

**Lokalisation und Quantifizierung der RNAs des
European mountain ash ringspot-associated virus
(EMARAV) in der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
im Department Biologie
der MIN Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nanette Schlattermund

geboren am 1. April 1979 in Hamburg

Hamburg, Oktober 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. S. SCHOLTEN
Tag der Disputation: 21. November 2008

Hamburg, den 07. November 2008



J. Ganzhorn

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

1	Einleitung	1
1.1	Das European mountain ash ringspot-associated virus (EMARAV)	1
1.2	Nachweisverfahren in der Virusdiagnostik.....	5
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Chemikalien, Lösungen und Enzyme	11
2.1.2	Materialien und Reagenzien für qRT-PCR-Experimente	11
2.1.3	Verwendete Reaktions-Kits	11
2.1.4	Klone und Vektoren	12
2.1.5	Bakterienstämme	12
2.1.6	Pflanzenmaterial	12
2.1.7	Verwendete Software	13
2.2	Methoden	13
2.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial	13
2.2.2	DNA-Verdau aus Gesamt-RNA für qRT-PCR-Experimente	14
2.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Gesamt-RNA	14
2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA	14
2.2.5	Phenol/Chloroform-Extraktion	15
2.2.6	Nukleinsäurepräzipitation.....	15
2.2.7	Restriktion von Nukleinsäuren	15
2.2.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	16
2.2.9	TA-Klonierung	17
2.2.10	Sequenzierung der rekombinanten Plasmide.....	18
2.2.11	Computerauswertung / Sequenzanalysen	18
2.2.12	Primerdaten.....	18
2.2.13	Erststrangsynthese mittels Reverser Transkription	20
2.2.14	Standard-PCR-Reaktionen	21
2.2.15	qPCR-Reaktionen	22
2.2.16	Herstellung von cRNAs.....	24
2.2.17	<i>In situ</i> -RT-PCR.....	25
3	Ergebnisse	29
3.1	Nachweis viraler RNAs in <i>Sorbus aucuparia</i> L. mittels <i>in situ</i> -RT-PCR	29
3.1.1	Etablierung der Versuchsbedingungen	29
3.1.2	Nachweis von EMARAV-spezifischen RNAs in Blattstielen.....	33

3.1.3	Kontrollversuche zur Spezifität der <i>in situ</i> -RT-PCR-Signale	34
3.2	Analysen zur Lokalisation und Quantifizierung von EMARAV-spezifischen RNAs in der Eberesche	36
3.2.1	Klonierung von Genabschnitten aus der Eberesche als potentielle interne Standards	36
3.2.2	Ebereschen-spezifische mRNA-Sequenz von Actin	37
3.2.3	Ebereschen-spezifische mRNA-Sequenz von Tubulin	38
3.2.4	Ebereschen-spezifische mRNA-Sequenzen von Ubiquitin	39
3.2.5	Ebereschen-spezifische mRNA-Sequenz der fünft größten UE der RNA-Polymerase II (RPB7)	40
3.2.6	Ebereschen-spezifische 18S rRNA-Teilsequenz	40
3.2.7	Etablierung und Effektivitätsbestimmung der qRT-PCR-Primer.....	41
3.2.8	Ermittlung geeigneter Standards zur Normalisierung von qRT-PCR-Experimenten.....	45
3.2.9	Quantifizierung potentieller Standards	48
3.2.10	Die Quantifizierung von EMARAV-RNAs in <i>Sorbus aucuparia</i> L.	50
3.2.11	Quantifizierung der vier EMARAV-vg RNAs im Jahresverlauf und in unterschiedlichen Geweben.....	52
3.2.12	Verhältnisse von genomischen Minus-Strang RNAs zu copy Plus-Strang RNAs ...	64
3.2.13	Quantifizierung der vgRNA2 in unterschiedlich symptomatischen Blattarealen	66
4	Diskussion.....	69
4.1	<i>In situ</i>-RT-PCR.....	69
4.1.1	Etablierung der Versuchsbedingungen	69
4.1.2	Lokalisation EMARAV-spezifischer RNAs	73
4.2	qRT-PCR.....	76
4.2.1	Etablierung der Versuchsbedingungen	76
4.2.2	Bedeutung der RNA-Qualität und Ermittlung der qRT-PCR-Effektivität	77
4.2.3	Normalisierung	79
4.2.4	Quantifizierung der verschiedenen EMARAV-spezifischen RNAs in <i>Sorbus aucuparia</i> L.	83
4.2.5	Quantifizierung viraler RNA in Blattbereichen, die unterschiedliche Symptome zeigen.....	89
5	Zusammenfassung	92
6	Abkürzungsverzeichnis	94

7	Literatur	97
8	Anhang.....	110
8.1	Nukleinsäuresequenzen potentieller Standards der Eberesche (<i>Sorbus aucuparia</i> L.)	110
8.2	Karten verwendeter Klonierungsvektoren	111

1 Einleitung

1.1 Das European mountain ash ringspot-associated virus (EMARAV)

Seit 1960 wird eine Erkrankung an Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) beschrieben, die sich insbesondere in einer Scheckung der Blätter sowie in chlorotischen Ringflecken äußert (Abbildung 1) (Kegler, 1960). Diese sogenannte Ringfleckigkeit ist seitdem im gesamten Verbreitungsgebiet des Baumes, Nord- und Mitteleuropa, beobachtet worden (Schmelzer, 1977; Cooper, 1979; Polak *et al.*, 1990; Ebrahim-Nesbat und Izadpanah, 1992; Polak und Zieglerova, 1996; Benthack, 2001). Seit kurzer Zeit steht fest, dass mit dieser Erkrankung ein neuartiges RNA-Virus assoziiert ist, das European mountain ash ringspot-associated virus (EMARAV) (Benthack *et al.*, 2005; Mielke und Muehlbach, 2007). Sowohl die viralen Nukleinsäuren als auch Proteine lassen sich ausschließlich in symptomtragenden Ebereschen nachweisen (Benthack *et al.*, 2005; Mielke und Muehlbach, 2007; Mielke *et al.*, 2008) wobei noch unklar ist, ob tatsächlich beide Symptome, Scheckung und Ringflecken, ausschließlich auf eine EMARAV-Infektion zurückzuführen sind.



