*	3		4-10
84147T	1*, 9*	4		2, 3, 5- 8, 10
84151T	1*		2	3-6
84164T	5, 7*, 8*	2, 4		1, 3, 6, 9, 10
9K9010	1			

Tabelle 22a-f: Symptombdokumentation für das zweite Infektionsexperiment von 1 bis 18 wpai. n = keine Symptome/ *no*; m = milde Symptome; s = schwere Symptome/*severe*; d = tote Pflanzen/*dead*. Die Zahlen geben die Nummer der Einzelpflanze an. Kontrollpflanzen, die nicht inokuliert wurden, sind mit „*“ gekennzeichnet.

a: Symptombdokumentation 1-3 wpai.

wpai Linie	1				2				3			
	n	m	s	d	n	m	s	d	n	m	s	d
05-004K	1					1				1		
05-032T	1*, 2-6				1*	2-6			1*	2-6		
05-154T	1					1				1		
05-157T	1						1				1	
7B0091	1						1				1	
84101T	1*, 2-10				1*, 7	2-6, 8-10			1*	2-10		
84104T	1*, 2-10				1*, 8	2-7, 9, 10			1*	2-10		
84107K	1*, 2-10				1*	2-4, 6-8, 10	5, 9		1*	2-10		
84111K	1*, 2-10				1*	2-10			1*	2-10		
84124T	1*, 2-4				1*, 4	2, 3			1*	2-4		
84137T	1*, 2-10				1*	2, 3, 5-8, 10	4, 9		1*	2, 5, 6	3, 4, 7-10	
84142T	1*, 2-10				1*	2, 3, 5-10	4		1*	2-10		
84147T	1*, 2-10				1*, 6, 8	2-5, 7, 9, 10			1*	2-10		
84151T	1*, 2-4				1*	2-4			1*		2-4	
84164T	1*, 2-10				1*, 3, 9	2, 4-8, 10			1*	3-10	2	
9K9010	1*, 2, 3				1*	2, 3			1*	2	3	

b: Symptombdokumentation 4-6 wpai.

wpai Linie	4				5				6			
	n	m	s	d	n	m	s	d	n	m	s	d
05-004K		1				1				1		
05-032T	1*	2-5	6		1*	2-6			1*	2-6		
05-154T			1			1				1		
05-157T			1				1					1
7B0091			1				1					1
84101T	1*	3-7	2, 8-10		1*	2-5, 7, 9, 10	6, 8		1*	2-5, 7	6, 8-10	
84104T	1*	3-10	2		1*	3, 4, 6-10	2, 5		1*	2-10		
84107K	1*	2, 3, 10	4-9		1*	2-4, 6-8, 10	5, 9		1*	2-4, 6-8, 10	5, 9	
84111K	1*	2-10			1*	2-10			1*	2-10		
84124T	1*	2-4			1*	2-4			1*	2-4		
84137T	1*	2-4, 7-10	5, 6		1*	5, 6	2-4, 7, 8, 10	9	1*	5, 6, 8	2-4, 7, 10	9
84142T	1*, 2, 3, 6-10	4, 5			1*	2, 6, 7, 10	2, 4, 5, 8, 9		1*	2, 3, 6-10	4, 5	
84147T	1*	2-10			1*	2-10			1*	2, 3, 5-10	4	
84151T	1*		2, 4	3	1*		4	2, 3	1*		4	2, 3
84164T	1*	3-8	2, 9, 10		1*	3-9	2, 10		1*	3-9	2, 10	
9K9010	1*	2	3		1*	2	3		1*, 2		3	

c: Symptomdokumentation 7-10 wpai.

wpai Linie	7				9				10			
	n	m	s	d	n	m	s	d	n	m	s	d
05-004K			1				1					
05-032T	1*	2-6			1*	2-6			1*			
05-154T			1					1				1
05-157T				1				1				1
7B0091				1				1			1	1
84101T	1*	3-5, 7	2, 6, 8-10		1*	3-5, 7, 9	2, 6, 8, 10		1*	3-5, 7, 9	2, 10	6, 8
84104T	1*	2-10			1*	3, 4, 6-10	2	5	1*	3, 4, 6-8, 10		2, 5, 9
84107K	1*	2-4, 7, 10			1*	2-4, 7, 10	5, 6, 8, 9		1*	2-4, 7, 10	5, 6	8, 9
84111K	1*	2, 4, 5, 7-10	3, 6		1*	4, 5, 8, 10	2, 3, 6, 7, 9		1*	4, 5, 8, 10	2, 3, 6, 7, 9	
84124T	1*	2-4			1*	2-4			1*	2-4		
84137T	1*	4-6, 8	2, 3, 7, 10	9	1*	5, 6, 8	2, 4, 7, 10	3, 9	1*	6, 8	2, 4, 5, 7, 10	3, 9
84142T	1*	2, 3, 5-10	4		1*	3, 6-10	2, 5	4	1*, 10	3, 6-9	2, 5	4
84147T	1*	2, 3, 5-10	4		1*	2, 3, 5-9		4, 10	1*	2, 3, 5-9		4, 10
84151T	1*		4	2, 3	1*			2-4	1*			2-4
84164T	1*	3-8	2, 9, 10		1*	3-5, 7, 8, 10	2, 9	6	1*	3, 4, 7, 8	2, 5, 9, 10	6
9K9010	1*, 2	3			1*, 2	3			1*, 2	3		

d: Symptomdokumentation 11-13 wpai.

wpai Linie	11				12				13			
	n	m	s	d	n	m	s	d	n	m	s	d
05-004K				1				1				1
05-032T	1*	2-6			1*	2-6			1*	2-5	6	
05-154T				1				1				1
05-157T				1				1				1
7B0091				1				1				1
84101T	1*	3-5, 7, 9	10	2, 6, 8	1*	3-5, 9	7, 10	2, 6, 8	1*	3, 5, 9	4, 7, 10	2, 6, 8
84104T	1*	3, 4, 6, 7, 10	8	2, 5, 9	1*	3, 4, 6, 7, 10		2, 5, 8, 9	1*	3, 4, 6, 7, 10		2, 5, 8, 9
84107K	1*	2-4, 7, 10	5, 6	8, 9	1*	2, 4, 7, 10	3, 5, 6	8, 9	1*	4, 7, 10	2, 3, 5, 6	8, 9
84111K	1*, 4	5, 8, 10	2, 3, 6, 7, 9		1*, 4	8, 10	3, 5-7, 9	2	1*, 4	10	3, 5-9	2
84124T	1*, 2, 3	4			1*	2-4			1*, 3	2, 4		
84137T	1*	6, 8	2, 5	3, 4, 7, 9, 10	1*	6	2, 5, 8	3, 4, 7, 9, 10	1*	6	2, 5, 8	3, 4, 7, 9, 10
84142T	1*, 10	3, 6-9	2, 5	4	1*, 10	3, 6-9	2, 5	4	1*	3, 6-10	5	2, 4
84147T	1*	2, 3, 5-9		4, 10	1*	2, 3, 5-9		4, 10	1*	2, 3, 5-7, 9	8	4, 10
84151T	1*			2-4	1*			2-4	1*			2-4
84164T	1*, 3	4, 8	2, 5, 7, 9, 10	6	1*	3, 4, 8	2, 5, 7, 9, 10	6	1*, 3	4	2, 7-10	5, 6
9K9010	1*, 2, 3				1*, 2, 3				1*, 2, 3			

e: Symptombdokumentation 14-16 wpai.

wpai Linie	14				15				16			
	n	m	s	d	n	m	s	d	n	m	s	d
05-004K				1				1				1
05-032T	1*	2-6			1*	2-6			1*	2-6		
05-154T				1				1				1
05-157T				1				1				1
7B0091				1				1				1
84101T	1*	3, 5, 9	4, 7, 10	2, 6, 8	1*	3, 5, 9		2, 4, 6-8, 10	1*	3, 5, 9		2, 4, 6-8, 10
84104T	1*	3, 4, 6, 7, 10	2, 5, 8, 9		1*	3, 4, 6, 7, 10		2, 5, 8, 9	1*	3, 4, 6, 7, 10		2, 5, 8, 9
84107K	1*	2, 4, 7, 10	3, 5, 6	8, 9	1*	2, 4, 7, 10	3, 5, 6	8, 9	1*	2, 4, 7, 10	3, 5, 6	8, 9
84111K	1*	4, 10	3, 5-9	2	1*	4, 8, 10	3, 5-7, 9	2	1*, 4	8, 10	3, 6, 7	2, 5, 9
84124T	1*, 3	2, 4			1*, 3	2, 4			1*, 3	2, 4		
84137T	1*, 6		5, 8	2-4, 7, 9, 10	1*, 6		8	2-5, 7, 9, 10	1*, 6		8	2-5, 7, 9, 10
84142T	1*, 6, 10	3, 7-9	5	2, 4	1*, 6, 7	3, 8-10	5	2, 4	1*, 6, 10	3, 7-9		2, 4, 5
84147T	1*	2, 3, 5-9		4, 10	1*	2, 3, 5-9		4, 10	1*, 6	2, 3, 5, 7-9		4, 10
84151T	1*			2-4	1*			2-4	1*			2-4
84164T	1*, 3	4, 8	2, 7, 10	5, 6, 9	1*, 3	4, 8	10	2, 5-7, 9	1*, 3	4, 8	10	2, 5-7, 9
9K9010	1*, 2, 3				1*, 2, 3				1*, 2, 3			

f: Symptombdokumentation 17 und 18 wpai.

wpai Linie	17				18			
	n	m	s	d	n	m	s	d
05-004K				1				1
05-032T	1*	2-6			1*	2-6		
05-154T				1				1
05-157T				1				1
7B0091				1				1
84101T	1*	3, 5, 9		2, 4, 6-8, 10	1*	3, 5, 9		2, 4, 6-8, 10
84104T	1*	3, 4, 6, 7, 10		2, 5, 8, 9	1*	3, 4, 6, 7, 10		2, 5, 8, 9
84107K	1*	2, 4, 7, 10	3, 5, 6	8, 9	1*	2, 4, 7, 10	3, 5, 6	8, 9
84111K	1*, 4	8, 10	3, 6, 7	2, 5, 9	1*	4, 8, 10	3, 6, 7	2, 5, 9
84124T	1*, 3	2, 4			1*, 3	2, 4		
84137T	1*, 6			2-5, 7-10	1*, 6		8	2-5, 7, 9, 10
84142T	1*, 3, 6, 7, 10	8, 9		2, 4, 5	1*, 8, 10	3, 6, 7, 9		2, 4, 5
84147T	1*, 5, 7	2, 3, 6, 8, 9		4, 10	1*, 9	2, 3, 5-8		4, 10
84151T	1*			2-4	1*			2-4
84164T	1*, 3	4, 8	10	2, 5-7, 9	1*	3, 4, 8	10	2, 5-7, 9
9K9010	1*, 2, 3				1*, 2, 3			

4. RCA/RFLP-Analyse mit *SaI* und *NcoI* (Gesamtdaten)

Die Fragmente nach RCA/RFLP-*SaI* bzw. -*NcoI* wurden in 1,5 %-igen TBE-Agarosegelen aufgetrennt, die nach der Gelelektrophorese mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt wurden. Als Marker wurde *HpaI*- und *PstI*-geschnittene Gesamt-DNA von AbMV aufgetragen (vgl. Abbildung 40a). Die Symptome sind für jede Einzelpflanze angegeben (n: keine/*no*, m: mild, s: schwer/*severe*, d: tot/*dead*).

Bezeichnung der Pflanzen: L#, Liniennummer; P#, Pflanzennummer; In, inokuliert; Sym, Symptomstärke; E#, Nummer des Experiments; Kennzeichnung der Fragmente im Agarosegel: uv: unverdaut, F: *full-length*/gesamtgenomisch, D₀: D₀-DNA, D_n: D_n-DNA. Weitere Abkürzungen, die in Einzelfällen verwendet wurden, sind in der entsprechenden Abbildungsbeschriftung vermerkt.

