

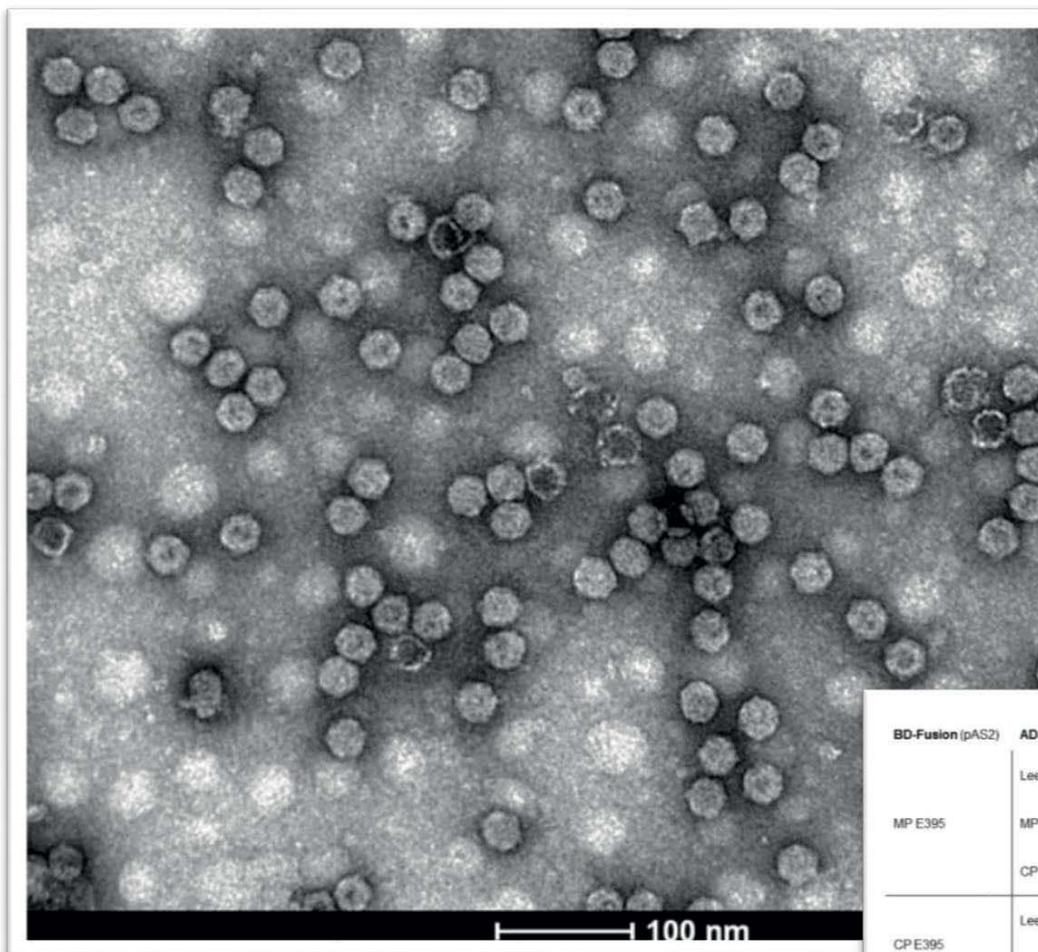
Berliner ökophysiologische und phytomedizinische Schriften



Luise Dierker

**Interaktion des RNA2-kodierten
Transportproteins (MP) des *Cherry
leaf roll virus* (CLRV) mit dem
viralen Hüllprotein (CP) und
pflanzlichen Wirtsfaktoren**

Band 42



BD-Fusion (pAS2)	AD-Fusion (pACT2)	His3	LacZ
	Leerer Vektor	+	● ● ●
MPE395	MPE395	+++	● ● ●
	CPE395	++	● ● ●
CPE395	Leerer Vektor	+	● ● ●
	CPE395	+++	● ● ●



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



**Berliner ökophysiologische
und phytomedizinische Schriften**

Hrsg. von Christian Ulrichs und Carmen Büttner

Lebenswissenschaftliche Fakultät,
Humboldt-Universität zu Berlin

Band 42

Hrsg. von

Dr. Susanne von Barga
Humboldt-Universität zu Berlin





Interaktion des RNA2-kodierten Transportproteins (MP) des *Cherry leaf roll virus* (CLRV) mit dem viralen Hüllprotein (CP) und pflanzlichen Wirtsfaktoren

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum agriculturarum

(Dr. rer. agr.)

eingereicht an der
Lebenswissenschaftlichen Fakultät der
Humboldt-Universität zu Berlin

von
Diplom-Biologin Luise Dierker
geboren am 30.09.1984 in Berlin

Präsidentin
der Humboldt-Universität zu Berlin
Frau Prof. Dr. Dr. Sabine Kunst

Dekan
der Humboldt-Universität zu Berlin
Herr Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachterin/Gutachter

1. Prof. Dr. Carmen Büttner
2. Dr. Thierry Wetzel
3. Dr. Susanne von Barga

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2017



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2017

Zugl.: Berlin, Humboldt-Universität, Diss., 2017

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2017

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2017

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9670-0

eISBN 978-3-7369-8670-1



Man kann Kopfschmerzen nicht dadurch heilen, dass man den Kranken enthauptet.