Abbildung 1: Scheckung und Chlorotische Ringflecken auf Blättern EMARAV-infizierter Ebereschen

EMARAV besitzt ein segmentiertes, einzelsträngiges (ss)RNA-Genom, dessen vier RNAs negative (-)Polarität zeigen und jeweils für ein virales Protein kodieren (Abbildung 2). Die Enden dieser RNAs sind, wie es für ss(-)RNA-Viren typisch ist, komplementär. Diese Basenpaarungen erstrecken sich je nach RNA über einen Bereich von 19 bis 23 bp und

weisen Unterbrechungen von zwei (RNA1-3) bzw. vier Basenpaaren (RNA4) auf. Von anderen Viren ist bekannt, dass diese und ggf. zusätzliche Regionen der nicht translatierten Bereiche eine Promotoraktivität besitzen und daher sowohl im Rahmen der Replikation als auch bei der Transkription unter Verwendung der eigenen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) eine wichtige Rolle spielen (Chen *et al.*, 2001; Kashiwagi *et al.*, 2002; Barr *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2007). Die letzten 13 Nukleotide der Enden der vier RNAs sind konserviert. Ihre Sequenz ähnelt interessanterweise sehr der der *Orthobunyaviren* und der *Hantaviren*, beides Genera mit tier- und humanpathogenen Vertretern innerhalb der Virusfamilie *Bunyaviridae*. Die viralen (v)RNAs von EMARAV besitzen keinen Poly-(A)-tail. Die längste der vRNAs, vRNA1 (7040 nt), kodiert die 266 kDa große RdRp (Abbildung 2). In ihrer Sequenz lassen sich alle sechs konservierten Motive (Prämotiv A, Motive A-E), die funktionale Domänen darstellen, finden. Darüberhinaus besitzt diese RdRp vermutlich ein weiteres Motiv in Form eines endonucleolytischen Zentrums. Dieses wird vermutlich im Rahmen des ‚Cap-Snatching‘-Mechanismus, bei dem das Virus die ‚Caps‘ von Wirts-mRNAs abtrennt und an seine eigenen RNAs ligiert, aktiviert. Die zweitlängste RNA (RNA2, 2335 nt) trägt das Gen für einen putativen Glykoproteinprecursor P2, der mittels wirtsspezifischer Proteasen in zwei einzelne Glykoproteine (G2, 23 kDa und G1, 52 kDa) gespalten werden könnte. Mit Hilfe von Computeranalysen lassen sich für dieses Protein neben der Prozessierungsstelle mehrere N-Glykosylierungsstellen, drei Transmembranhelices sowie ein N-terminales Signalpeptid ermitteln. Erste Hinweise in heterologen Expressionssystemen lassen vermuten, dass die Glykoproteine möglicherweise durch das 35 kDa Nucleocapsid (N)-Protein (P3) stabilisiert werden (Ludenberg, 2008). Dieses wird von der RNA3 (1560 nt) kodiert und lässt sich in Fraktionen von Nucleocapsid- und Viruspartikel-Aufreinigungen anreichern. Das kleinste EMARAV-spezifische Protein P4 wird von der RNA4 (1348 nt) kodiert (Abbildung 2). Ihm konnte bisher keine eindeutige Funktion im Replikationszyklus des Virus zugeordnet werden. Allerdings haben erste Untersuchungen gezeigt, dass es sich hierbei vielleicht um einen viralen Gene Silencing-Suppressor handeln könnte (Klode, 2007; Thiemann, 2008). P4 ist wie auch andere bekannte Suppressoren (HCPro, NSs) in der Lage, ein LacZ-induziertes Gene Silencing in *Drosophila* S2-Zellen zwar nicht vollständig zu unterdrücken, aber bis zu einem gewissen Grad abzuschwächen.

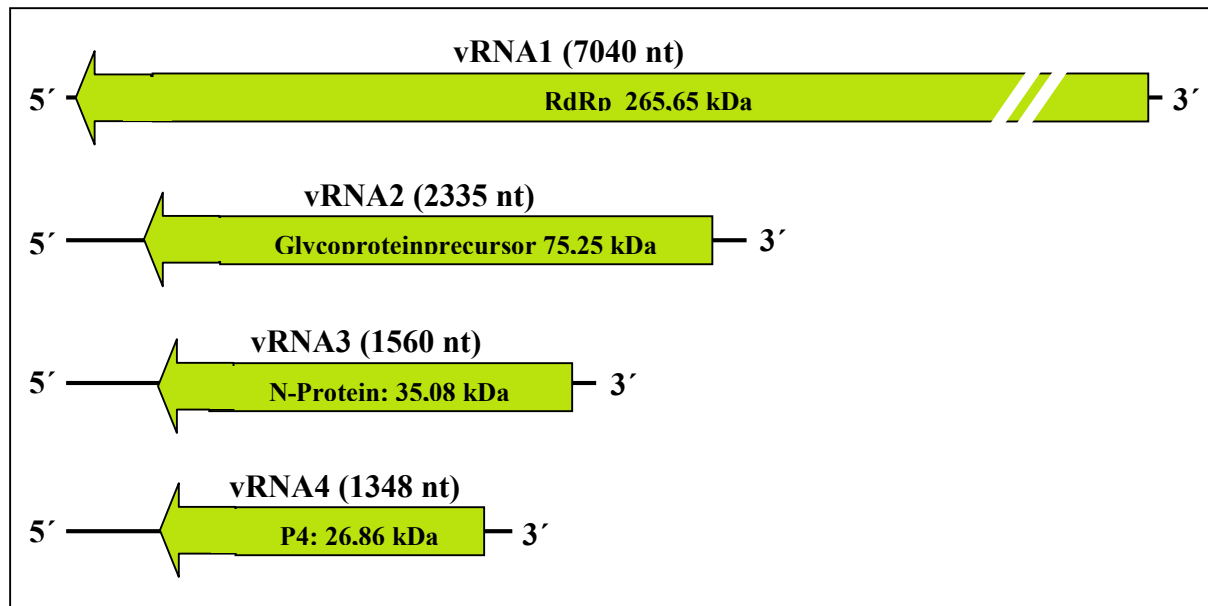


Abbildung 2: Genomorganisation von EMARAV (nach Mielke und Muehlbach, 2007, verändert)