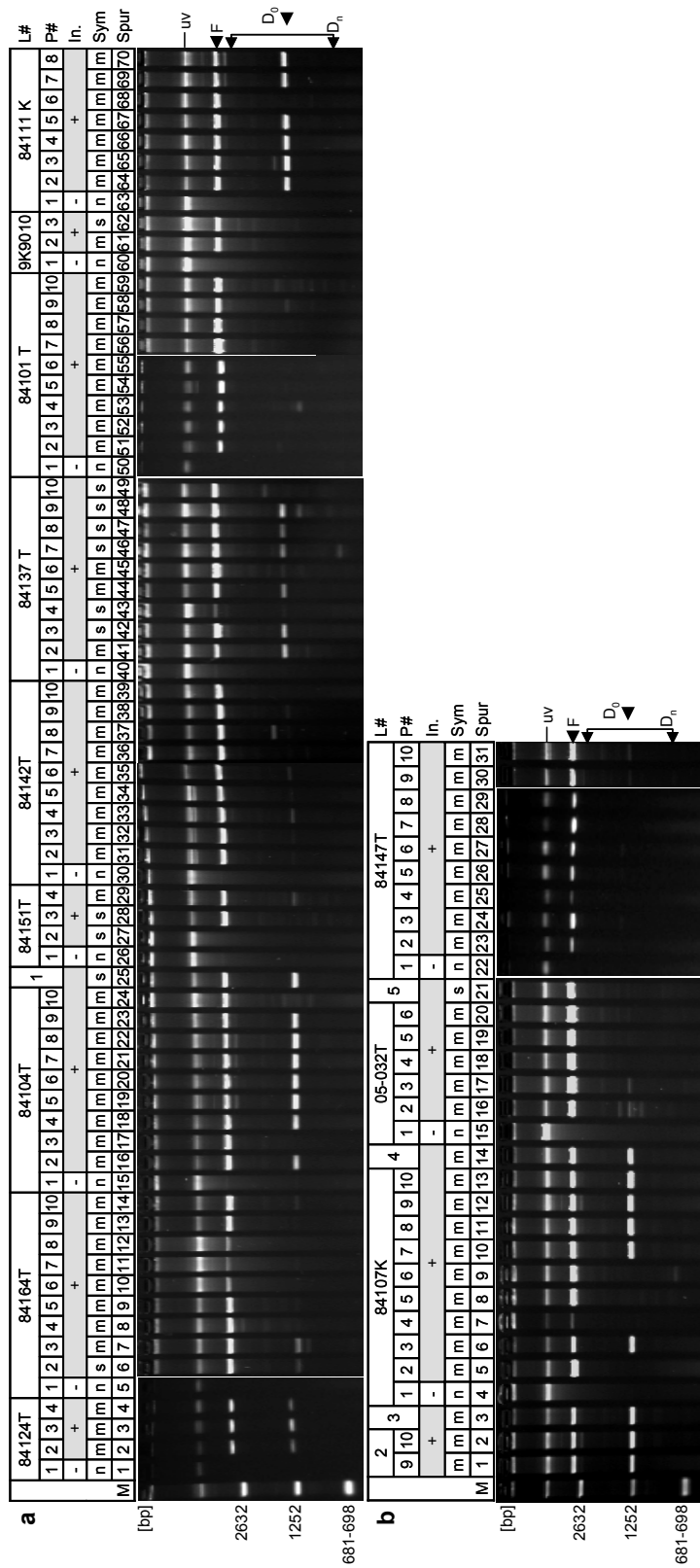


Abbildung 42: Nachweis der Replikation von Virus und D-DNAs durch RCA/RFLP-SaI für Experiment 2 zum Zeitpunkt 3 wpaI. Abkürzungen von Liniennummern: 1: 05-157T; 2: 84111K; 3: 05-154T; 4: 05-004K; 5: 7B0091.

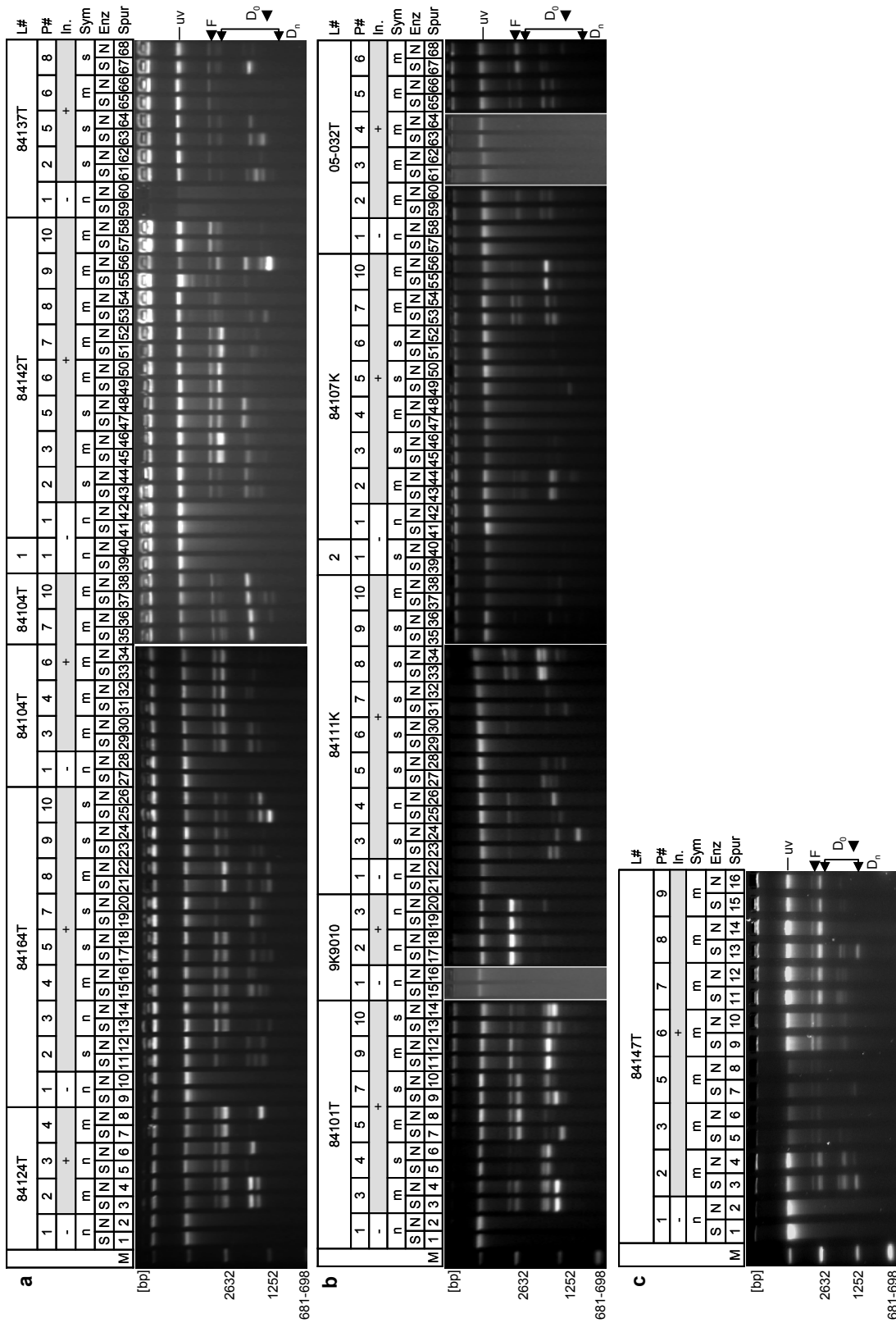


Abbildung 45: Nachweis der Replikation von Virus und D-DNAs durch RCA/FLP-SaI- und -NcoI für Experiment 2 zum Zeitpunkt 13 wpai. Enz: verwendetes Enzym; Abkürzungen von Liniennummern: 1: 84151T; 2: 05-154T.

5. Sequenzen

5.1 Sequenzen der D_n-DNAs aus langzeitüberlebenden Zuckerrüben

Einzelnukleotidaustausche sind grau unterlegt. Das Nonanukleotid ist umrahmt, Duplikationen sind unterstrichen und Inversionen fett dargestellt. Primer, die zum *primer walking* verwendet wurden, sind aufgeführt (vgl. V.1.6). Anderenfalls wurde die vollständige DNA-Sequenz bereits durch die Sequenzierung mit den M13-Standardprimern (s. V.1.6) erhalten.

5.1.1 Pflanze 2 (Linie 84124T, Pflanze 4, Experiment 1)

D_n-DNA [2]

TG TACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATATACTAGTACAAC T
 TTCATAAGGGCCATCCGTTA **TAATATTAC**CGGATGGCCCGAAAAAAATGGGCCCCCAATCAAAACGTGACACGTG
 GAAGGGGACTGTTGAATGATGTGGCCCGAAAAAAATGGGCCACCAATCAAAACGTGACACGTGGAAGGGGACTG
 TGAATGATGTGACGTTTTTTGAGCGGGAAACTTCCTGAAGAAGATTCTCGCGGAAACTTCCTGAAGAAGATTCT
 TTCAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAAGAAGGGGACAACCTTTATTAAGTAACCTTACTTTAGTAAAAGTAAA
 GTAAGTGCGCCCCACAGGAAAAATGCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTCGTTTTATATACGTTATTTTTACATGTA
 TATGTAATTATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTATTCTACTGCAATC
 AGGTACGAACCTTTTATGGGACCTTTCAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATGAACATGAGGACTATTTGGAAGAC
 ACCGGTGGTGGGAAGTATGAAGACGTGAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTTGTTGTTAATGATAATACGGATAAT
 ACTAATATGTATGCCACATTATTTGGCAATTGTAGATGCTATTTTTATTAATAATATTTATTATTAATAATGAAA
 TTAGTACAAGTTCATTGCAACACTCTGGTTCTGAATTACACTTGATACAAAAGTAAATTCCTTCATACAGGACATG
 ATTTAAACCTCTAATTACATTATTAATACAAATTAACCTAGATTATCCAAGTATATCTCTAGTCTAGGGCTAAA
 ATCTAAGTGCCCTGTGATGTAATTGTGGGCCCTAAAGATCTAGCCACATAGTCTTCCCTGTTCTTGAATCACC
 CTCTACTATGATACTATTATATCTTAAAGGCCGCGCAGCGGCATCAACCCGAAATATGCATCAGCCCATTCCTG
 CATTTCCCTCAGGAACGTTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTGGCCTCTGAAATAT
 CTTTTGAGCATTGTTCAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTCTTCCCTCAATATTTGAAG
 TGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACGCCTTGGCATATGAGTCGTTAGCTGTCTGTTGACCTCCTCTAGCACT
 TCTACCGTCGATCTGGAATTCTCCCATTCAATTGTGTCTCCGTCCTTGTTCGACGTAGGACTTGACGTCGGAGCT
 GGATTTAGCTCTCTGAATGTTTTGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGGGGATACCAGGTCGAATAATCTGATATT
 TGTGATCTGAACTTTTCTTCGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGATGAGGTTGCCCATCTTCGTGTAGCTCTCTGGC
 AATTTTAATATATTTTTTATTAGATGAAAGTTGTATTCTTTGAATTTGCTCAAGAGCTTCTTCTTTTGAAAGAGA
 AACTGAGGATATGTAAGAAATATGTTTTTTGCTTGAATACGAAATCTGTTAGTAGGAGGCAT

5.1.2 Pflanze 8 (Linie 84124T, Pflanze 2, Experiment 2)

D_n-DNA [8a] (Del1F3, Del1R1, Del1R3, Del2F, Del2R)

TT TACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATATACTAGTACAAC T
 TTCATAAGGGCCATCCGTTA **TAATATTAC**CGGATGGCCCGAAAAAAATGGGCCACCAATCAAAACGTGACACGTG
 GAAGGGGACTGTTGAATCCGGATGGCCCGAAAAAAATGGGCCACCAATCAAAACGTGACACGTGGAAGGGGACTG
 TTGAATGATGTGACGTTTTTTGAGCGGGAAACTTCCTGAAGAAGATTCTCGCGGAAACTTCCTGAAGAAGATTCC
 TTTTTCAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAAGAAGGGGACAACCTTTATTAAGTAACCTTACTTTAGTAAAAGTAAA
 AGTAAGTGTGCCCCACAGGAAACTTGCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTCGTTTTATATACGTTATTTTTACATGT
 ATATGTAATTATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTATTCTACTGCAAT
 CAGGTACGAACCTTTTATGGGACCTTTCAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTCTAGCATATCG
 ACCAGTTGTTTTCTTAAGGTACAACAGGTGGTGTATACTAAGTTATCCATCAAGAGATAGGCTTCTGACCTTAGAA
 GAAGCGAGGTCTTTCGTCAATTCCAGAAGGAAGTGAAGAAGCTACTGAGGTGTAAGGTTAATTTTTCATAGGAAG
 TGTTTCGTTGTATGAGGAAATATACAAGAAATACGTATAACAATGTCCAGAAAAAGAAAGGTGAATCCTCAAAGTGC
 GTGGCCGAAGAAGAGGAGGACTAGTACGACTTCGAGGAAATACCAATGGAGGAGACCTGTGACAAAAAACAGGAC
 TCTGAAGTTAAAGATGTATGATGATATGTTGGGTGCTGGTGGTATAGGATCTACCATTAGTAATAATGGTATGAT

TACTATGTTGAATAATTATGTCCAGGGTATTGGTGATAGTCAGAGAGCGAAGAACGTTACTGTGACGAAGCATT
 GAAGTTTGATATGGCTCTTATGGGGAGTTCTCAGTTCTGGGAGACTCCTAATTATATGACCCAATATCATTGGAT
 TATCATAGACAAGGATGTTGGGTCAGTGTTCCTACTAAGTTATCGAGTATATTTGATATTTCCCGATAACGGTCA
 GGCTATGCCGTCTACTTATCGTATTTCGAAGAGATATGAACGAGAGGTTTATTGTTGAAGAAGAAATGGAGA
 AACTCA TTTGATGTCTACTGGTACTGGATATGGAGGGAAGGAGACTTACAAGGCTCCTTCAATGCCAAAT
 TACAAGAAACC GATGAATATCAATGTGCGCAATTTGAACATGAGGACTATTTGGAAAGACACCGGTGGT
 GGGAAAGTATGAAGACGT GAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTTGTTGTTAATGATAATACGGATA
 AATACTAATATGTATGCCACATTATTTGG CAATTGTAGATGCTATTTTTATTATTAATAATGAAAT
 TAGTACAAGTTCATTGCAACACTCT GGTCTGAATTACACTTGATACAAAAGTAAATTTCTTCATACAGG
 ACATGATTTAAACCTCTAATTACATTATTA TACAAATTAACCTAGATTATCCAAAATGACGTTGTAT
 TCCACTTCATCATAATACGTTCTAGGGCTAAAACTA AGTGCCCTGTGATGTAATTTGGGGCCCT
 TAAAGATCTAGCCCACATAGTCTTCCCTGTTCTTGAATCACCCCTCTA CTATGATACTATTATATCT
 TAAAGGCCGCGCAGCGGCATCAACCCCGAAAATATGCATCAGCCCATTTCTTGCAATTT
 CCTCAGGAACGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTGGCTCTGAAAT
 ATCTTTT GAGCATTGTTCAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTGTCTCTTCAATATTT
 GAAGTGCTT GGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACGCTTGGCATTGAGTCTAGCTGTCTGTTGACCT
 CCTCTAGCACTTCTAC CGTCGATCTGGAATTTCAATTTGATGCTCCGCTTGGTGCAGCTAGGACT
 TGACGTGCGAGCTGGATT TAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGGGGATA
 ACCAGGTCGAATACTGATATTTGTGA TCTGAACTTTTCTTCGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGAT
 GAGGTTGCCCATCTTCGTGTAGCTCTCTGGCAATTT TAATATATTTTTATTAGATGAAAGTTGTAT
 TCTTTGAATTTGCTCAAGAGCTTCTTCTTTTGAAGAGAACACT GAGGATATGTAAGAAATATGTT
 TTTTGGCTTGAATACGAAATCTTTTAGTAGGAGGCAT