(Mario Vargas Llosa)





Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Virus-Wirt-Beziehungen.....	1
1.2 Identifizierung von Virus-Virus-/ und Virus-Wirt-Interaktionen mit dem YTHS	2
1.2.1 Grundlagen der systemischen Infektion einer Wirtspflanze	2
1.2.2 Prinzip des YTHS	5
1.2.3 Anwendungsmöglichkeiten des YTHS.....	6
1.3 Das Modellsystem <i>Cherry leaf roll virus Arabidopsis thaliana</i>	7
1.3.1 <i>Cherry leaf roll virus</i>	8
1.3.2 Genomorganisation des CLRV	8
1.3.3 Aus- und Verbreitung des CLRV.....	9
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Chemikalien	12
2.2 Standardpuffer und Lösungen	12
2.3 Größenstandards	12
2.4 Enzyme und Proteine	13
2.5 Oligonukleotide	13
2.6 Viren und Organismen.....	15
2.6.1 CLRV-Isolate und Virusvermehrung	15
2.6.2 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Stämme	16
2.6.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>S. cerevisiae</i>)	16
2.6.4 Pflanzenmaterial und Untersuchungsstandorte	16
2.7 cDNA-Bibliothek, Vektoren und Konstrukte	17
2.7.1 cDNA-Bibliothek von <i>A. thaliana</i>	17
2.7.2 Vektoren und Konstrukte	17
2.8 Arbeit mit <i>E. coli</i>	18
2.8.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	18



2.8.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen	19
2.8.2.1	Chemokompetente <i>E. coli</i> -Standardzellen.....	19
2.8.2.2	Chemokompetente <i>E. coli</i> -Proteinexpressionsstämme.....	19
2.8.2.3	Elektrokompetente <i>E. coli</i> -Zellen	20
2.8.3	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	20
2.8.3.1	Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	20
2.8.3.2	Elektroporation.....	20
2.8.4	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	21
2.8.4.1	Schnellplasmidisolierung	21
2.8.4.2	Plasmidisolierung über Silica-Säulen.....	21
2.9	Molekularbiologische Standardmethoden	21
2.9.1	RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial	21
2.9.1.1	Isolierung mit Silica-Säulen.....	21
2.9.1.2	Nukleinsäureisolierung nach Boom et al. (1990)	22
2.9.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	23
2.9.3	Reverse Transkription.....	23
2.9.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	23
2.9.4.1	PCR mit kommerziellen Polymerasen.....	23
2.9.4.2	Kolonie-PCR mit pTaq-Polymerase	23
2.9.5	Immunocapture-Reverse Transkriptase-PCR (IC-RT-PCR)	24
2.9.6	Agarose-Gelelektrophorese	25
2.9.7	Extraktion von PCR-Amplifikaten aus Agarosegelen	26
2.9.8	Restriktion.....	26
2.9.9	Ligation von PCR-Produkten	26
2.9.10	Sequenzierung.....	26
2.10	Arbeit mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> im Hefe Zwei-Hybrid System	27
2.10.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	27
2.10.2	Herstellung kompetenter Hefezellen und Transformation.....	28
2.10.3	Sequentielle Transformation einer cDNA-Bibliothek	29
2.10.4	Isolierung positiver Hefeklone.....	29
2.10.5	β -Galaktosidase Filtertest (LacZ).....	30
2.10.6	DNA-Isolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	30



2.10.7	Transformation von Plasmiden aus <i>S. cerevisiae</i> in <i>E. coli</i>	31
2.11	Proteinchemische Methoden	31
2.11.1	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	31
2.11.2	Reinigung (His) ₆ fusionierter Proteine.....	31
2.11.3	Aufreinigung von bakteriellen Einschlusskörpern aus <i>E. coli</i>	32
2.11.4	Colorimetrische Proteinbestimmung	33
2.11.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.11.5.1	Probenvorbereitung	33
2.11.5.2	Analytische SDS-PAGE	33
2.11.5.3	Coomassie-Färbung	34
2.12	Serologische Methoden	35
2.12.1	Verwendete Antikörper	35
2.12.2	Elektroblot-Immunoassay (EBIA).....	35
2.12.3	Tissue Print.....	36
2.12.4	<i>Antigen-Coated-Plate-Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay</i> (ACP-ELISA)	37
2.12.5	Protein- <i>Overlay</i> Blot.....	37
2.12.6	Nachweis mit CDP-Star	37
2.12.7	Colorimetrischer Proteinnachweis auf Nitrocellulose-Membranen.....	38
2.13	Sekundärstrukturanalyse	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Charakterisierung der MP-kodierenden Region des CLRV	39
3.1.1	Strukturanalyse der MP-kodierenden Region des CLRV-Isolats E395.....	39
3.1.2	Konstruktion von MP-Deletionsmutanten.....	43
3.1.3	Generierung von Gal4-AD-/BD-Konstrukten der CLRV-Proteine MP und CP für YTH-Analysen	44
3.1.3.1	Kontrolle der Fusionsproteine auf direkte Transkriptionsaktivierung.....	46
3.1.3.2	Etablierung der Positiv- und Negativkontrollen	47
3.1.4	Interaktionsstudie mit den MP-Deletionsmutanten.....	47
3.2	Homo- und Heterodimerisierung CLRV-Proteine MP und CP	50
3.2.1	Homo- und Heterodimerisierung der Volllängenproteine MP und CP des Isolats E395.....	50
3.2.2	Interaktionsstudie mit den Volllängen-MP verschiedener CLRV-Isolate	51