EMARAV kann bislang keinem der bekannten Genera und Familien zugeordnet werden, trotzdem sich auf Ebene der viralen Proteine Verwandtschaften zu verschiedenen ss(-)RNA-Viren erkennen lassen. Die Aminosäuresequenz der RdRp-Motive zeigt, wie auch schon die zuvor erwähnten RNA-Termini, große Ähnlichkeit zu denen der Bunyaviren, aber auch zu den phytopathogenen Tenuiviren (Benthack *et al.*, 2005). Die höchste Verwandtschaft scheint demnach zu den pflanzlichen Tospoviren und den tier- und humanpathogenen Orthobunyaviren zu bestehen. Die anderen drei EMARAV-spezifischen Proteine zeigen allerdings keine großen Übereinstimmungen mit denen der *Bunyaviridae*. Lediglich der putative Glykoproteinprecursor P2 weist ein typisches Motiv der Phleboviren auf und scheint von seiner Organisation her denen der Bunyaviren sehr ähnlich zu sein. Das N-Protein P3 weist auf Aminosäureebene eine gewisse Übereinstimmung mit den N-Proteinen der ebenfalls noch nicht klassifizierten Pflanzenviren Pigeon pea sterility mosaic virus (PPSMV) und High Plains virus (HPV) auf. Da bislang für diese beiden Viren keinerlei Sequenzinformationen zu den anderen Proteinen vorliegen, kann noch keine genaue Aussage über die phylogenetische Beziehung gemacht werden. Als einzig bisher veröffentlichter Sequenzabschnitt, weist das 3'-Ende des HPV eine sehr große Übereinstimmung mit dem konservierten Terminus von EMARAV auf. Nach persönlicher Mitteilung von Dr. Toufic Elbeaino (Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari, Bari, Italien) besteht eine weitere Verwandtschaft zu einem Virus, das mit dem ‚Fig mosaic‘ assoziiert ist. Es konnten zu jeder der vier EMARAV-spezifischen RNAs Sequenzen mit hoher Übereinstimmung gefunden werden. So scheinen die RdRps bzw.

ihre Aminosäuresequenzen über einen Bereich von ca. 1200 Aminosäuren eine Ähnlichkeit von etwa 60 % zu besitzen.

Bunyaviren, sowie PPSMV, HPV und vermutlich auch das mit dem ‚Fig mosaic‘ in Verbindung stehende Virus gehören zu den membranumhüllten Viren. Ihre Partikel variieren zwischen 80 und 200 nm im Durchmesser (Skare *et al.*, 2006; Overby *et al.*, 2008). Bereits 1992 zeigten Ebrahim-Nesbath und Izadpanah in Ultradünnschnitten von Ebereschenblättern mit den charakteristischen Krankheitssymptomen ebenfalls von einer Doppelmembran umgebene Partikel mit einer Größe von 80 bis 100 nm. Und auch in der Fraktion einer Partikel-Anreicherung aus Ebereschenblättern, die nach einem Protokoll für Tospoviren durchgeführt wurde, konnten Strukturen im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden, die solchen Viruspartikeln ähnlich sind (Abbildung 3) (Ludenberg, 2008). Nucleocapside mit fädigen, flexiblen Strukturen, die lediglich aus N-Protein und viraler RNA bestehen, konnten bereits für die oben aufgeführten Viren gezeigt werden (Ahn *et al.*, 1998; Lava Kumar *et al.*, 2002). Die Darstellung von EMARAV-spezifischen Nucleocapsiden gelang bisher nicht.

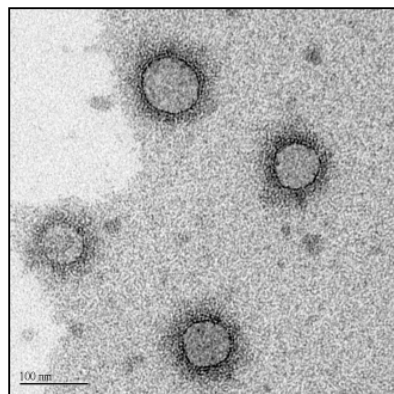


Abbildung 3: Putative Viruspartikel von EMARAV aus Ludenberg, 2008

Der einzige bislang bekannte Wirt von EMARAV ist *S. aucuparia* L.. Die in Nordamerika verbreitete *S. scopulina* Greene (Kaskaden-Eberesche) zeigt zwar ähnliche Symptome, ein Nachweis von EMARAV mittels RT-PCR oder Immunodetektion gelang jedoch nicht (persönliche Mitteilung von Nancy Robertson, USDA, ARS, Alaska).

EMARAV lässt sich gut durch Pfropfung auf eine gesunde Ebereschen-Unterlage übertragen (Führling und Büttner, 1995). Die mechanische Übertragung des Virus auf krautige Wirtspflanzen ist im Gegensatz dazu allerdings sehr eingeschränkt. So konnte EMARAV zwar durch direkten Abrieb mit infiziertem Blattmaterial ohne Puffer auf *Nicotiana rustica* und *Nicotiana tabacum* var. Samsun übertragen werden, aber der Titer in diesen Pflanzen schien recht gering und die Symptomausprägung uneinheitlich zu sein (Kadri, 2002; Ringel,

2003). Die natürliche Übertragung von EMARAV ist noch unklar. Aufgrund der Verwandtschaft zu PPSMV, HPV und dem ‚Fig mosaic‘ assoziierten Virus, die alle durch Milben der Familie *Eriophyidae* übertragen werden (Proeseler, 1969; Kulkarni *et al.*, 2002; Louie *et al.*, 2006) besteht der Verdacht, dass die Gallmilbe *Phytoptus pyri* (Pagenstecher, *Eriophyidae*), die sehr häufig auf infizierten Bäumen zu finden ist (Mielke, 2004; Thoma, 2007) der mögliche Vektor sein könnte. Kürzlich konnten sowohl verschiedene EMARAV-spezifische RNAs wie auch das P3 mehrfach in einzelnen Milben nachgewiesen werden (Mielke, unveröffentlicht).