D_n-DNA [8b] (Del1R1, Del1F1, Del2F, Del2R)

TTTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATACTAGTACA
 AACT TTCATAAGGGCCATCCGTTATAATATTACCGGATGGCCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAAC
 CGTGACACGTTGAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTGGATGGCCCCGAAAAAATGGGCACCCAAT
 CAAAACGTGACACGTTGGAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTGGATGGCCCCGAAAAAATGGGC
 ACCCAATCAAACCGTGACACGTTGAAGAAGATTCCCTGAAGAAGATTCCCTGCGGGAAACTTCCCT
 GAAGAAGATTCCCTTTCAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAAAGAAGGGGACAACCTTATTAAAGTAACT
 TTTACTTTAGTAAAAGTAAAGTAAAGTGTGCCCCACAGGAAACTTGCTCAGCAAGTTTTGGGTCAGTGT
 TTTCTACTAAGTTA TCGAGTATATTTGATATTTCCCGATAACGGTCAGGCTATGCCGCTACTTATCGTAT
 TCGAAGAGATATGAACGAG AGGTTTTATTGTTGAAGAAGAAATGGAGAACTCATTGATGTCTACTGGT
 ACTGGATATGGAGGGAAGGAGACTTAC AAGGCTCCTTCAATGCCAAATTACAAGAAACCGATGAATAT
 CAATGTGCGCAATTTGAACATGAGGACTATTTGG AAAGACACCGGTGGTGGGAAGTATGAAGACGT
 GAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTTGTTGTTAATGATAATACG GATAATACTAATATGTATGCCACAT
 TATTTGGCAATTGTAGATGCTATTTTTATTAAATAATATTTATTATTAATA ATGAAATTAGTACAAGT
 TCATTGCAACACTCTGGTCTGAATTACACTTGATACAAAAGTAAATTTCTTCATACAG GACATGATTT
 AAACCTCTAATTACATTATTAATACAAATTAACCTAAAGATCTAGCCACATAGTGTTCCTCTG
 TCTTGAATCACCCCTACTATGATACTATTATCTTAAAGCCGCGCAGCGGCATCAACCCGAAAATATGCAT
 CAGCCATTCTTGCAATTTCTCAGGAACTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGATCCATGGATCAG
 TGG CCTCTGAAATATCTTTGAGCATTGTTCAAAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTGT
 CTCTCCCTT CAATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACGCTTGGCATTAGATCGT
 TAGCTGTCTGTTGACC TCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATCTGGAATTTCTCCCCATTCAATTTGTG
 TCTCCGTCCTTGTGACGCTAGGACTT GACGTGCGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAA
 ATGTGCTGACCTGGTTGGGGATAACCAGGTCGAA TAATCTGATATTTGTGATCTGAACTTTTCTTCG
 AGTTGAAGCAGGACGTGGAGATGAGGTTGCCCATCTTCGTG TAGCTCTTGCAATTTTAATATATTT
 TTTTATTAGATGAAAGTTGTATTCTTTGAATTTGCTCAAGAGCTTCTTC TTTTGAAGAGAACACT
 GAGGATATGTAAGAAATATGTTTTTTGCTTGAATACGAAATCTTTTAGTAGGAGGCAT

D_n-DNA [8c]

TTTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATACTAGTACA
 AACT TTCATAAGGGCCATCCGTTATAATATTACCGGATGGCCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAAC
 CGTGACACGTTGATGGCCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAACCGTGACACGTTGGAAGGGGACTGTT
 GAATGATGTGACGTTTTT GAGCAGGGAACCTTCCCTGAAGAAGATTCCCTTTCAGATAAGATTTGTTGA
 CTGGTCAAAAAGAAGGGGACAACCTTATTAAAGTAACTTTACTTTAGTAAAAGTAAAGTAAAGTGGCC
 CACAGGA AACTTGCTCAGCAAGTTTTGGGTCAGTGTTCCTACTAAGTTATCGAGTATATTTGATATTT
 CCCGATAACGGTCA GGCTATGCCGTCTACTTATCGTATTTCGAAGAGATATGAACGAGAGGTTTATTG
 TGAAGAAGAAATGGAGA AACTCA TTTGATGTCTACTGGTACTGGATATGGAGGGAAGGAGACTTACA
 AAGGCTCCTTCAATGCCAAAT TACAAGAAACC GATGAATATCAATGTGCGCAATTTGAACATGAGG
 ACTATTTGG GAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTTGTTGTTAATGATAATACGGATAAATACTAATAT
 GTATGCCACATTATTTGG CAATTGTAGATGCTATTTTTATTAAATAATATTTATTATTAATAATGAA
 ATTAGTACAAGTTCATTGCAACACTCTGGTCTGAATTACACTTGATACAAAAGTAAATTTCTTCATAC
 AG GACATGATTTAAACCTCTAATTACATTATTAATACAAATTAACCTAAAGATCTAGCCACATAGTGT
 TTCCTCTG TCTTGAATCACCCCTACTATGATACTATTATCTTAAAGCCGCGCAGCGGCATCAACCCG
 AAAATATGCATC AGCCATTCTTGCAATTTCTCAGGAACTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGG
 ATCCATGGATCAGTGG CCTCTGAAATATCTTTGAGCATTGTTCAAAAAGATTGTGATGTTGAAGGA
 AGTAATCCTTTGGTGTCTCTCCCTT CAATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACG
 CTTGGCATTAGATCGT TAGCTGTCTGTTGACC TCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATCTGGAATTTCT
 CCCCCATTCAATTTGTG TCTCCGTCCTTGTGACGCTAGGACTT GACGTGCGAGCTGGATTTAGCTCT
 CTGAATGTTTGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGGGGATAACCAGGTCGAA TAATCTGATATTT
 GTGATCTGAACTTTTCTTCGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGATGAGGTTGCCCATCTTCGTG TAGCT
 CTCTGGCAATTTTAATATATTTTTTATTAGATGAAAGTTGTATTCTTTGAATTTGCTCAAGAGCTTCT
 TC TTTTGAAGAGAACACTGAGGATATGTAAGAAATATGTTTTTTGCTTGAATACGAAATCTTTTAGTAG
 GAGGCAT

ATCTTAAAGGCCGCGCAGCGGCATCAACCCCGAAATATGCATCAGCCCATTCCTTGCATTTCCCTCAGGAACGTTTG
 TGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTGGCCTCTGAAATATCTTTTTGAGCATTGTTCAAAA
 GATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTCTTCCTTCAATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTG
 CGTTTAAACGCCTTGGCATATGAGTCGTTAGCTGTCTGTTGACCTCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATCTGGAATT
 CTCCCCATTCAATTGTGTCTCCGTCTTGTGACGTTAGGACTTGACGTCGGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGT
 TTGGATGGAATGTGCTGACCTGGTTGGGGATAACCAGGTGCAATAATCTGATATTTGTGATCTGAACTTTTCCTT
 CGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGATGAGGTTGCCCATCTTCGTGTAGCTCTCTGGCAATTTAATATATTTTTTAT
 TAGATGAAAGTTGTATTCTTTGAATTTGCTCAAGAGCTTCTTCTTTTGAAGAGAACACTGAGGATATGTAAGAA
 ATATGTTTTTTGCTTGAATACGAAATCTTTTAGTAGGAGGCAT

D_n-DNA [8d] (Del1F1, Del1R1, Del2F, Del2R, Del3R)

TTTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATACTAGTACAAC
 TTCATAAGGGCCATCCGTTA[TAATATTAC]CGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAAACGTGACACGTG
 GAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTTGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAAACGTGACACGT
 GGAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTTGAGCGGGAAACTTCCTGAAGAAGATTTCCTGCGGGAAACTTCCT
 GAAGAAGATTCTTTTTCAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAAGAAGGGGACAACCTTTATTAAGTAACCTTACTT
 TAGTAAAAGTAAAGTAAGTGGGCCCCACAGGAACTTGCTCAGCAAGTTTTGGGTGAGTGTTCCTACTAAGTTA
 TCGAGTATATTTGATATTTCCCGATAACGGTCAGGCTATGCCGTCTACTTATCGTATTCGAAGAGATATGAACGAG
 AGTTTTATTGTTGAAGAAGAAATGGAGAACTCATTGATGTCTACTGGTACTGGATATGGAGGGAAGGAGACTTAC
 AAGGTCCTTCAATGCCAAATTACAAGAAACCGATGAATATCAATGTGCGCAATTTGAACATGAGGACTATTTGG
 AAAGACACCGGTGGTGGGAAGTATGAAGACGTGAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTTGTTGTTAATGATAATACG
 GATAATACTAATATGTATGCCACATTATTTGGCAATTGTAGATGCTATTTTTATTAATAATATTTATTATTAATA
 ATGAAATTAGTACAAGTTCATTGCAACACTCTGGTTCTGAATTACACTTGATACAAAAGTAAATTCCTCATAACAG
 GACATGATTTAAACCTCTAATTACATTATTAATACAAATTAACCTAAAGATCTAGCCACATAGTGTTCCTGT
 TCTTGAATCACCTCTACTATGATACTATTATATCTTAAAGGCCGCGCAGCGGCATCAACCCCGAAATATGCATC
 AGCCCATTCCTTGCAATTTCCCTCAGGAACGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTGG
 CCTCTGAAATATCTTTTGGACATTGTTCAAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTCTTCCTT
 CAATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACGCCTTGGCATATGAGTCGTTAGCTGTCTGTTGACC
 TCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATCTGGAATTCTCCCCATTCAATTGTGTCTCCGTCTTGTGACGTTAGGACTT
 GACGTCGGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGGGGATAACCAGGTGCGAA
 TAATCTGATATTTGTGATCTGAACTTTTCCTTCGAGTTGAAGCAGGATGTTTTTTGCTTGAATACGAAATCTTTT
 AGTAGGAGGCAT

D_n-DNA [8e]

TTTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATACTAGTACAAC
 TTCATAAGGGCCATCCGTTA[TAATATTAC]CGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAAACGTGACACGTG
 GAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTTGAGCGGGAAACTTCCTGAAGAAGATTTCCTGCGGGAAACTTCCTG
 AAGAAGATTCTTTTTCAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAAGAAGGGGACAACCTTTATTAAGTAACCTTACTTT
 AGTAAAAGTAAAGTAAGTGGGCCCCACAGGAACTTGCTCAGCAAGTTTTGGGTGAGTGTTCCTACTAAGTTAT
 CGAGTATATTTGATATTTCCCGATAACGGTCAGGCTATGCCGTCTACTTATCGTATTCGAAGAGATATGAACGAGA
 GTTTTATTGTTGAAGAAGAAATGGAGAACTCATTGATGTCTACTGGTACTGGATATGGAGGGAAGGAGACTTACA
 AGGTCCTTCAATGCCAAATTACAAGAAACCGATGAATATCAATGTGCGCAATTTGAACATGAGGACTATTTGGA
 AAGACACCGGTGGTGGGAAGTATGAAGACGTGAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTTGTTGTTAATGATAATACGG
 ATAATACTAATATGTATGCCACATTATTTGGCAATTGTAGATGCTATTTTTATTAATAATATTTATTATTAATAA
 TGAAATTAGTACAAGTTCATTGCAACACTCTGGTTCTGAATTACACTTGATACAAAAGTAAATTCCTCATAACAGG
 ACATGATTTAAACCTCTAATTACATTATTAATACAAATTAACCTAAAGATCTAGCCACATAGTGTTCCTGT
 CTTGAATCACCTCTACTATGATACTATTATATCTTAAAGGCCGCGCAGCGGCATCAACCCCGAAATATGCATCA
 GCCCATTCCTTGCAATTTCCCTCAGGAACGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTGGC
 CTCTGAAATATCTTTTGGACATTGTTCAAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTCTTCCTT
 AATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACGCCTTGGCATATGAGTCGTTAGCTGTCTGTTGACCT
 CCTCTAGCACTTCTACCGTCGATCTGGAATTCTCCCCATTCAATTGTGTCTCCGTCTTGTGACGTTAGGACTTG
 ACGTCGGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGGGGATAACCAGGTGCGAA
 AATCTGATATTTGTGATCTGAACTTTTCCTTCGAGTTGAAGCAGGATGTTTTTTGCTTGAATACGAAATCTTTT
 AGTAGGAGGCAT