3.3	Interaktion des CLRV-MP E395 mit anderen MP der 30 K Familie	52
3.4	Identifikation potentieller pflanzlicher Interaktionspartner aus <i>A. thaliana</i> Col-1 .	54
3.4.1	Überprüfung der spezifischen Interaktion der GAL4-BD-Fusionsproteine	54
3.4.2	Durchmusterung der cDNA-Bibliothek von <i>A. thaliana</i> Col-1 mit CLRV-Volllängenproteinen.....	55
3.4.3	Durchmusterung der cDNA-Bibliothek von <i>A. thaliana</i> Col-1 mit den MP-Deletionsmutanten $\Delta N1$ und $\Delta C2$	56
3.4.4	Sequenzanalyse der identifizierten pACT2-AD-Plasmide.....	58
3.4.5	Interaktion des CLRV-MP mit dem Protein At-4/1 aus <i>A. thaliana</i>	61
3.5	Heterologe Expression und Aufreinigung des MP von CLRV- E395.....	62
3.5.1	Klonierung des CLRV-MP.....	62
3.5.2	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> und Aufreinigung von rekombinanten CLRV-MP durch Affinitätschromatographie.....	63
3.5.2.1	Native Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose	63
3.5.2.2	Denaturierende Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose.....	66
3.5.2.3	Isolierung bakterieller Einschlusskörper und Renaturierung des MP	67
3.5.3	Bestätigung der MP-CP-Interaktion mittels Protein-Overlay-Blot.....	69
3.6	Herstellung eines Anti-Peptid Antikörpers gegen das CLRV-MP	70
3.6.1	Reaktion des Peptidantikörpers gegen Proteine im ACP-ELISA	71
3.6.2	SDS-PAGE und EBIA	75
3.6.3	Tissue Print.....	76
3.7	Nachweis von 4/1-Orthologen in Wirtspflanzen von CLRV	77
3.7.1	Nachweis mittels degenerierter Oligonukleotide	77
3.7.2	Nachweis mittels At-4/1-spezifischer Antikörper	81
3.8	Lokalisation von CLRV-Partikeln und dem viralen Transportprotein in männlichen und weiblichen Blütenständen von <i>Betula pendula</i>	83
3.8.1	Detektion und Lokalisation von CLRV in Blütenständen im Jahresverlauf.....	83
3.8.1.1	Symptomentwicklung.....	84
3.8.1.2	Molekularer Nachweis von CLRV	85
3.8.1.3	Lokalisation von CLRV-Partikeln mittels Tissue Print	86
3.8.2	Detektion des CLRV-MP in Blütenständen von <i>Betula pendula</i>	89
4	Diskussion	91



5	Zusammenfassung	108
6	Summary	110
7	Literaturverzeichnis.....	112
8	Anhang.....	122



Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
ACP-ELISA	<i>Antigen-coated-plate</i> ELISA
AD	DNA-Aktivierungsdomäne
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BD	DNA-Bindedomäne
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
<i>B. pendula</i>	<i>Betula pendula</i>
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CC	<i>coiled-coil</i> Domäne
cDNA	<i>copy</i> DNA
CDP-Star	Disodium-2-chloro-5-(4-methoxy Spiro[1,2-dioxetan-3,2'-5-chlorotricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}] decan])-4-yl]-1-phenylphosphat
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
cds	<i>coding sequence</i> (kodierende Region)
CLRV	<i>Cherry leaf roll virus</i>
CP	<i>coat protein</i> (Hüllprotein)
CPMV	<i>Cowpea mosaic virus</i>
<i>C. quinoa</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>
DD	<i>Disordered domain</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DO	<i>Dropout</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Gal4	<i>Galactose-responsive transcription factor</i>
GFLV	<i>Grapevine fanleaf virus</i>
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GusA	β -Glucuronidase
xg	Zentrifugalbeschleunigung
H ₂ O _{deion}	deionisiertes Wasser
His/H	Histidin
Hel	Helikase
IB	<i>Inclusion body</i> (bakterielle Einschlusskörper)
IC	<i>Immuncapture</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
Leu/L	Leucin
LacZ	β -Galactosidase
Mbp	Megabasenpaare
MP	<i>movement</i> Protein (Transportprotein)
nt	Nukleotide
<i>N. spp.</i>	<i>Nicotiana</i> spp.
NCBI	<i>National Center for Biotechnology information</i>
ORF	Open-reading frame (Offener Leserahmen)
OD	Optische Dichte