Zum Nachweis von EMARAV stehen mittlerweile zuverlässige diagnostische Primerpaare sowie Antiseren gegen die viralen Proteine G1, G2, P3 und P4 zur Verfügung (Mielke und Muehlbach, 2007; Mielke *et al.*, 2008). Letztere finden vorwiegend im Rahmen der Untersuchungen zur Funktion der Proteine eine Anwendung.

Bezüglich der Lokalisation und Quantifizierung von EMARAV in Geweben oder Zellen ist noch nicht viel bekannt. Zwar lässt sich mit den verschiedensten molekularbiologischen Methoden wie dsRNA-Präparation, Northern-Blot-Hybridisierung und RT-PCR in vielen Geweben (Blätter, Bast, Früchte, Samen) virale RNA detektieren, aber eine Eingrenzung auf verschiedene Zelltypen oder sogar subzellulär auf bestimmte Zellkompartimente ist bislang nicht erfolgt. Lediglich in ersten *in situ*-Hybridisierungen konnte genomische RNA im Palisaden- und Schwammparenchym in Blattquerschnitten infizierter Ebereschen gezeigt werden (Schlattermund, 2004).

1.2 Nachweisverfahren in der Virusdiagnostik

Häufig beginnt die Virusdiagnostik an Pflanzen mit der Bonitur typische Symptome wie Chlorosen, Scheckungen, Welke oder Kleinfrüchtigkeit. Die daraufhin folgenden Nachweisverfahren lassen sich grundsätzlich in zwei Kategorien einteilen. Entweder basieren sie auf Antiseren, die zur Detektion von viralen Antigenen eingesetzt werden (serologischer oder immunologischer Nachweis) oder sie basieren auf dem Nachweis viraler Nukleinsäuren. Eine der wichtigsten serologischen Methoden ist der ELISA (Enzyme linked immuno-sorbant assay). Er wird vor allem in der Routinediagnostik eingesetzt, wo große Probenmengen mit wenig Aufwand und geringen Kosten in kurzer Zeit untersucht werden müssen. Zur Durchführung eines ELISA werden unmarkierte virusspezifische mono- oder polyklonale Antikörper an Oberflächen von Mikrotiterplatten gebunden die dann die viralen Antigene im zu untersuchenden Pflanzensaft binden. Beim direkten Nachweisverfahren wird als zweiter Antikörper ein virusspezifischer, markierter Antikörper eingesetzt, welcher das gleiche virale

Antigen bindet und eine Detektion dieses Komplexes aufgrund seiner Markierung zulässt. Dieser Assay wird als DAS-(double antibody sandwich)-ELISA bezeichnet. Der TAS-(triple antibody sandwich)-ELISA ist eine indirekte Detektionsmethode, die sich darin unterscheidet, dass der zweite eingesetzte Antikörper (oft monoklonal), wie der immobilisierte, nicht markiert ist. Es bedarf folglich eines dritten Antikörpers, der gegen den zweiten tierspezifischen Teil des Antikörpers gerichtet ist und eine Markierung trägt. Der ELISA lässt im Rahmen der Nachweisgrenze nach Verwendung eines monoklonalen virusspezifischen Antikörpers exakte Rückschlüsse auf die Virusmenge zu, wohingegen mittels polyklonaler Antikörper auch Anhaltspunkte bezüglich der serologischen Gruppenzugehörigkeit eines Virus gewonnen werden können (Sharifi *et al.*, 2008). Da polyklonale Antikörper an verschiedene Epitope viraler Proteine / Antigene binden können, sind sie oft in der Lage sowohl das Virus, gegen dessen Protein sie hergestellt wurden als auch Proteine verwandter Viren zu binden und somit einen Nachweis zu ermöglichen.

Neben der Routinediagnostik finden solche Antiseren vor allem auch Anwendung bei der Charakterisierung viraler Proteine. So können sie helfen die tatsächliche Größe des Proteins und die eventuelle Komplexierung mit anderen Peptiden in Western-Blot-Analysen aufzuklären. Durch den Einsatz unspezifisch proteinbindender Membranen, wie z.B. Nitrocellulose oder Polyvinyliden Fluorid (PVDF) kann aber auch ein gewebs- und organspezifischer Nachweis geführt werden. Hierfür werden frisch geschnittene Pflanzenteile (z.B. Sprossachse oder Wurzeln) auf eine Membran gepresst und die Proteine mittels Antikörpern anschließend detektiert (Drews *et al.*, 2004). Dies ist ein schnelles und einfach durchführbares Nachweisverfahren in der Diagnostik, kann aber auch z.B. zur Ermittlung der Ausbreitungsgeschwindigkeit eines Virus in der Wirtspflanze eingesetzt werden.

Eine exakte Lokalisation eines Virus in einer Zelle kann ebenfalls mittels spezifischer Antikörper gelingen. Das Wissen darüber, in welchen Zellkompartimenten das Virus und somit auch seine Proteine vorkommen, kann Aufschluss über den Ort der Replikation und Transkription, der Translation und des Partikelassembly geben (Carette *et al.*, 2002) und somit zur Gruppierung noch unklassifizierter Viren, sowie zur Entwicklung antiviraler Wirkstoffe in der Medizin beitragen. In der Pflanzenvirologie werden oft fluoreszenzmarkierte Antikörper in Protoplastensystemen eingesetzt. Um eine Kolo-kalisation mit bestimmten zellulären Kompartimenten festzustellen, können anders fluoreszierende spezifische Antikörper z.B. gegen den Golgi-Apparat und virusspezifische Antikörper in einem Versuchsansatz verwendet werden. Zur intrazellulären Lokalisation viraler Proteine ist die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) in Verbindung mit goldmarkierten

Antikörpern besonders geeignet (Cillo *et al.*, 2002). Hierfür können Ultradünnschnitte (50 bis 100 nm) von Geweben der natürlichen Wirtspflanze angefertigt werden, die anschließend auf Netzchen aufgebracht, meist mittels Uranylacetat kontrastiert und dann mit virusspezifischen, goldmarkierten Antikörpern dekoriert werden. Wenn Antikörper in der Elektronenmikroskopie verwendet werden, spricht man von Immuno Sorbent Electron Microscopy (ISEM). Antikörper können wie beschrieben zur Dekoration, also zum nachträglichen Markieren der viralen Proteine, aber auch zur Anreicherung dieser Proteine genutzt werden. Gibt man Pflanzenextrakte auf Netzchen, welche zuvor mit der Antikörperlösung beschichtet wurden, so binden virale Proteine selektiv an die Oberfläche, wohingegen nicht gebundene zelluläre Proteine teilweise in nachfolgenden Waschschritten entfernt werden können. Werden Antikörper gegen virale Oberflächenproteine (Hüll- oder Nukleocapsidproteine) zur Beschichtung verwendet, gelingt es oft bereits in Tropfpräparaten aus Pflanzenextrakten die Morphologie der Viruspartikel aufzuklären.

