

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	Antigen-Coated-Plate-Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ACP-ELISA)	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
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-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-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