PCo	Proteinase-Cofaktor
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PD	Plasmodesmos/Plasmodesmata
PDLP	<i>PD-located proteins</i>
PI	Präimmunserum
pk	polyklonal
PNRV	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>
PSTVd	<i>Potato Spindle Tuber Viroid</i>
Pro	Proteinase
RCNMV	<i>Redclover necrotic mottle virus</i>
RdRP	RNA-dependent RNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RS	Rohserum
RT	Raumtemperatur
RYMV	<i>Rice yellow mottle virus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Synthetic Defined
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
SEL	<i>Size Exclusion Limit</i>
SLRV	<i>Strawberry latent ringspot virus</i>
<i>S. nigra</i>	<i>Sambucus nigra</i>
SOB	<i>Super optimal broth</i>
spp.	Species pluralis
TF	Transkriptionsfaktor
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
ToMV	<i>Tomato mosaic virus</i>
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
UAS	<i>Upstream activating sequence</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
vgl.	vergleiche
VLP	<i>Virus-like particles</i>
VPg	Genomgekoppeltes Protein
vRNP	viraler Ribonukleinprotein-Komplex
(v/v)	<i>volume per volume</i>
VT	Volumenteil
WDV	<i>Wheat dwarf virus</i>
(w/v)	<i>weight per volume</i>
W	Tryptophan
WP	Waschpuffer
X. spp.	<i>Xiphinema</i> spp.
YTHS	<i>Yeast two-hybrid system</i> (Hefe Zwei-Hybrid System)
YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>
ZW	Zellwand



Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Modifikation der Plasmodesmata (PD) durch virale Transportproteine (modifiziert nach Niehl and Heinlein, 2011).....	4
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Hefe Zwei-Hybrid Systems.....	6
Abbildung 1.3: Genomorganisation des <i>Cherry leaf roll virus</i> -Isolats E395 aus Rhabarber (<i>Rheum rhabarbarum</i>), Elektronenmikroskopische Aufnahme von Partikeln einer CLRV-E395 Reinigung und typische CLRV-Blattsymptome.....	9
Abbildung 3.1: Vorhersage der Sekundärstruktur des MP des CLRV-Isolats E395 mit PSIPREDv3.3 (Jones 1999) unter Angabe der Wahrscheinlichkeit.....	41
Abbildung 3.2: Vorhersage einer <i>coiled-coil</i> Domäne mit dem Programm COILS (Lupas et al., 1991) im Bereich der AS 50 und 79 in der Aminosäuresequenz des CLRV-MP E395.....	41
Abbildung 3.3: Kyte & Doolittle Hydrophobizitätsprofil des CLRV-MP E395.....	42
Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der strukturellen und putativ funktionellen Domänen I bis IV des CLRV-MP.....	43
Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der fünf Deletionsmutanten des MP E395.....	44
Abbildung 3.6: Amplifizierung der Volllängenproteine MP und CP der Isolate E395, E327 und E51448 sowie der MP-Deletionsmutanten des MP E395.....	45
Abbildung 3.7: Positivkontrollen für YTH-Experimente.....	47
Abbildung 3.8: YTH-Interaktionsstudie mit den Deletionsmutanten des MP E395 und den Volllängen-MP der CLRV-Isolate E327, E395 und E51448 sowie dem CP des Isolats E395.....	48
Abbildung 3.9: YTH-Interaktionsstudie mit den Deletionsmutanten des MP E395 zur Charakterisierung der funktionellen Bereiche des MP.....	49
Abbildung 3.10: Elektronenmikroskopische Aufnahme (x 12.000) von CLRV-Partikeln in infizierten <i>Sambucus nigra</i> Zellen, die entlang tubulärer Strukturen in den Plasmodesmata angeordnet sind..	50
Abbildung 3.11: YTH-Interaktionsstudie mit dem MP und CP des Isolats E395 zum Nachweis der für den Transport essentiellen Interaktionen.....	51
Abbildung 3.12: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen MP von CLRV-Isolaten verschiedener Serogruppen sowie dem CP des Isolats E395 in <i>S. cerevisiae</i> Y190.....	52
Abbildung 3.13: A)Amplifizierung der MP von <i>Tobacco mosaic virus</i> und <i>Tobacco rattle virus</i> mit der Velocity-Polymerase B)YTH-Interaktionsstudie mit den MP der CLRV-Isolate E395, E327, E51448 sowie den MP E395 Deletionsmutanten und dem CP dieses Isolats als Köderproteinen.....	53
Abbildung 3.14: Bindungsanalyse zur Überprüfung der Interaktionsspezifität der Volllängen-MP und -CP sowie der MP-Deletionsmutanten $\Delta N1$ und $\Delta C2$ mit TSWV-N, TSWV-NSs, WDV-RepA und <i>A. thaliana</i> -PRL1 im YTHS.....	54
Abbildung 3.15: Kolonie-PCR mit pACT2-spezifischen Primern von <i>E. coli</i> DH5 α Transformanden zur Identifizierung von pACT2-Plasmiden. Die Plasmid-DNA wurde aus positiven Klonen von <i>S. cerevisiae</i> Y190 aus der Durchmusterung der cDNA-Bibliothek von <i>A. thaliana</i> Col-1 mit dem MP $\Delta N1$ isoliert.....	57
Abbildung 3.16: Bindungsanalyse zwischen dem Protein At-4/1 aus <i>A. thaliana</i> und dem Volllängen- sowie den partiellen MP von CLRV-E395 in <i>S. cerevisiae</i> Y190.....	61
Abbildung 3.17: Vektorkarte des Plasmids pET28a(+) mit der integrierten Sequenz des MP von Isolat E395.....	62
Abbildung 3.18: Expression von rekombinantem (His) ₆ -MP E395 in <i>E. coli</i> HMS174.....	63
Abbildung 3.19: Expression von rekombinantem (His)-MP E395 in <i>E. coli</i> HMS174 und BL21(DE)pLys.....	64
Abbildung 3.20: Expression von rekombinantem (His) ₆ -MP E395 in <i>E. coli</i> HMS174.....	65
Abbildung 3.21: Expression von rekombinantem (His) ₆ -MP E395 in <i>E. coli</i> HMS174.....	66



