

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
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
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
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 Boorn 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	$\beta$ -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
<b>2.11</b>	<b>Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>31</b>
2.11.1	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	31
2.11.2	Reinigung (His) <sub>6</sub> 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
<b>2.12</b>	<b>Serologische Methoden .....</b>	<b>35</b>
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 (ACP-ELISA)</i> .....	37
2.12.5	Protein-Overlay Blot.....	37
2.12.6	Nachweis mit CDP-Star .....	37
2.12.7	Colorimetrischer Proteinnachweis auf Nitrocellulose-Membranen.....	38
<b>2.13</b>	<b>Sekundärstrukturanalyse .....</b>	<b>38</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der MP-kodierenden Region des CLRV .....</b>	<b>39</b>
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
<b>3.2</b>	<b>Homo- und Heterodimerisierung CLRV-Proteine MP und CP .....</b>	<b>50</b>
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-Vollängenproteinen.....	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-Ägarose .....	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	<b>Diskussion .....</b>	<b>91</b>

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>122</b>