Neben dem serologischen und mikroskopischen Virusnachweis, basieren viele Verfahren auf der Detektion von viralen Nukleinsäuren entweder im Gewebe selbst oder in reinen RNA- oder DNA-Präparationen.

In Hybridisierungstechniken verwendet man spezifische Sonden, deren Markierung radioaktiv oder nicht radioaktiv sein kann, und die komplementär zu der zu detektierenden viralen Nukleinsäure sind. Nicht radioaktive Sonden tragen modifizierte Nukleotide, die mittels eines spezifischen Antikörpers, der ein Enzym wie z.B. die Alkalische Phosphatase oder die Meerrettich-Peroxidase trägt, detektiert werden. Als Substrate können Substanzen verwendet werden, deren Umsetzung Farbpräzipitate (z.B. NBT/BCIP) oder Chemilumineszenz (z.B. CSPD) erzeugen. Eine schnelle Hybridisierungsmethode zur Detektion von Pflanzenviren, ist der Tissue print. Bei diesem werden (wie im serologischen Teil bereits beschrieben) Pflanzenteile frisch angeschnitten und mit der Schnittfläche auf eine Membran gepresst. Zur unspezifischen Bindung von Nukleinsäuren eignen sich neutrale oder positiv geladene Nylonmembranen. Im Gegensatz zu dem Tissue Print, der organ- oder gewebspezifische Nachweise zulässt, dient der Spot Blot, bei dem kleine Mengen eines Pflanzenpresssaftes oder Homogenats auf eine Membran getropft werden, dem generellen Nachweis des gesuchten Virus. Solche Nachweisverfahren spielen, wie auch der ELISA in der Diagnostik der Pflanzenschutzämter eine große Rolle, da sie leicht durchführbar und für gängige Pflanzenviren gut etabliert und deshalb sehr zuverlässig sind (Muehlbach *et al.*, 2003).

Zwei weitere auf spezifischen Sonden basierende Verfahren zum Nachweis viraler Nukleinsäuren stellen Northern- und Southern-Blot-Hybridisierungen dar. Im Fall des Northern-Blots wird isolierte RNA, für den Southern-Blot dagegen DNA jeweils gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nylonmembranen transferiert. Mittels dieser Hybridisierungen können so die Größen der spezifischen Nukleinsäuren bestimmt werden. Grundsätzlich können sowohl RNA-, als auch DNA-Sonden zur Hybridisierung eingesetzt werden, wobei RNA:RNA-Hybride am stabilsten sind. RNA:DNA-Bindungen sind noch fester als DNA:DNA-Bindungen, weshalb RNA-Sonden in Northern-Blot-Experimenten die stringentesten Hybridisierungs- und Waschbedingungen zulassen und deshalb hochspezifisch sind. Die acht vg- und vcRNAs von EMARAV konnten mittels spezifischer RNA-Sonden in Northern-Blot-Experimenten in Gesamt-RNA aus symptomtragenden Ebereschen detektiert werden (Schlatermund, 2004). Für EMARAV konnte die Technik der Northern-Blot-Hybridisierung verwendet werden, um alle vier genomischen RNAs mittels einer einzigen DNA-Sonde von 13nt Länge, die den konservierten Enden komplementär war, parallel zu detektieren und ihre Größen und Anzahl zu bestätigen (Mielke und Muehlbach, 2007).

Eine besondere Form der Hybridisierung stellt die *in situ*-Hybridisierung (ISH) dar, mit der virale Nukleinsäuren innerhalb bestimmter Gewebe oder Zelltypen und gegebenenfalls auch Zellkompartimenten lokalisiert werden können (Delord *et al.*, 1990). Hierfür werden Gewebe oder kleine Pflanzenteile so fixiert, dass sowohl die pflanzlichen Strukturen, als auch sämtliche Nukleinsäuren erhalten bleiben. Eine Einbettung in z.B. Wachse ermöglicht das Schneiden der Gewebe. Diese werden anschließend vollständig entwachst, ihre Permeabilität für die Sonden erhöht und dann mit diesen hybridisiert. Die Detektion erfolgt mit Substraten, die durch ihre enzymatische Umsetzung Farbpräzipitate erzeugen (Roche, 2002). Bei Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) werden die verwendeten Sonden aufgrund ihrer Fluoreszenzmarkierung direkt, also ohne den Einsatz von Antikörpern, detektiert (Bolten *et al.*, 1998). Einen sehr viel sensitiveren Nachweis viraler Nukleinsäuren bietet die (RT)-PCR. Speziell zum Nachweis von Viren *in situ*, die in sehr geringen Kopienzahlen vorliegen oder aus anderen Gründen schwer detektierbar sind, kann die *in situ*-(RT)-PCR eingesetzt werden. Bei diesem Verfahren werden sowohl eine Reverse Transkription als auch die PCR in Gewebeschnitten ausgeführt, weshalb besonders viel Aufmerksamkeit auf intakte Nukleinsäuren und Permeabilität der Zellen, sowie auf geeignete Versuchsbedingungen für die Polymerasen gelegt werden muss. Bei der direkten *in situ*-RT-PCR werden markierte Nukleotide während der PCR in die neu synthetisierten DNA-Stränge integriert, während von

indirekter *in situ*-RT-PCR gesprochen wird, wenn die unmarkierten PCR-Produkte anschließend mittels Sonden detektiert werden (Long *et al.*, 1993). Bei der indirekten *in situ*-RT-PCR handelt es sich demnach um eine Kombination aus *in situ*-RT-PCR und *in situ*-Hybridisierung.