Abbildung 3.22: Analyse der IB-Aufreinigungen aus <i>E. coli</i> HMS174 sowie der Eluatfraktionen E ₁ bis E ₄ nach der denaturierenden Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose mittels SDS-PAGE und Western Blot.....	67
Abbildung 3.23: <i>In vitro</i> Nachweis der spezifischen Bindung von MP und CP mittels Protein-Overlay-Blot.....	68
Abbildung 3.24: Ergebnisse des ACP-ELISA mit dem Präimmunserum (PI) in den Verdünnungen 1:500, 1:1000 und 1:2000.....	71
Abbildung 3.25: Ergebnisse des ACP-ELISA mit dem Rohserum (RS) in den Verdünnungen 1:250, 1:500, 1:1000 und 1:2000.....	72
Abbildung 3.26: Ergebnisse des ACP-ELISA mit dem aufgereinigten Anti-Peptid Antikörper pAB2476 (IgG) in den Verdünnungen 1:250, 1:500, 1:1000 und 1:2000.....	72
Abbildung 3.27: Vergleich der Ergebnisse des ACP-ELISA mit Präimmunserum, dem Rohserum und dem aufgereinigten pAB2476 in der Verdünnung 1:2000.....	73
Abbildung 3.28: Detektion des CLRV-MP in Gesamtproteinextrakten von <i>E. coli</i> HMS174 mit dem Expressionskonstrukt pETa(+)-MP E395 mit dem RS in einer 1:2000 Verdünnung.....	74
Abbildung 3.29: Detektion von nativem CLRV-MP mit dem Anti-Peptid Antikörper pAb2476 (Verdünnung 1:2000) mittels Tissue Print in Blattquerschnitten von <i>C. quinoa</i>	75
Abbildung 3.30: Schematische Darstellung der Lage der 4/1-spezifischen Oligonukleotide in der 4/1-kodierenden Sequenz von <i>A. thaliana</i>	77
Abbildung 3.31: Überprüfung der Bindungsspezifität der abgeleiteten degenerierten Primer zur Detektion 4/1-orthologer Gene in der PCR mit dem Plasmid pGY-Nt-4/1.....	78
Abbildung 3.32: PCR mit Nad5-spezifischen Oligonukleotiden zur internen Überprüfung der cDNA-Synthese.....	79
Abbildung 3.33: PCR zum Nachweis von 4/1-orthologen in krautigen und holzigen Wirtspflanzen von CLRV.....	80
Abbildung 3.34: SDS-PAGE und Western Blot von Blatt (1)-, Stiel (2)- und Blütenextrakten (3) von <i>N. benthamiana</i> und <i>A. thaliana</i> zum Nachweis der 4/1-orthologen Proteine mittels monoklonalem Antikörper 1D2.....	81
Abbildung 3.35: CLRV-typische Blattsymptome an <i>Betula pendula</i> 6 (Schwarzer Grund) in der Vegetationsperiode 2012.....	83
Abbildung 3.36: Unspezifische Blattsymptome an <i>B. pendula</i> 5 in den Vegetationsperioden 2012 und 2013.....	84
Abbildung 3.37: Nachweis von CLRV in Blatt (B)- bzw. männlichen (M) und weiblichen (W) Kätzchenmaterial von <i>Betula pendula</i> 4 im jahreszeitlichen Verlauf mittels RT-PCR mit RW1/RW2 Primern nach Werner et al. (1997).....	85
Abbildung 3.38: Etablierung der Positivkontrolle für einen Tissue Print zur Lokalisation von CLRV-Partikeln in Pflanzengewebe.....	86
Abbildung 3.39: Lokalisation von CLRV-Partikeln in männlichen und weiblichen Blütenständen von <i>B. pendula</i> 4 im jahreszeitlichen Verlauf mittels Tissue Print.....	87
Abbildung 3.40: Darstellung der Verteilung der CLRV-Partikel in weiblichen Blütenständen von <i>B. pendula</i>	88
Abbildung 3.41: Lokalisation von CLRV-MP in männlichen und weiblichen Blütenständen von <i>B. pendula</i> 7 an drei Zeitpunkten im Jahr mittels Tissue Print.....	89



Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Größenstandards für RNA- und Proteingelelektrophorese.....	12
Tabelle 2.2: Enzyme und Proteine.....	13
Tabelle 2.3: Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	13
Tabelle 2.4: Virusisolate, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	15
Tabelle 2.5: <i>E. coli</i> Standard- und Proteinexpressionsstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	16
Tabelle 2.6: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stamm, der in dieser Arbeit verwendet wurden.....	16
Tabelle 2.7: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten <i>Betula pendula</i> unter Angabe der GPS-Koordinaten.....	17
Tabelle 2.8: Vektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	17
Tabelle 2.9: Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	18
Tabelle 2.10: Reaktionsansatz der Kolonie-PCR mit pTaq-Polymerase.....	23
Tabelle 2.11: PCR-Programm zur Kolonie-PCR.....	24
Tabelle 2.12: Reaktionsansatz der Reversen Transkription.....	25
Tabelle 2.13: Reaktionsansatz der RW1/RW2-PCR zum spezifischen Nachweis von CLRV.....	25
Tabelle 2.14: PCR-Programm der RW1/RW2-PCR zum spezifischen Nachweis von CLRV in der IC-RT-PCR.....	25
Tabelle 2.15: Zusammensetzung der 10x DO-Lösung.....	28
Tabelle 2.16: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	34
Tabelle 2.17: Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper.....	35
Tabelle 3.1: Generierte GAL4-AD- und GAL4-BD-Fusionen der Vollängen-MP der CLRV-Isolate E395, E327 und E51448 sowie der MP-Deletionsmutanten des MP E395 und des CP E395.....	46
Tabelle 3.2: Übersicht über die Durchmusterung der cDNA-Bibliothek von <i>A. thaliana</i> Col-1 mit den Köderplasmiden pAS2-MP E395 und pAS2-CP E395 im YTHS.....	55
Tabelle 3.3: Übersicht über die Durchmusterung der cDNA-Bibliothek von <i>A. thaliana</i> Col-1 mit den Köderplasmiden pAS2-MP E395 Δ N1 und pAS2-MP E395 Δ C2 im YTHS.....	56
Tabelle 3.4: Ergebnis der Sequenzanalyse der isolierten cDNAs aus dem Screen mit dem MP E395 Δ N1.....	58
Tabelle 3.5: Ergebnis der Sequenzanalyse der isolierten cDNAs aus dem Screen mit dem MP E395 Δ C2.....	59
Tabelle 3.6: Variationen in Induktorkonzentration und Kultivierungstemperatur zur Reduktion der Aggregatbildung des Fusionsproteins (His) ₆ -MP E395 in <i>E. coli</i> Proteinexpressionsstämmen.....	63
Tabelle 3.7: Probenmaterial für die Durchführung von ACP-ELISA, EBIA, und Tissue Print (TP) zur Charakterisierung des Anti-Peptid Antikörpers pAB2476 gegen das CLRV-MP.....	69
Tabelle 3.8: Übersicht über die <i>Primer</i> -Kombinationen, die in der PCR zum Nachweis 4/1-orthologer Sequenzen in CLRV-Wirtspflanzen angewendet wurden.....	77
Tabelle 3.9: Übersicht über die im Tissue Print getesteten CLRV-spezifischen Antikörper.....	86



1 Einleitung

1.1 Virus-Wirt-Beziehungen

Proteine steuern die vielfältigen Funktionen des Lebens. Dabei sind Interaktionen mit anderen Proteinen zur Erfüllung ihrer zellulären Funktion entscheidend. Diese umfassen die Zellarchitektur, den Stoffwechsel, das Signalsystem sowie die Verfügbarmachung von zellulärer Energie (Brückner et al. 2009). Komplexe biologische Systeme zeichnen sich durch die Anwesenheit von Protein-Netzwerken aus. Zum Verständnis der essentiellen Prozesse und molekularen Zusammenhänge ist eine Entschlüsselung dieser Protein-Netzwerke unumgänglich. Pathogene nutzen zur eigenen Vermehrung die Protein-Protein-Interaktionsnetzwerke der Wirtsorganismen.