5.1.3 Pflanze 9 (Linie 84124T, Pflanze 3, Experiment 2)

D_n-DNA [9a] (Del1F1, Del1R2)

TTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATACTAGTACAAC
 TTCATAAGGGCCATCCGTTAATAATTACCGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAACCGTGACACGTG
 GAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTGGAGCGGAAACTTCCTGAAGAAGATTCCCTGCGGAAACTTCCTG
 AAGAAGATTCCCTTTCAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAGAAGGGGACAACCTTTATTAAGTAACCTTACTTT
 AGTAAAAGTAAAGTAAGTGGCCCCACAGGAACTTGCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTCGTTTTATATACGTTA
 TTTTTACATGTATATGTAATTATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTAT
 TCTACTGCAATCAGGTACGAACCTTTTATGGGACCTTTTTCAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTTC
 TAGCAGTATCGACCAGTTGTTTTCTTAAGGTACAACAGGTGGTGTATACTAGGTATCCATCAAGAGATAGGGTCTC
 TGACCCTAGAAGAAGGCGAGGTCTTTTCGTCAATTCAGAAGGAAGTGAAGAAGCTACTGAGGTGTAAGGTTAATT
 TTCATAGGAAGTGTTCGTTGTATGAGGAAATATACAAGAAATACGTATACAATGTCCAGAAAAGAAAGGTGAAT
 CCTCAAAGTGCCTGGCCGAAGAAGAGGAGGACTAGTACGACTTCGAGGAAATACCAATGGAGGAGACCTGTGACA
 AAAAAACAGGACTCTGAAGTTAAAGATGTATGATGATATGTTGGGTGCTGGTGGTATAGGATCTACCATTAGTAAT
 AATGGTATGATTACTACTGTTGAATAATTATGTCAGGGTATTGGTGATAGTCAGAGAGCGAAGACGTTACTGTG
 ACGAAGCATTGAAAGTTTGATATGGCTCTTATGGGGAGTTCTCAGTTCTGGGAGACTCCTAATATATGACCCAA
 TATCATTGGATTATCATAGACAAGGATGTTGGGTGAGTGTTCCTACTAAGTTATCGAGTATATTTGATATTTCCC
 GATAACGGTCAGGCTATGCCGCTACTTATCGTATTCGAAGAGATATGAACGAGAGGTTTTATTGGAAGAAGAAA
 TGGAGAACTCATTGATGTCTACTGGTACTGGATATGGAGGGAAGGAGACTTACAAGGCTCCTTCAATGCCAAAT
 TACAAGAAACCGATGAATATCAATGTGCGCAATTTGAACATGAGGACTATTTGGAAAAGACACCGGTGGTGGGAAG
 TATGAAGACGTGAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTTGTTGTTAATGATAATACGGATAATACTAATATGTATGCC
 ACATTATTTGGCAATTGTAGATGCTATTTTTATTAATAATATTTATTATTAATAATGAAATTAGTACAAGTTCAT
 TGCAACACTCTGGTTCTGAATTACACTTGATACAAAAGTAAATTCCTCATAACAGGACATGATTTAAACCTCTAAT
 TACATTATTAATACAAATTAACCTAGATTATCCAAGGAATTTGTTGCGTGATGGAGAGTAATAGGTTCCCTGT
 GCGAAAATCCTCTATTACATTCATGGTGTATTGTGAAGTGGCAGTTACAGGGTAGAGTCACTTGCAGGATGCT
 GCTGCTTGGTTATTAAGAGCGGACCTTGGAGTTTGCAAGGTTGAATTATGTAATGTCCAGGACTTAAGGGCT
 TCATTTTCTGGTTTTTCAAGAAATTTGTTGGTATGAGCTCTCAGGTCTGGATTGCATAATATAATGCAGGGGATA
 CCACCTTTAATGACACGTGGTTTTCCATACTTTAAGTTTGTCTGCCACTCCTTTTGTGCTCCAATAAGGTGTTTC
 CAGTGTTCATCTTTAAGTAAGTGGGATCTACGTCATCAATGACGTTGTATTCCACTTCATCATAATACGTTCTA
 GGGCTAAAATCTAAGTGCCCTGTGATGTAATTGTGGGCCCTAAAGATCTAGCCACATAGTCTTCCCTGTTCTT
 GAATCACCCTCTACTATGATACTATTATATCTTAAAGGCCGCGCAGCGGCATCAACCCGAAATATGCATCAGCC
 CATTCTTGCAATTTCCAGGAACGTTTGTGAATGAGGACAGAGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGTTGGCCCTC
 TGAATATCTTTGAGCATTGTTCAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTCTTCTTCAAT
 ATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACGCTTGGCATATGAGTCGTTAGCTGTCTGTTGACCTCCT
 CTAGCACTTCTACCGTCGATCTGGAATTCTCCCCATTCAATTGTGTCTCCGTCCTTGTGACGTTAGGACTTGACG
 TCGGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGGGGATAACCAGGTGCAATAAT
 CTGATATTTGTGATCTGAACTTTTCTTTCGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGATGAGGTTGCCCATCTTCGTGTAGC
 TCTCTGGCAATTTAATATATTTTTTATTAGATGAAAGTTGTATTCTTTGAATTTGCTCAAGAGCTTCTTCTTTT
 GAAAGAGAACACTGAGGATATGTAAGAAATATGTTTTTTGCTTGAATACGAAATCTTTTAGTAGGAGGCAT

D_n-DNA [9b] (Del1R1, Del1F1)

TTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATATTAGTACAAC
 TTCATAAGGGCCATCCGTTAATAATTACCGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAACCGTGACACGTG
 GAAGGGGACTGTTGATTTGATAAAAAAATGGGCACCCAATCAAACCGTGACACGTGGAAGGGGACTGTTGAATGAT
 GTGACGTTTTTGGAGCGGAAACTTCCTGAAGAAGATTCCCTGCGGAAACTTCCTGAAGAAGATTCCCTTTCAGATA
 AGATTTGTTGACTGGTCAAAGAAGGGGACAACCTTTATTAAGTAACCTTACTTTAGTAAAAGTAAAGTAAGTGT
 GCCCCACAGGAACTTGCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTCGTTTTATATACGTTATTTTTACATGTATATGTAAT
 TATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTAGTCTACTGCAATCAGGTACGA
 ACTTTTTATGGGACCTTTTTCAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTTCTAGCAGTATCGACCAGTTGT
 TTCTTAAGGTACAACAGGTGGTGTATACTAGGTATCCATCAAGAGATAGGGTCTCTGACCCTAGAAGAAGGCGAG
 GTCTTTCGTCAATTCAGAAGGAAGTGAAGAAGCTACTGAGGTGTAAGGTTAATTTTCATAGGAAGTGTTCGTTG
 TATGAGGAAATATAACAAGAAATACGTATAACAATGTCCCAGAAAAGAAAGGTGAATCCTCAAAGTGCCTGGCCGAA
 GAAGAGGAGGACTAGTACGACTTCGAGGAAATACCAATGGAGGACCTGTGACAAAAACAGGACTCTGAAGTT
 AAAGATGTATGATGATATGTTGGGTGCTGGTGGTATAGGATCTACCATTAGTAATAAATGGTATGATTACTATGTT
 GAATAATTATGTCCAGGGTATTGGTGTAGTACAGAGAGCGAAGAAGCTTACTGTGACGAAGCATTTCAGATTTGA
 TATGGCTCTTATGGGGAGTTCTCAGTTCTGGGAGACTCCTAATATATGACCCAATATCATTGGATTATCATAGA
 CAAGGATGTTGGGTGAGTGTTCCTACTAAGTTATCGAGTATATTTGATATTTCCCGATAACGGTTCAGGCTATGCC

GTCTACTTATCGTATTCGAAGAGATATGAACGAGAGGTTTATTGTGAAGAAGAAATGGAGAACTCATTGATGTC
 TACTGGTACTGGATATGGAGGGAAGGAGACTTACAAGGCTCCTTCAATGCCAAATTACAAGAAAACCGATGAATAT
 CAATGTGCGCAATTTGAACATGAGGACTATTTGGAAAGACACCGGTGGTAGGGAAGTATGAAGACGTGAAGGAGA
 ATGCTTTACTCTATGTTGTTGTTAATGATAATACGGATAATACTAATATGTATGCCACATTATTTGGCAATTGTA
 GATGCTATTTTTATTAATAATATTTATTATTAATAATGAAATTAGTACAAGTTCATTGCAACACTCTGGTCTGA
 ATTACACTTGATACAAAAGTAAATTCTTCATACAGGACATGATTTAAACCTCTAATTACATTATTAATACAAAT
 AAACCTAGATTATCCAAGTATATCTCTAGTCTCTTTTTCAAGACCTTCAAGAAACGGGGTCCAGTCAATATCCTG
 TTCGATCCAGTTATCGTCAGCTCTATCCAGCAGCTTGTGAAGATTCAACGCTCTCCGGAGGTTGTAGTTGAATCTG
 ATTTGTATCTTCAGTTGATAGATTGGCCTAAAATCTAAGTGCCCTGTGATGTAATTGTGGGCCCTTAAAGATCTA
 GCCCACATAGTCTTCCCTGTTCTTGAATCACCTCTACTATGATACTATTATATCTTAAAGGCCGCGCAGCGGCA
 TCAACCCCGAAATATGCATCAGCCATTCTTGCATTTCCCTCAGGAACGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGT
 GGAGTCCATGGATCAGGTGGCCTCTGAAATATCTTTGAGCATTGTTCAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAA
 TCCTTTGGTTGTTCTTCCCTCAATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTAACGCCTTGGCATATGAG
 TCCTTAGCTGTCTGTTGACCTCCTCTAGCAGCTTCTACCGTCGATCTGGAATCTCCCATCAATTTGTGTCTCCG
 TCCTTGTGACAGTAGGACTTGACGTCGGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAATGTGCTGACCTG
 GTTGGGATACCAGGTCAATAATCTGATATTTGTGATCTGAACCTTTCCCTTCGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGA
 TGAGTTGCCCATCTTCGTGTAGCTCTCTGGCAATTTAATATATTTTTATTAGATGAAAGTTGTATTCTTTGA
 ATTTGCTCAAGAGCTTCTTCTTTTGAAGAGAACACTGAGGATATGTAAGAAATATGTTTTTTCCTTGAATACGA
 AATCTTTTAGTAGGAGGCAT

D_n-DNA [9c] (Del1F2, Del1R1, Del2F, Del2R)

TGTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTACTATATATATATTAGTACAAC
 TTCATAAGGGCCATCCGTTA[TAATATTAC]CGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAACCGTGACACGTG
 GAAGGGGACTGTTGAATGAT[TAATAAATGGGCACCCAATCAAACCGTGACACGTGGAAGGGGACTGTTGAATGAT
 GTGACGTTTTTTGAGCGGGAAACTTCTGAAGAAGATTCTGCGGAAACTTCTGAAGAAGATTCTTTTCAGATA
 AGATTTGTTGACTGGTCAAAGAAGGGGACAACCTTTATTAAGTAACTTTACTTTAGTAAAAGTAAAGTAAAGTGT
 GCCCCACAGGAAACTGCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTCGTTTTATATACGTTATTTTTACATGTATATGTAAT
 TATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTATTCTACTGCAATCAGGTACGA
 ACTTTTTATGGGACCTTTTCAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTTCTAGCAGTATCGACCAGTTGT
 TTCTTAAGGTACAACAGGTGGTGTATACTAGGTATCCATCAAGAGATAGGGTCTCTGACCCTAGAAGAAGGCGAG
 GTCTTTTCGTCATTTCCAGAAGGAAGTGAAGAAGCTACTGAGGTGTAAGGTTAATTTTTCATAGGAAGTGTTCGTTG
 TATGAGGAAATATACAAGAAATACGTATACAATGTCCCAGAAAAGAAAGGTGAATCCTCAAAGTGCGTGGCGGAA
 GAAGAGGAGGACGAGAGGTTTATTGTGAAGAAGAAATGGAGAACTCATTGATGTCTACTGGTACTGGATATGGA
 GGAAGGAGACTTACAAGGCTCCTTCAATGCCAAATTACAAGAAACCGATGAATATCAATGTGCGCAATTTGAAC
 ATGAGGACTATTTGGAAAGACACCGGTGGTGGGAAGTATGAAGACGTGAAGGAGAATGCTTACTCTATGTTGTT
 GTTAATGATAATACGGATAATACTAATATGTATGCCACATTTATTTGGCAATTGTAGATGCTATTTTTATTAATAA
 TATTTATTTAATAAATAAGAAATTAGTACAAGTTCAATTGCAACACTCTGGTTCTGAATTACACTTGATACAAAAGT
 AAATCTTCATACAGGACATGATTTAAACCTCTAATTACATTATTAATACAAATTAACCTAGATTATCCAAGTA
 TATCTCTAGTCTCTTTTTCAAGACCTTCAAGAAACGGGGTCCAGTCAATATCCTGTTTCGATCCAGTTATCGTCAG
 CTCTATCCAGCAGCTTGTGAAGATTCAACGCTCTCCGGAGGTTGTAGTTGAATCTGATTTGTATCTTCAGTTGATA
 GATTGGCCCTAAAATCTAAGTGCCCTGTGATGTAATTGTGGGCCCCATAAAGATCTAGCCCACATAGTCTTCCCTG
 TTCTTGAATCACCTCTACTATGATACTATTATATCTTAAAGGCCGCGCAGCGGCATCAACCCCGAAATATGCAT
 CAGCCCATTCTTGCATTTCCCTCAGGAACGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTG
 GCCTCTGAAATATCTTTTGAAGCATTGTTCAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTCTTCCCT
 TCAATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACGCTTGGCATATGAGTCGTAGCTGTCTGTTGAC
 CTCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATCTGGAATTTCTCCCATCAATTTGTGCTCCGTCCTTGTGACGCTAGGACT
 TGACGTCGGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAATGTGCTGACCTGGTTGGGGATACCAGGTGCA
 ATAATCTGATATTTGTGATCTGAACCTTTTCCCTTCGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGATGAGGTTGCCCATCTTCGT
 GTAGCTCTCTGGCAATTTAATATATTTTTTATTAGATGAAAGTTGTATTCTTTGAATTTGCTCAAGAGCTTCTT
 CTTTTGAAGAGAACACTGAGGATATGTAAGAAATATGTTTTTTCCTTGAATACGAAATCTTTTAGTAGGAGGCA
 T