Aufgereinigte Nukleinsäuren werden je nach Fragestellung mit isolat-, art- oder gruppenspezifischen Primern analysiert. Der Erhalt und die Größe des Amplifikats ermöglichen die Identifikation bekannter Viren, oder, bei Verwendung von gruppenspezifischen Primern, gegebenenfalls auch die Entdeckung neuer Viren oder Virusisolate (Fanigliulo *et al.*, 2007). Die Bedeutung der (RT-)PCR als Routinediagnostikverfahren nimmt sowohl in der medizinischen (Vaheri *et al.*, 2008), als auch in der pflanzlichen Virologie stetig zu, da sie sehr zuverlässig und extrem sensitiv ist. Sie hat aber den Nachteil zeitaufwändiger und arbeitsintensiver als der ELISA zu sein sowie eine gewisse Laborausstattung zu benötigen.

Gerade in der medizinischen Diagnostik wird die herkömmliche RT-PCR immer häufiger von der real time RT-PCR, auch quantitative RT-PCR (qRT-PCR) genannt, abgelöst. Da die Identifikation der Amplifikate mittels ihrer Schmelztemperatur erfolgt, ist die elektrophoretische Auftrennung im Anschluss unnötig. Darüber hinaus ist die qPCR dank kurzer Produkte sehr schnell und ermöglicht eine Quantifizierung der Ausgangsnukleinsäuren. Des Weiteren können auch nah verwandte Viren oder Isolate, die gleiche Symptome auslösen, mittels hochspezifischer qRT-PCR-Experimente differenziert werden. Dies ermöglicht eine schnelle und korrekte Therapie der Erkrankten, kann aber auch unter epidemiologischen Gesichtspunkten sehr wichtig sein, da so bei gefährdeten Personen die richtigen Impfungen durchgeführt werden können (Garcia *et al.*, 2001). Auch in der medizinischen Forschung zum Beispiel bei der Entwicklung neuer antiviraler Wirkstoffe, ist die qRT-PCR von großem Interesse, da es hier erforderlich ist, die Menge viraler RNA-Moleküle exakt bestimmen zu können (Rouet und Rouzioux, 2007).

In der Routinediagnostik der Pflanzenvirologie spielt die qPCR noch eher eine untergeordnete Rolle. Vor allem aus Kostengründen stellt der ELISA nach wie vor die Standardmethode zur Detektion von phytopathogenen Viren dar. Besonders in Pflanzenschutzämtern, die meist aufgrund der Symptome bereits Indizien für ein potentiell Virus als Erreger haben und oft viele Proben bearbeiten müssen, ist der immunologische Nachweis eine zuverlässige, günstige und schnelle Methode. Allerdings gewinnt die Standard-RT-PCR an Bedeutung da sie ebenfalls schnell und in großer Stückzahl durchführbar und außerdem sehr sensitiv ist.

Die Quantifizierung von viralen Nukleinsäuren spielt in der Pflanzenvirologie momentan vorwiegend eine Rolle bei der Charakterisierung von Pathogenen und deren Interaktion mit der Wirtspflanze. So ist hier z.B. die Ermittlung der Verhältnisse der viralen genomischen (vg) zu der viralen copy (vc) Nukleinsäuren von Interesse, weil sie Rückschlüsse auf Mechanismen der Replikation und Transkription der Viren ermöglicht. Des Weiteren vermag die qRT-PCR auch epidemiologische Aspekte wie die Überwinterung und Übertragung von Viren näher zu beleuchten, indem die Virusmengen in verschiedenen Geweben einer Pflanze oder aber auch bei Viren mit großem Wirtskreis in verschiedenen Wirtspflanzen bestimmen kann (Saponari *et al.*, 2008). Die Quantifizierung verschiedener virusspezifischer mRNAs kann aber auch Hinweise auf die jeweiligen benötigten Proteinmengen und ihre Funktionen geben (Skaf *et al.*, 2000). qRT-PCR kann auch dazu genutzt werden, virale copy RNAs in Vektoren nachzuweisen. Sind vcRNAs detektierbar, spricht dies für eine Replikation des Virus im Vektor, was diesen zu einem sehr potenten Überträger macht (Olmos *et al.*, 2005; Sinisterra *et al.*, 2005). Ein weiteres Feld der qRT-PCR ermöglicht Aussagen über den Einfluss viraler Nukleinsäuren oder Proteine auf die Expression verschiedener Wirtsgene, wie etwa bei der Pathogenabwehr. Es konnte mittels qRT-PCR gezeigt werden, dass nach Infektion von *Nicotiana tabacum* mit dem *Tobacco mosaic virus* (TMV, *Tobamovirus*) die mRNA Menge des Resistenzgens N deutlich zunimmt. Die Infektion mit dem *Potato virus Y* (*Potyvirus*, *Potyviridae*) löste keinen Anstieg der mRNA-Mengen aus, was für eine relativ spezifische Abwehr der Pflanze spricht (Levy *et al.*, 2004). Ein wichtiger Mechanismus im Rahmen der Virus-Pflanze-Interaktion ist das Gene silencing, bei dem von der Pflanze synthetisierte siRNAs und verschiedene Proteinkomplexe zur Degradation der viralen RNAs genutzt werden. Die Quantifizierung der Virus-RNA-Mengen kann in diesem Rahmen eine Aussage über die Effektivität der viralen Suppressoren ermöglichen (Johansen und Wilson, 2008). Stärkere Suppressoren bedingen demnach erhöhte Virusreplikation und führen somit zu größeren vRNA-Konzentrationen in der Pflanze.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die qRT-PCR zur Quantifizierung der verschiedenen RNAs des European mountain ash ringspot-associated virus genutzt, um Erkenntnisse bezüglich der Replikation, Transkription, Symptomausprägung und Überwinterung dieses neuartigen Virus zu gewinnen. Die ebenfalls Nukleinsäure-basierende Methode der *in situ*-RT-PCR (IS RT-PCR) sollte zusätzlich die Lokalisation des Virus in Geweben bzw. Zelltypen ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Calbiochem (Schwalbach am Taunus), Carl Roth (Karlsruhe), Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München) bezogen und entsprachen dem Reinheitsgrad „zur Analyse“.

Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Ionenaustauscheranlage (Milli-Q-Water-Systems, Millipore) angesetzt und bei Bedarf durch Autoklavieren für 20 min bei 120°C und 1,2 bar sterilisiert. Für die Arbeiten mit RNA wurden die Lösungen, Puffer sowie das Wasser vor dem Autoklavieren mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Sofern das Autoklavieren einer Chemikalie nicht möglich war, wurden die hiermit hergestellten Lösungen und Puffer mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.