Insbesondere Viren als obligate Parasiten sind für ihre Vermehrung auf die Syntheseleistung der lebenden Wirtszellen angewiesen, weil sie keinen eigenen Stoffwechsel haben (Meyer-Kahsnitz 1993). Virusinfektionen an Pflanzen können zu erheblichen ökonomischen und ökologischen Schäden führen (Büttner et al. 2013). So sind in vielen Pflanzenarten Ertragseinbußen bis zu 100 % keine Seltenheit (Scholthof et al. 2011). Alexander et al. (2014) fassen die besonderen Charakteristika der Pflanzenviren zusammen. Pflanzenviren sind innerhalb verschiedener Taxa und Ökosysteme weit verbreitet. Umfangreiche Wirtspflanzenkreise, die auch verschiedene Taxa umfassen können, kommen häufig vor. Viren weisen oftmals eine erhöhte Mobilität in der Natur auf, indem sie sich bei der Übertragung verschiedener Vektoren wie Arthropoden, Pilze und Nematoden bedienen. Da Virusinfektionen einen großen Einfluss auf den Ertrag und die Fitness der Pflanze haben können, ist das Verständnis der Epidemiologie von eminenter Bedeutung. Gleichzeitig gilt es aufzuklären, welche molekularen Mechanismen dem Virustransport zu Grunde liegen.

Die systemische Virusinfektion einer Wirtspflanze ist ein sehr komplexer Prozess, der auf balancierten und geordneten Interaktionen von viralen und pflanzlichen Faktoren beruht. Der komplexe virale Replikationszyklus umfasst den Eintritt des Virus in die Pflanze, die En- und Dekapsidierung, die Replikation und Translation, den Kurz- und Langstreckentransport innerhalb der Wirtspflanze sowie das Umgehen der pflanzlichen Abwehr und kann nur durch die vielfältigen Interaktionen mit Wirtsproteinen ermöglicht werden (Brizard et al. 2006, Harries und Ding 2011). Für die Untersuchung von interagierenden Proteinen steht heute ein umfangreiches Methodenspektrum zur Verfügung, mit dem die Analyse von spezifischen Protein-Protein-Interaktionen aber auch des Interaktoms einer Zelle oder eines Organismus bzw. die Suche nach bisher unbekanntem Interaktionspartnern möglich ist. Gängige Methoden sind unter anderem das Hefe Zwei-Hybrid System (*Yeast Two-Hybrid System*, YTHS) und die bimolekulare



Fluoreszenzkomplementation (BiFC). Bis heute konnten mittels dieser Methoden zahlreiche pflanzliche Faktoren identifiziert werden, die den viralen Proteinen als Interaktionspartner dienen.

1.2 Identifizierung von Virus-Virus-/ und Virus-Wirt-Interaktionen mit dem YTHS

1.2.1 Grundlagen der systemischen Infektion einer Wirtspflanze

Jede Pflanzenzelle ist von einer Zellwand sowie i.d.R. einer Kutikula umgeben, die für Pflanzenviren undurchlässig sind. Für eine erfolgreiche Infektion muss diese Barriere überwunden werden (Scholthof 2005). Die Notwendigkeit des Eindringens durch die Zellwand kann umgangen werden, indem eine Übertragung durch Samen und Pollen oder vegetative Vermehrung erfolgt (Drews et al. 2013). Grundsätzlich wird zwischen einer vektoriellen Übertragung durch saugende bzw. stechende Nematoden oder Arthropoden und einer nicht-vektoriellen Übertragung durch mechanische Verletzung oder kontaminiertes Boden- oder Nährwasser unterschieden (Drews et al. 2013). Nach erfolgreichem Eindringen in die Wirtszelle werden die Organellen der Zelle als Replikations- und Ausbreitungsmaschinerie verwendet. Für eine erfolgreiche systemische Infektion muss zunächst der Kurzstreckentransport von der primär-infizierten Zelle in benachbarte Zellen erfolgen. Dazu müssen die Viruspartikel nach der Replikation vom Ort der Replikation zu den Plasmodesmata (PD) und diesen zytoplasmatischen Kanal erfolgreich passieren. Auf diese Weise können verschiedene Gewebe infiziert werden, bis schließlich der Langstreckentransport über das vaskuläre System erfolgt (Tilsner et al. 2014). Bereits 1934 wurde postuliert, dass der Transport des *Tobacco mosaic virus* (TMV) über diese Prozesse erfolgt (Samuel 1934). Inzwischen ist bewiesen, dass die Passage von Pflanzenviren durch spezialisierte virale Proteine, die Transportproteine (*movement* Proteine, MP), kontrolliert wird. Diese vermitteln den Durchtritt von viralen Genomen oder ganzen Viruspartikeln durch die PD als zytoplasmatische Zell-zu-Zell-Verbindungen und die Passage durch das vaskuläre System (Niehl und Heinlein 2011, Harries und Ding 2011, Harries und Nelson 2008, Schoelz et al. 2011).