D_n-DNA [9d] (Del1F1, Del1R1, Del2F)

TACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATACTAGTACAAC
 TTCATAAGGGCCATCCGTTA[TAATATTAC]CGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAACCTTGACACGTG
 GAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTTGAGCGGGAAACTTCTGAAGAAGATTCTGCGGGAAACTTCCCTG
 AAGAAGATTCTTTTCAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAGAAGGGGACAACCTTTATTAAGTAACTTTACTTT
 AGTAAAAGTAAAGTAAAGTGTGCCCCACAGGAAACTTGTCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTCGTTTTATATACGTTA
 TTTTTACATGTATATGTAATTATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTAT

TCTACTGCAATCAGGTACGAACCTTTTATGGGACCTTTTCAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTTC
 TAGCAGTATCGACCAGTTGTTTTCTTAAGGTACAACAGGTGGTGTATACTAGGTATCCATCAAGAGATAGGGTTTTT
 ATTGGGAAGAAGAAATGGAGAACTCATTGGATGTCTACTGGTACTGGATATGGAGGGAAGGAGACTTACAAGGCT
 CCTTCAATGCCAAATTACAAGAAACCGATGAATATCAATGTGCGTAAATTTGAACATGAGGACTATTTGGAAAAGAC
 ACCGGTGGTGGGAAGTATGAAGACGTGAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTTGTTGTTAATGATAATACGGATAAT
 ACTAATATGTATGCCACATTATTTGGCAATTGTAGATGCTATTTTTATTAATAATATTTATTATTAATAATGAAA
 TTAGTACAAGTTCATTGCAACACTCTGGTCTGAATTACACTTGATACAAAAGTAAATTTCTTCATACAGGACATG
 ATTTAAACCTCTAATTACATTATTAATACAAATTAACCTAGATTATTGTGGGCCCTTAAAGATCTAGCCACAT
 AGTCTTCCCTGTTCTTGAATCACCTCTACTATGATACTATTATATCTTAAAGGCCGCGCAGCGGCATCAACCCC
 GAAATATGCATCAGCCATTCTTGCATTTCCCTCAGGAACGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCA
 TGGATCAGGTGGCCTCTGAAATATCTTTTGAGCATTGTTCAAAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGG
 TTGTTCTTCCCTTCAATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACGCCTTGGCATATGAGTCGTTAGC
 TGTCTGTTGACCTCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATCTGGAATTCTCCCATTCAATTGTGTCTCCGTCTTGTCTC
 GACGTAGGACTTGACGTCGGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGGGGA
 TACCAGGTCGAATAATCTGATATTTGTGATCTGAACTTTTCTTTCGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGATGAGGTTG
 CCCATCTTCGTGTAGCTCTCTGGCAATTTTAATATATTTTTTATTAGATGAAAGTTGTATTCTTTGAATTTGCTC
 AAGAGCTTCTTCTTTTGAAGAGAACACTGAGGATATGTAAGAAATATGTTTTTTGCTTGAATACGAAATCTTTT
 AGTAGGAGGCAT

D_n-DNA [9e]

TGTAATCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATATATATATATTAGTACAAC
 TTCATAAGGGCCATCCGTTA[TAATATTAC]CGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAAACGTGACACGTG
 GAAGGGGACTGTTGAATGATAAAAAAATGGGCACCCAATCAAAACTTGACACGTGGAAGGGGACTGTTGAATGAT
 GTGACGTTTTTTGAGCGGGAAACTTCTGAAGAAGATTCTGCGGGAAACTTCTGAAGAAGATTCTTTTCAGATA
 AGATTTGTTGACTGGTCAAAAGAAGGGGACAACCTTTATTAAGTAACCTTTACTTTAGTAAAAGTAAAGTAAGTGT
 GCCCCACAGGAAACTTGCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTGTTTTATATACGTTATTTTTACATGTATATGTAAT
 TATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTATTCTACTGCAATCAGGTACGA
 ACTTTTTATGGGACCTTTTCAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTTCTAGCAGTATCGACCAGTTGT
 TTCTTAAGGTACAACAGGTGGTGTATACTAGGTATCCATCAAGAGATAGGGTTTTGGTAAATTTGAACATGAGGACT
 ATTTGGAAGACACCGGTGGTGGGAAGTATGAAGACGTGAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTTGTTGTTAATGAT
 AATACGGATAATACTAATATGTATGCCACATTATTTGGCAATTGTAGATGCTATTTTTATTAATAATATTTATTA
 TTAATAATGAAATTAGTACAAGTTCATTGCAACACTCTGGTCTGAATTACACTTGATACAAAAGTAAATTTCTTC
 ATACAGGACATGATTTAAACCTCTAATTACATTATTAATACAAATTAACCTAGATTATCCATAGTCTTCCCTGT
 TCTTGAATCACCTCTACTATGATACTATTATATCTTAAATGCCGCGCAGCGGCATCAACCCGAAATATGCATC
 AGCCCATCTTGCATTTCCCTCAGGAACGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTGG
 CCTCTGAAATATCTTTTGAGCATTGTTCAAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTCTTCTT
 CAATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTTAAAGCCTTGGCATATGAGTGTCTGTTGACC
 TCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATCTGGAATTCTCCCATTCAATTGTGTCTCCGTCTTGTCTCGAGTGGACTT
 GACGTCGGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGGGGATAACCAGGTCGAA
 TAATCTGATATTTGTGATCTGAACTTTTCTTTCGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGATGAGGTTGCCCATCTTCGTG
 TAGCTCTCTGGCAATTTTAATATATTTTTTATTAGATGAAAGTTGTATTCTTTGAATTTGCTCAAGAGCTTCTTC
 TTTTGAAGAGAACACTGAGGATATGTAAGAAATATGTTTTTTGCTTGAATACGAAATCTTTTAGTAGGAGGCAT

D_n-DNA [9f] (Del1F1, Del1R1, Del2F, Del2R)

TGTAATCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATATATTAGTACAAC
 TTCATAAGGGCCATCCGTTA[TAATATTAC]CGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAAACGTGACACGTG
 GAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTTGAGCGGGAAACTTCTGAAGAAGATTCTGCGGGAAACTTCTTG
 AAGAAGATTCTTTTCAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAAGAAGGGGACAACCTTTATTAAGTAACCTTTACTTT
 AGTAAAAGTAAAGTAAGTGGCCCCACAGGAAACTTGCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTGTTTTATATACGTTA
 TTTTTACATGTATATGTAATTATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTAT
 TCTACTGCAATCAGGTACGAACCTTTTATGGGACCTTTTCAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTTC
 TAGCAGTATCGACCAGTTGTTTTCTTAAGGTACAACAGGTGGTGTATACTAGGTATCCATCAAGAGATAGGGTAAT
 TTGAACATGAGGACTATTTGGAAAGACACCGGTGGTGGGAAGTATGAAGACGTGAAGGAGAATGCTTTACTCTAT
 GTTGTGTTGTTAATGATAATACGGATAATACTAATATGTATGCCACATTATTTGGCAATTGTAGATGCTATTTTTAT
 TAATAATATTTATTATTAATAATGAAATTAGTACAAGTTCATTGCAACACTCTGGTCTGAATTACACTTGATAC
 AAAAGTAAATTTCTTCATACAGGACATGATTTAAACCTCTAATTACATTATTAATACAAATTAACCTAGATTATC
 CATAGTCTTCCCTGTTCTTGAATCACCTCTACTATGATACTATTATATCTTAAATGCCGCGCAGCGGCATCAAC
 CCCGAAATATGCATCAGCCATTCTTGCATTTCCCTCAGGAACGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGT
 CCATGGATCAGGTGGCCTCTGAAATATCTTTTGGCATTGTTCAAAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTT

TGGTTGTTCTTCCTTCAATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAAGCCTTGGCATATGAGTCGTT
 AGCTGTCTGTTGACCTCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATCTGGAATTCTCCCCATTCAATTGTGTCTCCGTCCTT
 GTCGACGTAGGACTTGACGTCGGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGG
 GGATAACCAGGTGCAATAATCTGATATTTGTGATCTGAACTTTTCTTCGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGATGAGG
 TTGCCCATCTTCGTGTAGCTCTCTGGCAATTTTAATATATTTTTTTATTAGATGAAAGTTGTATTCTTTGAATTTG
 CCAAGAGCTTCTTCTTTTGAAGAGAACACTGAGGATATGTAAGAAATATGTTTTTGTCTGAATACGAAATCT
 TTTAGTAGGAGGCAT

5.1.4 Pflanze 11 (Linie 84124T, Pflanze 4, Experiment 2)

D_n-DNA [11]

TTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATACCTAGTACAAC
 TTCATAAGGGCCATCCGTTAATAATATTACCGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAACGTCGACACGTG
 GAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTGGAGCGGAAACTTCTGAAGAAGATTCTGCGGGAAACTTCTTG
 AAGAAGATTCCTTTCAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAGAAGGGGACAACCTTATTAAGTAACCTTACTTT
 AGTAAAAGTAAAGTAAAGTGGCCCCACAGGAAACTTGTCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTGTTTTATATACGTTA
 TTTTACATGTATATGTAATTATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTACTTATCGTATTCGA
 AGAGATATGAACGAGAGGTTTTATTGGAAGAAGAAATGGAGAAGTCAATTTGATGTCTACTGGTACTGGATATGGA
 GGAAGGAGACTTACAAGGCTCCTTCAATGCCAAATTACAAGAAACCGATGAATATCAATGTGCGCAATTTGAAC
 ATGAGGACTATTTGGAAAGACACCGGTGGTGGGAAGTATGAAGACGTGAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTTGTT
 GTTAATGATAATACGGATAATACTAATATGTATGCCACATTATTTGGCAATTGTAGATGCTATTTTTTATTAATAA
 TATTTATTATTAATAATGAAATTAGTACAAGTTCATTGCAACACTCTGGTTCTGAATTACACTTGATACAAAAGT
 AAATTCCTCATAACAGGACATGATTTAAACCTCTAATTACATTATTAATACAAATTAACCTAGATTATCCACCTC
 TACTATGATACTATTATATCTTAAAGGCCGCGCAGCGGCATCAACCCCGAAATATGCATCAGCCATCTTTGCAT
 TTCCTCAGGAACGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTGGCTCTGAAATATCTT
 TTGAGCATTGTTCAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTCTTCTTCAATATTTGAAGTGC
 TTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACGCTTGGCATATGAGTCGTTAGCTGTCTGTTGACCTCCTCTAGCACTTCT
 ACCGTCGATCTGGAATTCTCCCCATTCAATTGTGTCTCCGTCCTTGTGACGTAGGACTTGACGTCGGAGCTGGA
 TTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGGGGATACCAGGTGCAATAATCTGATATTTGT
 GATCTGAACTTTTCTTCGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGATGAGGTTGCCCATCTTCGTGTAGCTCTCTGGCAAT
 TTTAATATATTTTTTTATTAGATGAAAGTTGTATTCTTTGAATTTGCTCAAGAGCTTCTTCTTTTGAAGAGAAAC
 CTGAGGATATGTAAGAAATATGTTTTTGTCTGAATACGAAATCTTTTAGTAGGAGGCAT

5.1.5 Pflanze 17 (Linie 84111K, Pflanze 8, Experiment 2)

D_n-DNA [17a] (Del1F1, Del1F2, Del1F3, Del2F, Del2R, 17a_P1)

TTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATACCTAGTACAAC
 TTCATAAGGGCCATCCGTTAATAATATTACCGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAACGTCGACACGTG
 GAAGTTACCGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAACGTCGACACGTGGAAAAGGGGACTGTTGAATGAT
 GTGACGTTTTTGGAGCGGAAACTTCTGAAGAAGATTCTGCGGGAAACTTCTGAAGAAGATTCTTTCAGATA
 AGATTTGTTGACTGGTCAAAGAAGGGGACAACCTTATTAAGTAACCTTACTTTAGTAAAAGTAAAGTAAAGTGG
 GCCCCACAGGAAACTTGTCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTGTTTTATATACGTTATTTTTACATGTATATGTAAT
 TATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTATTCTACTGCAATCAGGTACGA
 ACTTTTATGGGACCTTTCAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTCTAGCAGTATCGACCAGTTGT
 TTCTTAAGGTACAACAGGTGGTGTATACTAGGTATCCATCAAGAGATAGGGTCTCTGACCCTAGAAGAAGCGGAG
 GTCTTTTCGTCATTTCCAGAAGGAAGTGAAGAAGCTACTGAGGTGTAAGGTTAATTTTTCATAGGAAGTGTTCGTTG
 TATGAGGAAATATACAAGAAATACGTATACAATGTCCCAGAAAAGAAAGGTGAATCCTCAAAGTGCCTGGCCGAA
 GAAGAGGAGGACTAGTACGACTTTCGAGGAAATACCAATGGAGGAGACCTGTGACAAAAACAGGACTCTGAAGTT
 AAAGATGTATGATGATATGTTGGGTGCTGGTGGTATAGGATCTACCATTAGTAATAATGGTATGATTACTATGTT
 GAATAATTATGTCCAGGGTATTGGTGATAGTCAGAGAGCGAAGAAGCTTACTGTGACGAAGCATTTGAAGTTTGA
 TATGGCTCTTATGGGAGTCTCAGTCTGGGAGACTCCTATTATATGACCCAATATCAATTGGATTATCATAGA
 CAAGGATTTGGGTGAGTTTTCTACTAAGTTATCGAGTATATTTGATATTTCCGATAAATCAACCGTCAAGGCTATGCC
 GTCTACTTATCGTATCGAAGAGATATGAACGAGAGGTTTATTTGGGAAGAAGAAATGGAGAAGTCAATTTGATGTC
 TACTGGTACTGGATATGGAGGGAAGGAGACTTACAAGGCTCCTTCAATGCCAAATTACAAGAAACCGATGAATAT
 CAATGTGCGCAATTTGAACATGAGGACTATTTGGAAAGACACCGGTGGTGGGAAGTATGAAGACGTGAAGGAGAA
 TGCTTTACTCTATGTTGTTGTTAATGATAAATACGGATAATACTAATATGTATGCCACATTATTTGGCAATTGTAG
 ATGCTATTTTTTATTAATAATATTTATTATTAATAATGAAATTAGTACAAGTTCATTGCAACACTCTGGTCTGAA

TTACACTTGATACAAAAGTAAATTCTTCATACAGGACATGATTTAAACCTCTAATTACATTATTAATACAGACTA
 TGTGGGCTAGATCTTTAGGGGCCACAATTACATCACAGGGCACTTAGATTTTAGCCCTAGAACGTATTATGATG
 TAGTGGAAACAACGTCATACTGGATATGGAGGGAAGGAGACTTACAAGGCTCCTTCAATGCCAAATTACAAGAA
 ACCGATGAATATCAATGTGCGCAATTTGAACATGAGGACTATTTGGAAAGACACCGGTGGTGGGAAAGTATGAAGA
 CGTGAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTTGTTGTTAATGATAATACGGATAATACTAATATGTATGCCACATTATT
 TGGCAATTGTAGATGCTATTTTTATTAATAATATTTATTATTAATAATGAAATTAGTACAAGTTCATTGCAACAC
 TCTGGTTCTGAATTACACTTGATACAAAAGTAAATTCTTCATACAGGACATGATTTAAACCTCTAATTACATTAT
 TAATACAAATTAACCTAGATTATCCAAGTAAATTCTTGAATCACCCCTCTACTATGATACTATTATATCTTAAAG
 GCCGCGCAGCGGCATCAACCCCCGAAATATGCATCAGCCCATCTTGCATTTCCCTCAGGAACGTTTGTGAATGAGG
 ACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTGGCCTCTGAAATATCTTTTGAGCATTGTTCAAAAAGATTGTGAT
 GTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTCTTCCCTTCAATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACG
 CCTTGGCATATGAGTCGTTAGCTGTCTGTTGACCTCCTCTAGCACTTCTACCGTTCGATCTGGAATTTCTCCCCATT
 CAATTGTGTCTCCGTCCTTGTGCGACGTAGGACTTGACGTGCGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGA
 AATGTGCTGACCTGGTTGGGGATACCAGGTGCAATAATCTGATATTTGTGATCTGAACTTTTCTTCGAGTTGAA
 GCAGGACGTGGAGATGAGGTTGCCCATCTTCGTGTAGCTCTCTGGCAATTTAATATATTTTTATTAGATGAAA
 GTTGTATTCTTTGAATTTGCTCAAGAGCTTCTTCTTTTGAAGAGAACACTGAGGATATGTAAGAAATATGTTTG
 TTGCTTGAATACGAAATCTTTTAGTAGGAGGCAT

D_n-DNA [17b] (Del1F1, Del1R1, Del2F, Del2R)

TGTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATATAGTACAAC
 TTCATAAGGGCCATCCGTTATAATATTACCGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAACGTTGACACGTG
 GAAGGGGACTGTTGAATGATTTGACGTTTTTGGAGCGGGAAACTTCTGAAAGAAGATTCTGCGGGAAACTTCTTG
 AAGAAGATTCTTTTTCAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAAAGAAGGGGACAACCTTTATTAAAAGTAACTTTACTTT
 AGTAAAAGTAAAGTAAGTGGGCCCCACAGGAAACTTGTCTAGCAAGTTTTGAATTATGTCGTTTTATATACGTTA
 TTTTTACATGTATATGTAATTATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTAT
 TCTACTGCAATCAGGTACGAACTTTTATGGGACCTTTTTCAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTTC
 TAGCAGTATCGACCAGTTGTTTTCTTAAGGTACAACAGGTGGTGTATACTAGGTATCCATCAAGAGATAGGGTCTC
 TGACCCTAGAAGAAGGCGAGGTCTTTTCGTCAATTTCCAGAAGGAAGTGAAGAAGCTACTGAGGTGTAAGTTAATT
 TTCATAGGAAGTGTTCGTTGTATGAGGAAATATACAAGAAATACGTATAACAATGTCCCAGAAAAGAAAGTGAAT
 CCTCAAAGTGCCTGGCCGAAGAAGAGGAGGACTAGTACGACTTCGAGGAAATACCAATGGAGGAGACCTGTGACA
 AAAACAGGACTCTGAAGTTAAAGATGTATGATGATATGTTGGGTGCTGGTGGTATAGGATCTACCATTAGTAAT
 AATGGTATGATTACTATGTTGAATAATTATGTCCAGGGTATTGGTGATAGTCAGAGAGCGAAGAACGTTACTGTG
 ACGAAGCATTGGAAGTTTGTATATGGCTCTTATGGGGAGTTCTCAGTTCTGGGAGACTCCTAATATATGACCCAA
 TATCATTGGATTATCATAGACAAGGATGTTGGGTGAGTGTTCCTACTAAGTTATCGAGTATATTTGATATTTCCC
 GATAACGGTCAGGCTATGCCGCTACTTATCGTATTCGAAGAGATATGAACGAGAGGTTTATTTGGAAGAAGAAA
 TGGAGAACTCATTGATGTCTACTGGTACTGGATATGGAGGGAAGGAGACTTACAAGGCTCCTTCAATGCCAAAT
 TACAAGAACCAGTGAATATCAATGTGCGCAATTTGAACATGAGGACTATTTGGAAAGACACCGGTGGTGGGAAG
 TATGAAGACGTGAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTTGTTGTTAATGATAATACGGATAATACTAATATGTATGCC
 ACATTATTTGGCAATTGTAGATGCTATTTTTATTAATAATATTTATTATTAATAATGAAATTAGTACAAGTTCAT
 TGCAACACTCTGGTTCTGAATTACACTTGATACAAAAGTAAATTCTTCATACAGGACATGATTTAAACCTCTAAT
 TACATTATTAATACAAATTAACCTAGATTATCCAAGTATATCTCTAGTCTCTTTTTCAAGACCTTCAAGAAACG
 GGGTCCAGTCAATATCCTGTTTCGATCCAGTTATCGTCAGCTCTATCCAGCACTTGTGAAGATTCAACGCTCTCCG
 GAGGTTGTAGTTGAATCTGATTTGTATCTTACCCTTTCATCATAATACGTTCTAGGGCTAAAATCTAAGTGCCC
 TGTGATGTAATTGTGGGCCCTAAAGATCTAGCCACATAGTCTTCCCTGTTCTTGAATCACCCCTCTACTATGAT
 ACTATTATATCTTAAAGGCCGCGCAGCGGCATCAACCCCCGAAATATGCATCAGCCCATCTTGCATTTCCCTCAGG
 AACGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTGGCCTCTGAAATATCTTTTGTGACATT
 GTTCAAAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTCTTCCCTTCAATATTTGAAGTGTGGTCAAG
 AGAAGTTGCGTTTAAACGCCTTGGCATATGAGTCGTTAGCTGTCTGTTGACCTCCTCTAGCACTTCTACCGTTCGAT
 CTGGAATTTCTCCCCATTCAATTTGTGTCTCCGTCCTTGTGCGACGTAGGACTTGACGTGCGGAGCTGGATTTAGCTCT
 CTGAATGTTTGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGGGGATACCAGGTGCAATAATCTGATATTTGTGATCTGAAC
 TTTTCTTCGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGATGAGGTTGCCCATCTTCGTGTAGCTCTCTGGCAATTTAATATA
 TTTTTATTAGATGAAAGTTGTATTCTTTGAATTTGCTCAAGAGCTTCTTCTTTTGAAGAGAACACTGAGGATA
 TGTAAAGAAATATGTTTTTTGCTTGAATACGAAATCTTTTAGTAGGAGGCAT

D_n-DNA [17c.1] (Del1F1, Del1R1)

GGTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATATATAGTACAAC
 TTCATAAGGGCCATCCGTTATAATATTACCGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAACGTTGACACGTG
 GAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTGGAGCGGGAAACTTCTGAAAGAAGATTCTGCGGGAAACTTCTTG
 AAGAAGATTCTTTTTCAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAAAGAAGGGGACAACCTTTATTAAAAGTAACTTTACTTT

AGTAAAAGTAAAGTAAAGTGTGCCCCACAGGAACTTGCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTCGTTTTATATACGTTA
TTTTTACATGTATATGTAATTATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTAT
TCTACTGCAATCAGGTACGAACCTTTTATGGGACCTTTTACAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTTC
TAGGGGAAGGAGACTTACAAGGCTCCTTCAATGCCAAATTACAAGAAACCGATGAATATCAATGTGCGCAATTTG
AACATGAGGACTATTTGGAAAGACACCGGTGGTGGGAAGTATGAAGACGTGAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTT
GTTGTTAATGATAATACGGATAATACTAATATGTATGCCACATTATTTGGCAATTGTAGATGCTATTTTTATTAA
TAATATTTATTATTAATAATGAAATTAGTACAAGTTCATTGCAACACTTTGGTTCTGAATTACACTTGATACAAA
AGTAAATTCCTTCATACAGGACATGATTTAAACCTCTAATTACATTATTAATACAAAATTAACCTAGATTATCCAA
GTAAATTCTTGAATCACCTCTACTATGATACTATTATATCTTAAATGCCGCGCAGCGGCATCAACCCCGAAATA
TGCATCAGCCCATTCTTGCATTTCCCTCAGGAACGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATC
AGGTGGCCTCTGAAATATCTTTTGAGCATTGTTCAAAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTT
TTCCTTCAATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACGCCTTGGCATATGAGTCGTTAGCTGTCTG
TTGACCTCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATCTGGAATTCTCCCATTCAATTGTGTCTCCGTCCTTGTGCGACGTA
GGACTTGACGTCGGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGGGGATACCAG
GTCGAATAATCTGATATTTGTGATCTGAACTTTTCTTCGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGATGAGGTTGCCATC
TTCGTGTAGCTCTCTGGCAATTTTAATATATTTTTTATTAGATGAAAGTTGTATTCTTTGAATTTGCTCAAGAGC
TTCTTCTTTTGAAGAGAACACTGAGGATATGTAAGAAATATGTTTTTTGCTTGAATACGAAATCTTTTAGTAGG
AGGCAT

D_n-DNA [17c.2] (Del1F1, Del1R1)

GGTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATATATTAGTACAAC
TTCATAAGGGCCATCCGTTA[TAATATTAC]CGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAAACGTGACACGTG
GAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTTGAGCGGGAACTTCTGAAGAAGATTCTGCGGGAACTTCTTG
AAGAAGATTCTTTTACAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAAAGAAGGGGACAACCTTTATTTAAAGTAACTTTACTTT
AGTAAAAGTAAAGTAAAGTGTGCCCCACAGGAACTTGCTCAGCAAGTTTGAATTATGTCGTTTTATATACGTTA
TTTTTACATGTATATGTAATTATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTAT
TCTACTGCAATCAGGTACGAACCTTTTATGGGACCTTTTACAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTTC
TAGGGGAAGGAGACTTACAAGGCTCCTTCAATGCCAAATTACAAGAAACCGATGAATATCAATGTGCGCAATTTG
AACATGAGGACTATTTGGAAAGACACCGGTGGTGGGAAGTATGAAGACGTGAAGGAGAATGCTTTACTCTATGTT
GTTGTTAATGATAATACGGATAATACTAATATGTATGCCACATTATTTGGCAATTGTAGATGCTATTTTTATTAA
TAATATTTATTATTAATAATGAAATTAGTACAAGTTCATTGCAACACTTTGGTTCTGAATTACACTTGATACAAA
AGTAAATTCCTTCATACAGGACATGATTTAAACCTCTAATTACATTATTAATACAAAATTAACCTAGATTATCCAA
GTAAATTCTTGAATCACCTCTACTATGATACTATTATATCTTAAATGCCGCGCAGCGGCATCAACCCCGAAATA
TGCATCAGCCCATTCTTGCATTTCCCTCAGGAACGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATC
AGGTGGCCTCTGAAATATCTTTTGAGCATTGTTCAAAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTT
TTCCTTCAATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACGCCTTGGCATATGAGTCGTTAGCTGTCTG
TTGACCTCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATCTGGAATTTCTCCCATTCAATTGTGTCCTCCGTCCTTGTGCGACGTA
GGACTTGACGTCGGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGGGGATACCAG
GTCGAATAATCTGATATTTGTGATCTGAACTTTTCTTCGAGTTGAAGCAGGACGTGGAGATGAGGTTGCCATC
TTCGTGTAGCTCTCTGGCAATTTTAATATATTTTTTATTAGATGAAAGTTGTATTCTTTGAATTTGCTCAAGAGC
TTCTTCTTTTGAAGAGAACACTGAGGATATGTAAGAAATATGTTTTTTGCTTGAATACGAAATCTTTTAGTAGG
AGGCAT