Alle verwendeten Enzyme stammten, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot).

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) bezogen und bei –20°C gelagert.

2.1.2 Materialien und Reagenzien für qRT-PCR-Experimente

Aufgrund der hohen Sensibilität der qRT-PCR wurde Wert auf möglichst einheitliche Versuchsbedingungen gelegt. Für die Erststrangsynthese wurde ausschließlich die MMuLV-Reverse Transkriptase von Fermentas genutzt. Der „qPCR MasterMix Plus für SYBR® Green I“ (Eurogentec, Köln) für die real time PCR-Reaktionen entstammte zwei verschiedenen Chargen. Die verwendeten 96-well Platten und die Klebeabdeckungen wurden von der Firma Eppendorf (Hamburg) bezogen.

2.1.3 Verwendete Reaktions-Kits

Zur Elution von PCR-Produkten und Vektoren diente das Kit „DNA Gel Extraction Kit“ von Roche (Mannheim) oder „Nucleo Spin Extract II“ von Macherey und Nagel (Düren).

2.1.4 Klone und Vektoren

Von Frau Dr. Nicole Mielke (Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek) wurden mir folgende Ebereschen- und EMARAV-spezifische Klone zur Verfügung gestellt:

Tabelle 1: Ebereschen-RNA- und EMARAV-spezifische Klone

	Vektor	Insertlänge [bp]	Herkunft
V77 2/1_4.13	pCR4-TOPO [®]	386	18Sr RNA von <i>S.a.</i>
V103.44	pCR4-TOPO [®]	794	vRNA1
V107.10	pCR4-TOPO [®]	1429	vRNA 2
V133.14	pGEM T-Easy [®]	1155	vRNA 3
V130.19	pCR2.1-TOPO [®]	1356	vRNA 4

Zur Klonierung Ebereschen-spezifischer Genabschnitte wurde der Vektor pCR II[®] von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

2.1.5 Bakterienstämme

Für sämtliche Klonierungen von PCR-Produkten wurden zur Transformation chemisch kompetente Zellen des *Escherichia coli*-Stammes DH5 α verwendet.

2.1.6 Pflanzenmaterial

Das verwendete Pflanzenmaterial stammte von drei im Freiland stehenden Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) in Hamburg.

- Versuchsbaum K1, infiziert, deutliche Scheckungen und Ringflecken auf den Blättern, ca. 8 Jahre alt. Standort: Waldrand, Revierförsterei Klövensteen, Klövensteenweg (GPS: E: 9°46' 01'', N: 53°36' 00'')
- Versuchsbaum B1, infiziert, seit mehreren Jahren deutliche Scheckungen und Ringflecken auf den Blättern, zusätzlicher Befall durch Pilze und Flechten, ca. 20 Jahre alt. Standort: In Baumgruppe, Botanischer Garten Klein Flottbek (GPS: E: 9° 51' 32'', N: 53° 33' 46'')
- Versuchsbaum SF (symptomfrei), in RT-PCR-Experimenten seit Jahren als EMARAV-frei getestet, keine Symptome, ca. 12 Jahre alt. Standort: freistehend westlich neben dem Biozentrum Klein Flottbek (GPS: E: 9° 51' 32'', N: 53° 33' 37'')

Es wurden von Januar bis Dezember 2006 monatlich Proben von allen drei Versuchsbäumen genommen. Pflanzenmaterial wurde ausschließlich von einem markierten Ast jedes Baums

geerntet. Von Januar bis inklusive April und im Dezember wurden Blattknospen geerntet. In den Monaten Mai bis November wurden Blätter inklusive Blattstielen gesammelt. Die Blätter wurden direkt vor der RNA-Isolierung, im tiefgekühlten Zustand in kleine Stücke zerbrochen und gut durchmischt. Darüber hinaus wurden junge Triebe (Zweige) das gesamte Jahr hindurch entnommen, wobei lediglich das Phloem inklusive Rinde, welches frisch vom Holz abgezogen wurde, weitere Verwendung fand und bis zur RNA-Isolierung bei -70°C gelagert wurde.

2.1.7 Verwendete Software

Die Ableitung von sequenzspezifischen Primern wurde mit Hilfe des frei zugänglichen Programms PrimerQuestSM der Firma Integrated DNA Technologies, Inc., (Iowa, USA) vorgenommen.

Bei GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm>) handelt es sich um ein Makro für Excel, welches zur Ermittlung konstitutiv exprimierter Gene in real time PCR-Experimenten eingesetzt wird.

REST 2005 (Handbuch: Pfaffl, Herrmann, Chiew 2006) (<http://www.gene-quantification.info>) ist ein frei verfügbares Programm, welches der Signifikanzprüfung ermittelter real time PCR-Daten dient (Pfaffl *et al.*, 2002).

Zur Dokumentation der *in situ*-RT-PCR-Experimente wurde das Mikroskop Axiovert 35M von Zeiss (Jena) mit der zugehörigen Software Image Pro[®] Plus The Proven Solution von Media Cybernetics Inc. (Bethesda, MD, USA) genutzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial basiert auf dem Verfahren von Boom *et al.* (1990) und wurde wie in Mielke und Muehlbach (2007) angegeben verändert. Die isolierten Nukleinsäuren wurden wie unter (2.2.6) beschrieben gefällt, photometrisch und gelelektrophoretisch analysiert (2.2.3, 2.2.8.1) und bei -20°C gelagert.

2.2.2 DNA-Verdau aus Gesamt-RNA für qRT-PCR-Experimente

Da bei der verwendeten Gesamt-RNA-Isolationsmethode aus Pflanzenmaterial auch genomische DNA mitisoliert wird, der Erfolg von qRT-PCR-Experimenten aber von einer exakten und reproduzierbaren Quantifizierung der eingesetzten Gesamt-RNA-Menge abhängt, wurde sämtliche DNA unter Verwendung der DNase I wie folgt abgebaut.