Die systemische Infektion einer Wirtspflanze erfordert die Fähigkeit des Virus, sich in verschiedene Zelltypen (Mesophyllzellen, Bündelscheidenzellen, Parenchym- und Geleitzellen, Siebelemente) auszubreiten, während der lokale Zell-zu-Zell Transport lediglich epidermale und Mesophyllzellen umfasst. Lediglich 1 bis 15 virale Genome realisieren die Neuinfektion einer benachbarten Zelle (Gutiérrez et al. 2012). Dabei ist die Passage durch die PD der limitierende Prozess. Je nach Typ, pflanzlichem Gewebe und Entwicklungszustand weisen PD unterschiedliche Eigenschaften auf (Lucas und Gilbertson 1994). Zudem besitzen PD einen Durchmesser von ca. 50 nm. Der zytoplasmatische Kanal



weist einen Durchmesser von 3 bis 4 nm auf und erlaubt entsprechend des *Stokes*-Radius die Passage eines etwa 30 kDa globulären Proteins (Tilsner et al. 2014, Lucas und Lee 2004, Lucas und Gilbertson 1994). Die natürliche Konformation bzw. das Größenausschlussvolumen (*size exclusion limit*, SEL) der PD ermöglicht die freie Diffusion von Ionen und kleinen Molekülen wie Metaboliten und Pflanzenhormonen, verhindert aber die Passage größerer Moleküle (Hull 2014, Oparka et al. 1999, Lucas und Wolf 1999). Auch virale Transportkomplexe (virale Ribonukleoproteinkomplexe, vRNP) oder Virionen überschreiten in ihrer Größe das SEL um ein Vielfaches. Isometrische Virionen und vRNP-Komplexe weisen einen Durchmesser zwischen 18 und 80 nm auf. Flexible stäbchenförmige und filamentöse Viren sind lediglich 2,5 bis 15 nm breit, können aber eine Länge bis 2 µm erreichen. Deshalb ist die Modifikation der PD durch die viralen MP für einen erfolgreichen Transport von Zelle zu Zelle essentiell.

Die Vergrößerung des SEL und damit verbunden ein erfolgreicher Transport von Viruspartikeln oder vRNP-Komplexen wird durch verschiedene Strategien innerhalb der Pflanzenviren realisiert. Die zentrale Rolle in der Modifikation der Viruspartikel übernimmt das virale MP. Große Unterschiede gibt es in der Art und der Anzahl der viruskodierten MP sowie der Notwendigkeit der Beteiligung weiterer viraler Proteine. Generell lassen sich zwei Transportstrategien unterscheiden (Niehl und Heinlein 2011, Tilsner et al. 2014) (Abb. 1.1):

Durch MP von Vertretern der Gattungen *Nepo*-, *Como*-, *Alfamo*- und *Tospovirus* wird eine strukturelle Veränderung der PD herbei geführt, indem der Desmotubulus durch eine röhrenartige Struktur aus multimerisierten MP ersetzt wird (*tubule-guided movement*). Die Lokalisation dieser Tubuli erfolgt in Interaktion mit Wirtsproteinen. Tubuli-bildende Viren werden als kleine sphärische Virionen bzw. als vRNP-Komplexe im Falle der Tospoviren (Tilsner et al. 2014) transportiert. Das *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) ist ein Vertreter der Familie *Nepovirus* und wird über tubuläre Strukturen transportiert (Kalašjan et al. 1979, Ritzenthaler et al. 1995). Die Virusreplikation erfolgt am ER, translatierte MPs diffundieren im Zytoplasma und binden schließlich an PD-lokalisierte Proteine (PDLP). An den PD kommt es zur Ausbildung tubulärer Strukturen aus multimerisierenden MP. Virionen werden in die benachbarte Zelle in einem dynamischen Prozess von polarer Assemblierung und Deassemblierung der MP an den Röhren transportiert (Abb. 1.1). Dabei interagiert das MP mit dem C-Terminus der viralen Hüllproteine (Belin et al. 1999). PDLPs 1-8 sind Typl-Transmembranproteine, die den Myosin-abhängigen sekretorischen Stoffwechselweg nutzen, um zu den PD transportiert zu werden (Amari et al. 2010, Amari et al. 2011). PDLP sind entlang der inneren Membran der PD sowie an der Basis der MP-Tubuli lokalisiert. Sie fungieren als Rezeptoren für das MP von GFLV. Sie sind für die Multimerisierung von MP an PD essentiell, da deren Mutation eine defekte Tubulibildung bedingt, die den GFLV-Transport einschränkt (Amari et al. 2010, Amari et al. 2011). Es konnte gezeigt werden,