D_n-DNA [17d]

TGTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATATATTAGTACAAC
TTCATAAGGGCCATCCGTTA[TAATATTAC]CGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAAACGTGACACGTG
GAAGTTACCGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAAACGTGACACGTGGAAGGGGACTGTTGAATGATG
TGACGTTTTTTGAGCGGGAACTTCTGAAGAAGATTCTGCGGGAACTTCTGAAGAAGATTCTTTTACAGATAA
GATTTGTTGACTGGTCAAAAAGAAGGGGACAACCTTTATTTAAAGTAACTTTACTTTAGTAAAAGTAAAGTAAAGTGG
CCCCACAGGAACTTGCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTCGTTTTTATATACGTTATTTTTTACATGTATATGTAATT
ATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTATTCTACTGCAATCAGGTACGAA
CTTTTATGGGACCTTTTACAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTTCTAGCAGTATCGACCAGTTGTT
TCTTAAGGTACAACAGGTGGTGTATACTAGGTATCCATAGTCTTGAAGGAGACTAGAGATTTACTTTGGATAAT
CTAGGTTTAAATTTGATTAATAATGTAATTAGAGGTTTAAATCATGTCTGTATGAAGAATTTACTTTTGTATCA
AGTGAATTCAGAACCAAGTGTGCAATGAACTTGACTAATTTCAATTATTAATAATAAATATTTAATAAAAA
ATAGCATCTACAATTGCCAATAATGTGGCATAACATATTAGTATTATCCGTATTATCATTAACAACAACATGGTG
TATACTAGGTATCCATAGTCTTCCCTGTTCTTGAATCACCTCTACTATGATACTATTATATCTTAAATGCCGCG
CAGCGGCATCAACCCCGAAATATGCATCAGCCCATTCTTGCATTTCCCTCAGGAACGTTTGTGAATGAGGACAGAG
GAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTGGCCTCTGAAATATCTTTTGAGCATTGTTCAAAAAGATTGTGATGTTGAA

GG AAGTAATCCTTTGGTTGTTCTTCCCTTCAATATTTGAAGTGCTTGGTCAAGAGAAGTTGCGTTTAAACGCCTTGG
CATATGAGTCGTTAGCTGTCTGTTGACCTCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATCTGGAATTTCTCCCCATTCAATTTG
TGTCTCCGTCCTTGTGACGCTAGGACTTGACGTCGGAGCTGGATTTAGCTCTCTGAATGTTTGGATGGAAATGTG
CTGACCTGGTTGGGGATACCAGGTCGAATAATCTTTTAGTAGGAGGCAT

D_n-DNA [17e]

TGTACTCCGCTGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATATATTAGTACAAC
TTCATAAGGGCCATCCGTTA[TAATATTAC]CGGATGGCCCGAAAAAATGGGC[CCCAATCAAACGTCACACGTG
GAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTGGAGCGGGAAACTTCTGAAGAAGATTCCTGCGGGAAACTTCTG
AAGAAGATTCCTTTAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAGAAGGGGACAACCTTATTAAGTAACCTTACTTT
AGTAAAAGTAAAGTAAGTGTGCCCCACAGGAAACTTGCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTCGTTTTATATACGTTA
TTTTTACATGTATATGTAATTATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTAT
TCTACTGCAATCAGGTACGAACCTTTTATGGGACCTTTTACAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTC
TAGCAGTATCGACCAGTTGTTTTCTTAAGGTACAACAGGTGGTGTATACTAGGTATCCATAGTCTTGAAAAAGAGA
**CTAGAGATATACTTTGGATAATCTAGGTTTAAATTTGTATTAATAATGTAATTAGAGGTTTAAATCATGTCTGTAT
GAAGAATTTACTTTTTGTATCAAGTGAATTCAGAACCAGAGTGTGCAATGAACTTGACTAATTTTCAATTATTA
ATAATAAATATTATTAATAAAAAATAGCATCTACAATTGCCAAATAATGTGGCATAACATATTAGTATTATCCGTAT
TATCATTAACAACAACATGGTGTATACTAGGTATC**CATAGTCTTCCCTGTTCTTGAATCACCTCTACTATGATA
CTATTATATCTTAAATGGCCGCGCAGCGGCATCAACCCCGAAATATGCATCAGCCCATCTTGCATTTCTCAGGA
ACGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTGGCCTCTGAAATATCTTTTGAGCATTG
TTCAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTCTTCCCTTCAATATTTGAAGTGTCTGGTCAAGA
GAAGTTGCGTTTTAACGCCTTGGCATATGAGTCGTTAGCTGTCTGTTGACCTCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATC
TGGAATTCTCCCCATTCAATTGTGTCTCCGTCCTTGTGACGCTAGGACTTGACGTCGGAGCTGGATTTAGCTCTC
TGAATGTTTGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTTGATACGAAATCTTTTAGTAGGAGGCAT

D_n-DNA [17f]

TGTACTCCGCTGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATATACTAGTACAAC
TTCATAAGGGCCATCCGTTA[TAATATTAC]CGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAACGTCACACGTG
GAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTGGAGCGGGAAACTTCTGAAGAAGATTCCTGCGGGAAACTTCTG
AAGAAGATTCCTTTAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAGAAGGGGACAACCTTATTAAGTAACCTTACTTT
AGTAAAAGTAAAGTAAGTGTGCCCCACAGGAAACTTGCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTCGTTTTATATACGTTA
TTTTTACATGTATATGTAATTATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTAT
TCTACTGCAATCAGGTACGAACCTTTTATGGGACCTTTTACAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTC
TAGCAGTATCGACCAGTTGTTTTCTTAAGGTACAACAGGTGGTGTATACTAGGTATCCATAGTCTTGAAAAAGAGA
**CTAGAGATATACTTTGGATAATCTAGGTTTAAATTTGTATTAATAATGTAATTAGAGGTTTAAATCATGTCTGTAT
GAAGAATTTACTTTTTGTATCAAGTGAATTCAGAACCAGAGTGTGCAATGAACTTGACTAATTTTCAATTATTA
TAATAAATATTATTAATAAAAAATAGCATCTACAATTGCCAAATAATGTGGCATAACATATTAGTATTATCCGTAT
ATCATTAACAACAACATGGTGTATACTAGGTATC**CATAGTCTTCCCTGTTCTTGAATCACCTCTACTATGATA
TATTATATCTTAAATGGCCGCGCAGCGGCATCAACCCCGAAATATGCATCAGCCCATCTTGCATTTCTCAGGAA
CGTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTGGCCTCTGAAATATCTTTTGAGCATTGT
TCAAAGATTGTGATGTTGAAGGAAGTAATCCTTTGGTTGTTCTTCCCTTCAATATTTGAAGTGTCTGGTCAAGAG
AAGTTGCGTTTTAACGCCTTGGCATATGAGTCGTTAGCTGTCTGTTGACCTCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATCT
GGAATTCTCCCCATTCAATTGTGTCTCCGTCCTTGGTTGATACGAAATCTTTTAGTAGGAGGCAT

5.2 Sequenz der transgenen D₀-DNA

TGTACTCCGATGACGTGGCTTAGCATATTAACATATCTATTGGAGTATTGGAGTATTATATATATATTAGTACAAC
TTCATAAGGGCCATCCGTTA[TAATATTAC]CGGATGGCCCGAAAAAATGGGCACCCAATCAAACGTCACACGTG
GAAGGGGACTGTTGAATGATGTGACGTTTTTGGAGCGGGAAACTTCTGAAGAAGATTCCTGCGGGAAACTTCTG
AAGAAGATTCCTTTAGATAAGATTTGTTGACTGGTCAAAGAAGGGGACAACCTTATTAAGTAACCTTACTTT
AGTAAAAGTAAAGTAAGTGTGCCCCACAGGAAACTTGCTCAGCAAGTTTTGAATTATGTCGTTTTATATACGTTA
TTTTTACATGTATATGTAATTATAAATGATGGTCTGTCTACCAGACTGGTTATTTTTGCTATTTATCTTCAGTAT
TCTACTGCAATCAGGTACGAACCTTTTATGGGACCTTTTACAGAGTGGATCAATTTCCAGACAATTATCCAGCCTTC
TAGCAGTATCGACCAGTTGTTTTCTTAAGGTACAACAGGTGGTGTATACTAGGTATCCATAGTCTTCCCTGTTCTT
GAATCACCTCTACTATGATACTATTATATCTTAAATGGCCGCGCAGCGGCATCAACCCCGAAATATGCATCAGCC
CATTCTTGCATTTCTCAGGAACGTTTTGTGAATGAGGACAGAGGAAATAGTGGAGTCCATGGATCAGGTGGCCTC


```

      .....| .....| .....| .....|
      570      580      590      600
BCTV-A[Cal] AGGTGGTGTGTA TACTAGGTAT CCATCAAGAG ATAGGGTCTC
D0-DNA erw. AGGTGGTGTGTA TACTAGGTAT CCAT.....
D0-DNA 3wpai AGGTGGTGTGTA TACTAGGTAT CCAT.....

```

Die Deletion der D₀-DNA umfasst die Nukleotide 585 bis 2306. Der dazwischen liegende Bereich ist nicht dargestellt.

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      2290      2300      2310      2320      2330      2340      2350
BCTV-A[Cal] TGGGCCCCTA AAGATCTAGC CCACATAGTC TTCCCTGTTC TTGAATCACC CTCTACTATG ATACTATTAT
D0-DNA erw. ....AGTC TTCCCTGTTC TTGAATCACC CTCTACTATG ATACTATTAT
D0-DNA 3wpai ....AGTC TTCCCTGTTC TTGAATCACC CTCTACTATG ATACTATTAT
      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      2360      2370      2380      2390      2400      2410      2420
BCTV-A[Cal] ATCTTAAAGG CCGCGCAGCG GCATCAACCC CGAAATATGC ATCAGCCCAT TCTTGCATTT CCTCAGGAAC
D0-DNA erw. ATCTTAAAGG CCGCGCAGCG GCATCAACCC CGAAATATGC ATCAGCCCAT TCTTGCATTT CCTCAGGAAC
D0-DNA 3wpai ATCTTAAATG CCGCGCAGCG GCATCAACCC CGAAATATGC ATCAGCCCAT TCTTGCATTT CCTCAGGAAC

```

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      2430      2440      2450      2460      2470      2480      2490
BCTV-A[Cal] GTTTGTGAAT GAGGACAGAG GAAATAGTGG AGTCCATGGA TCAGGTGGCC TCTGAAATAT CTTTGTAGCA
D0-DNA erw. GTTTGTGAAT GAGGACAGAG GAAATAGTGG AGTCCATGGA TCAGGTGGCC TCTGAAATAT CTTTGTAGCA
D0-DNA 3wpai GTTTGTGAAT GAGGACAGAG GAAATAGTGG AGTCCATGGA TCAGGTGGCC TCTGAAATAT CTTTGTAGCA

```

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      2500      2510      2520      2530      2540      2550      2560
BCTV-A[Cal] TTGTTCAAAA GATTGTGATG TTGAAGGAAG TAATCCTTTG GTTGTCTTTC CTTCAATATT TGAAGTGCTT
D0-DNA erw. TTGTTCAAAA GATTGTGATG TTGAAGGAAG TAATCCTTTG GTTGTCTTTC CTTCAATATT TGAAGTGCTT
D0-DNA 3wpai TTGTTCAAAA GATTGTGATG TTGAAGGAAG TAATCCTTTG GTTGTCTTTC CTTCAATATT TGAAGTGCTT

```

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      2570      2580      2590      2600      2610      2620      2630
BCTV-A[Cal] GGTC AAGAGA AGTTGCGTTT AACGCCTTGG CATATGAGTC GTTAGCTGTC TGTTGACCTC CTCTAGCACT
D0-DNA erw. GGTC AAGAGA AGTTGCGTTT AACGCCTTGG CATATGAGTC GTTAGCTGTC TGTTGACCTC CTCTAGCACT
D0-DNA 3wpai GGTC AAGAGA AGTTGCGTTT AACGCCTTGG CATATGAGTC GTTAGCTGTC TGTTGACCTC CTCTAGCACT

```

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      2640      2650      2660      2670      2680      2690      2700
BCTV-A[Cal] TCTACCGTCG ATCTGGAATT CTCCCCATTC AATTGTGTCT CCGTCCTTGT CGACGTAGGA CTTGACGTCG
D0-DNA erw. TCTACCGTCG ATCTGGAATT CTCCCCATTC AATTGTGTCT CCGTCCTTGT CGACGTAGGA CTTGACGTCG
D0-DNA 3wpai TCTACCGTCG ATCTGGAATT CTCCCCATTC AATTGTGTCT CCGTCCTTGT CGACGTAGGA CTTGACGTCG

```

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      2710      2720      2730      2740      2750      2760      2770
BCTV-A[Cal] GAGCTGGATT TAGCTCTCTG AATGTTTGGG TGGAAATGTG CTGACCTGGT TGGGGATACC AGGTCAAGTA
D0-DNA erw. GAGCTGGATT TAGCTCTCTG AATGTTTGGG TGGAAATGTG CTGACCTGGT TGGGGATACC AGGTCAAGTA
D0-DNA 3wpai GAGCTGGATT TAGCTCTCTG AATGTTTGGG TGGAAATGTG CTGACCTGGT TGGGGATACC AGGTCAAGTA

```

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      2780      2790      2800      2810      2820      2830      2840
BCTV-A[Cal] ATCTGATATT TGTGATCTGA ACTTTTCCTT CGAGTTGAAG CAGGACGTGG AGATGAGGTT GCCCATCTTC
D0-DNA erw. ATCTGATATT TGTGATCTGA ACTTTTCCTT CGAGTTGAAG CAGGACGTGG AGATGAGGTT GCCCATCTTC
D0-DNA 3wpai ATCTGATATT TGTGATCTGA ACTTTTCCTT CGAGTTGAAG CAGGACGTGG AGATGAGGTT GCCCATCTTC

```

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      2850      2860      2870      2880      2890      2900      2910
BCTV-A[Cal] GTGTAGCTCT CTGGCAATTT TAATATATTT TTTATTAGAT GAAAGTTGTA TTCTTTGAAT TTGCTCAAGA
D0-DNA erw. GTGTAGCTCT CTGGCAATTT TAATATATTT TTTATTAGAT GAAAGTTGTA TTCTTTGAAT TTGCTCAAGA
D0-DNA 3wpai GTGTAGCTCT CTGGCAATTT TAATATATTT TTTATTAGAT GAAAGTTGTA TTCTTTGAAT TTGCTCAAGA

```

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      2920      2930      2940      2950      2960      2970      2980
BCTV-A[Cal] GCTTCTTCTT TTGAAAGAGA ACACTGAGGA TATGTAAGAA ATATGTTTTT TGCTTGAATA CGAAATCTTT
D0-DNA erw. GCTTCTTCTT TTGAAAGAGA ACACTGAGGA TATGTAAGAA ATATGTTTTT TGCTTGAATA CGAAATCTTT
D0-DNA 3wpai GCTTCTTCTT TTGAAAGAGA ACACTGAGGA TATGTAAGAA ATATGTTTTT TGCTTGAATA CGAAATCTTT

```

```

      .....| .....| ...
      2990
BCTV-A[Cal] TAGTAGGAGG CAT
D0-DNA erw. TAGTAGGAGG CAT
D0-DNA 3wpai TAGTAGGAGG CAT

```


6. Dot plot-Analyse der D_n -DNAs (Gesamtdaten)

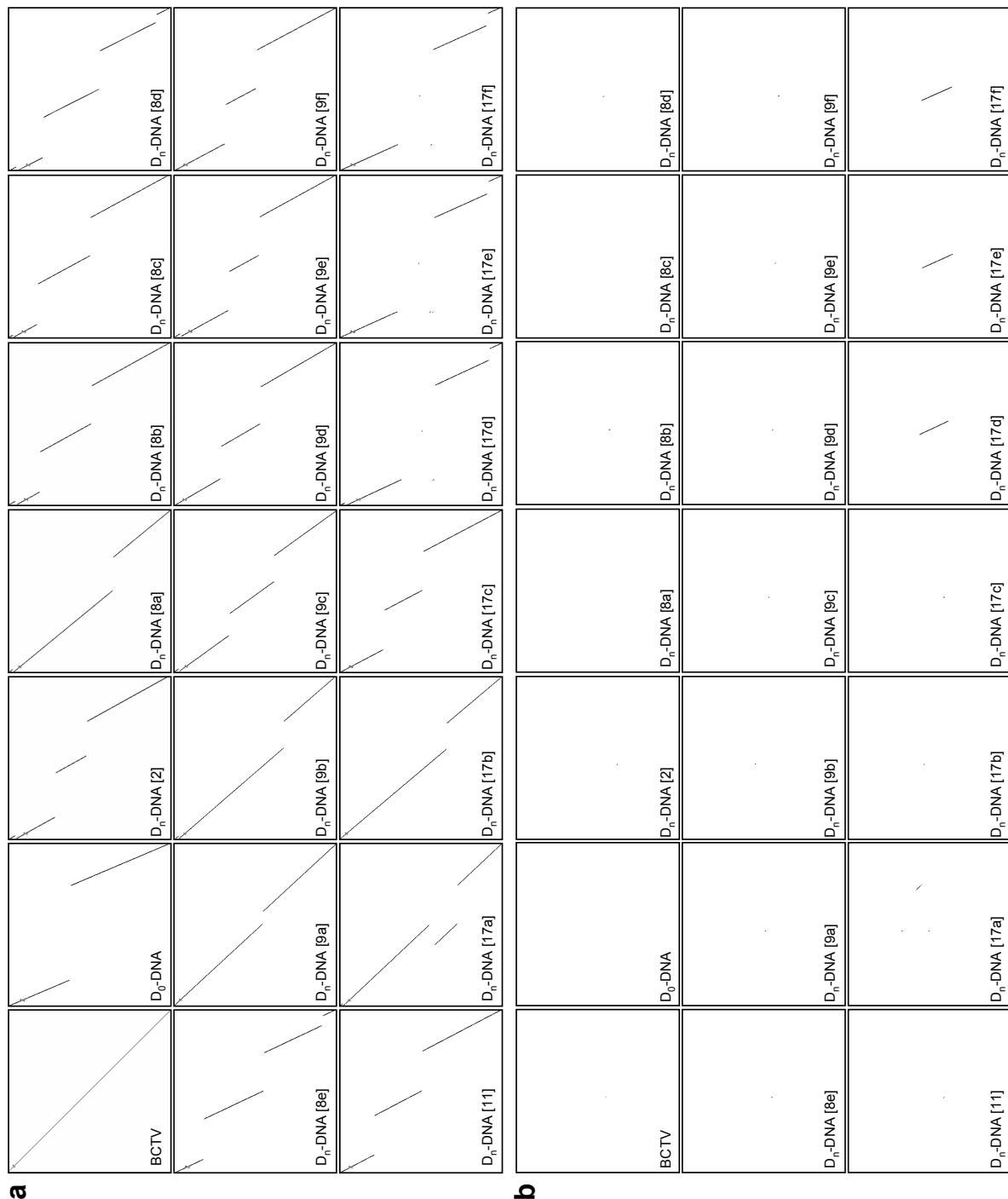


Abbildung 46: Dot plot-Analyse der D_n -DNAs. a: Zur Analyse von Duplikationen wurden die viral orientierten Sequenzen von BCTV (horizontale Achse) und die der D_n -DNAs (vertikale Achse) miteinander verglichen. b: Für die Darstellung von Inversionen wurde die virale Sequenz von BCTV im Vergleich mit der revers komplementären Sequenz der entsprechenden D_n -DNA dargestellt. Die Analysen wurden durchgeführt wie in Abbildung 21 beschrieben. D_n -DNAs [17c.1] und [17c.2] wurden als eine D_n -DNA betrachtet, da sich der sie unterscheidende Nukleotidaustausch nicht auf die hier untersuchten Eigenschaften auswirkte.

7. Während dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen

Posterpräsentationen

Wyant, P.S.; Schäfer, B.; **Horn, J.**; Krenz, B.; Jeske, H., 2009. Diagnosis and characterization of Geminiviruses infecting Bolivian plants based on RCA amplification. 41. Jahrestagung des DPG-Arbeitskreises Viruskrankheiten der Pflanzen und 5th Joint meeting of Dutch and German Plant Virologists in Hamburg (Deutschland).

Öffentliche Vorträge

Horn, J., 2010. The fate of defective DNA in beet curly top virus-infected transgenic sugarbeet. Third meeting of the trilateral project “International reference centre for the genomics and diagnosis of viruses with small circular DNA“ in Málaga (Spanien).

Horn, J.; Lauster, S.; Krenz, B.; Frischmuth, T.; Jeske, H., 2010. The fate of defective DNA in beet curly top virus-infected transgenic sugarbeet. Spring School “RNAi and the World of Small RNA Molecules“ in Wageningen (Niederlande).

Horn, J.; Lauster, S.; Krenz, B.; Frischmuth, T.; Jeske, H., 2010. Defective (interfering) DNA mediated resistance against beet curly top virus in sugarbeet? 23. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen in Dabringhausen (Deutschland).

Horn, J.; Schäfer, B.; Wyant, P.; Krenz, B.; Jeske, H., 2009. DI DNA mediated resistance against beet curly top virus (BCTV) in *Beta vulgaris*. 41. Jahrestagung des DPG-Arbeitskreises Viruskrankheiten der Pflanzen und 5th Joint meeting of Dutch and German Plant Virologists in Hamburg (Deutschland).

Horn, J., 2008. Detection of geminiviruses combining rolling circle amplification and microarray technology. Second meeting of the trilateral project “International reference centre for the genomics and diagnosis of viruses with small circular DNA“ in Gif sur Yvette (Frankreich).

Publikationen

Horn, J., Lauster, S., Krenz, B., Kraus, J., Frischmuth, T. and Jeske, H., 2011. The ambivalent effect of defective DNA in beet curly top virus-infected transgenic sugarbeet plants. *Virus Research* 158, 169-178.

Bach, J., Krenz, B. und Jeske, H. Diversity of defective DNAs derived from beet curly top virus. In Vorbereitung.

X Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Holger Jeske für die Überlassung des Themas der Dissertation, viele konstruktive Diskussionen und hilfreiche Ideen und Ratschläge, die zum Fortgang dieser Arbeit sehr beigetragen haben.

Herrn Priv. Doz. Dr. Thomas Frischmuth möchte ich für die Übernahme des Mitberichtes und sein Interesse an dieser Arbeit danken. Ihm, Frau Dr. Susanne Lauster und Herrn Josef Kraus danke ich außerdem für die Zusammenarbeit an unserer gemeinsamen Publikation.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen möchte ich mich für die gute Atmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Ganz besonders möchte ich den Mitgliedern der RCA-Gruppe für die schöne gemeinsame Zeit danken, an die ich mich gerne erinnern werde:

... Dr. Björn Krenz für die exzellente praktische Betreuung dieser Arbeit, viele wertvolle Tipps, das Korrekturlesen dieser Arbeit und Hilfe bei allen auftretenden Problemen.

... MSc Patricia S. Wyant für Tipps zur Sequenzauswertung, viele fachliche Diskussionen und dafür, dass sie mir während der Doktorarbeit eine teure Wegbegleiterin war. Obrigada!

... Benjamin Schäfer für die Hilfe bei Nukleinsäureisolationen hunderter Zuckerrüben und bei allen anfallenden Labor- oder Computerproblemen.

Ich danke Cornelia Kocher für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie und Sigrid Kober für Tipps und Tricks zum Laborhandwerk.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Kathrin Deuschle für das Korrekturlesen und viele Diskussionen bedanken. Ein großes Dankeschön geht auch an Peter Rau für die hilfreiche C4/AC4-Diskussion.

Unseren Gärtnern Diether Gotthardt, Annika Allinger und Marvin Müller möchte ich für die liebevolle Pflege meiner Zuckerrüben danken.

Ein großer Dank geht auch an unsere Sekretärinnen Bettina Entmooser und Sabine Pfafferott für ihre Hilfe bei bürokratischen Fragestellungen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern Marita und Árpád Horn für ihre Unterstützung, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht hat. Auch meiner Schwester Steffi und meinen Großeltern möchte ich ganz herzlich für ihr Interesse und ihre mentale Unterstützung danken.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Ehemann Andreas Bach für den Rückhalt während der gesamten Studienzzeit und meiner Promotion danken und nicht zuletzt für das geduldige Korrekturlesen.

XI Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsort: Püttlingen (Kreis Saarbrücken)

Geburtstag: 23.10.1982

Schulbildung

1993-2002

Gymnasium am Stadtgarten, Saarlouis

Studium

10/2002-10/2004

Grundstudium der Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes

10/2004

Vordiplom

10/2004-08/2006

Hauptstudium der Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes

01-03/2006

Fortgeschrittenenarbeit am Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie der Universität des Saarlandes mit dem Thema: „*Directed Evolution* an der Pyranose-2-Oxidase P2OxB1H aus *Peniophora gigantea* mit Hilfe der *error prone*-PCR (epPCR)“

08-10/2006

mündliche Diplomprüfungen: Mikrobiologie (Hauptfach); Biochemie und Virologie/Immunologie (Nebenfächer)

10/2006-09/2007

Diplomarbeit am Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie der Universität des Saarlandes mit dem Thema: „Herstellung von 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase (A13G) Enzymvarianten aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5. mit erhöhter Thermostabilität“

09/2007

Abschluss des Studiums durch Erlangung des Diploms

Promotion

seit 12/2007

Wissenschaftliche Angestellte am Biologischen Institut der Universität Stuttgart in der Abteilung Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbst angefertigt habe und nur die aufgeführten Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Stuttgart, den

Judith Bach