1 µg	Gesamt-RNA
1 µl	DNase-Puffer (10-fach)
1 µl	RNase-Inhibitor (40 Units/µl)

ad 9 µl H₂O_{DEPC}

1 µl	DNase I, RNase-frei (1 Unit/µl)
------	---------------------------------

30 min 37°C

Der DNA-Verdau wurden nach Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) bei 65°C für 10min gestoppt. Die DNA-freie RNA wurde anschließend gefällt (2.2.6) und ihre Konzentration photometrisch bestimmt (2.2.3).

2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Gesamt-RNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) bestimmt. Die Absorption von Nukleinsäuren wurde bei 260 nm gemessen. Die Konzentration errechnet sich mit Hilfe der Absorption wie folgt:

$$\text{RNA-Konzentration (µg/ml)} = \text{Absorption}_{\lambda 260} \times 40$$

Die Reinheit der Nukleinsäure ergibt sich aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm. Nach (Sambrook und Russel, 2001) gilt ein Verhältnis von $\text{Abs}_{\lambda 260} / \text{Abs}_{\lambda 280} = 2,000$ als guter Reinheitsgrad.

2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation) wurde wie von Birnboim und Doly (1979) beschrieben ausgeführt. Als einzige Veränderung wurden zwei mal 1,5 ml einer Übernachtskultur zu Beginn des Verfahrens pelettiert, da so eine größere Menge Plasmid gewonnen werden konnte.

2.2.5 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion wurde in Anlehnung an Sambrook und Russel (2001) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde hierbei zunächst mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und kräftig durchmischt. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation voneinander getrennt. Die wässrige Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und so lange erneut mit Phenol/Chloroform extrahiert, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Zur Entfernung von Phenolrückständen wurde die wässrige Phase in einem letzten Schritt mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Die so gereinigten Nukleinsäuren wurden anschließend aus der wässrigen Phase präzipitiert (2.2.6).

2.2.6 Nukleinsäurepräzipitation

Die Nukleinsäuren wurden mit eiskaltem Ethanol unter Verwendung hoher Salzkonzentrationen präzipitiert. Die Gesamt-RNA wurde mit 1/10 Vol. 4 M LiCl und 2,5 Vol. Ethanol absolut über Nacht bei -20°C oder für 2 h bei -70°C gefällt. Die Fällung von DNA erfolgte mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol absolut ebenfalls über Nacht bei -20°C oder für 2 h bei -70°C . Im Anschluss an die Fällung wurden die Nukleinsäuren für 40 min bei 13.000 Upm und 4°C sedimentiert. Das Sediment wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und im Savant Speed Vac Concentrator (Global Medical Instrumentation Inc., Ramsay, USA) getrocknet. Die Nukleinsäure wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.7 Restriktion von Nukleinsäuren

Zur Größenermittlung und Mengenabschätzung isolierter Plasmid-DNA (2.2.4) sowie im Rahmen der cRNA-Synthese (2.2.16) wurden diese mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert und anschließend in einem 1%-igen Agarosegel (2.2.8.2) analysiert. 1 μl der DNA-Lösung wurde in einem 20 μl -Ansatz mit 2 μl 10 x Reaktionspuffer und 10 Units (U) Restriktionsenzym bei dem vom Hersteller angegebenen Temperaturoptimum 1 h lang inkubiert.

2.2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

2.2.8.1 Auftrennung von RNA

Die Gesamt-RNA aus Ebereschen (2.2.1) wurde in einem denaturierenden, 1,5%-igen 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)-Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Für ein Minigel (8.0 x 6.5 cm) wurden 0,75 g Agarose in 44 ml ddH₂O und 5 ml 10 x MOPS durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf etwa 65°C erfolgte die Zugabe von 0,9 ml 37%-igem Formaldehyd. Zur Probenvorbereitung wurde die Probe mit dem entsprechenden Volumen 5 x Probenpuffer versetzt und für 15 min bei 65°C denaturiert. Die Elektrophorese in der Mini-Gelkammer (Biometra, Göttingen) erfolgte bei 50 V.

Die Dokumentation des Gels wurde unter UV-Durchlicht mit Hilfe einer Video-Dokumentationsanlage (GelVue UV Transilluminator, Syngene) durchgeführt.

Als Längenstandard diente der RNA-Ladder High Range von Fermentas (St. Leon-Rot).

10 x MOPS:

200 mM MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
pH 7,0

5 x Probenpuffer:

16 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung
80 µl 500 mM EDTA
100 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid
720 µl 37 % Formaldehyd

MOPS-Formaldehyd-Laufpuffer:

1 x MOPS
0,75 % Formaldehyd

2 ml 100 % Glycerol
3084 µl Formamid
4 ml 10 x MOPS
auf 10 ml mit ddH₂O auffüllen

2.2.8.2 Auftrennung von DNA

Plasmid-DNA wurde in einem nativen, 1%-igen Agarosegel, PCR-Produkte unter 700 bp in einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für ein 1%iges Minigel (8.0 x 6.5 cm) wurde 0,5 g Agarose in 50 ml 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst

und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (f.c.) versetzt. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit dem sechsfach konzentrierten Probenpuffer LB III versetzt.

Die Elektrophorese erfolgte in der Mini-Gelkammer (Biometra, Göttingen) bei 80-90 V. Das Gel wurde unter UV-Durchlicht mit einer Video-Dokumentationsanlage (GelVue UV Transilluminator, Syngene, Cambridge, Großbritannien) fotografiert.

Als Längenstandards dienten der pUC-Mix 8, sowie der DNA-Ladder Low Range (beide von Fermentas, St. Leon-Rot).

10x TBE-Puffer:

90 mM Tris
90 mM Borat
2 mM EDTA, pH 8,0

6x Probenpuffer LB III:

0,25% Bromphenolblau
30% Glycerin
6 x TBE
0,5 µg/ml Ethidiumbromid

Laufpuffer:

1x TBE
0,5 µl/ml Ethidiumbromid

2.2.9 TA-Klonierung

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen des *E. coli*-Stammes DH5a erfolgte in Anlehnung an Inoue *et al.* (1990).

RT-PCR-Produkte von Teilsequenzen gesuchter Gene der Eberesche wurden mittels degenerierter, bzw. abgeleiteter Primer erzeugt (Tabelle 2) und wie folgt in den pCR II[®]-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) ligiert:

5 µl	frisches RT-PCR-Produkt
2 µl	10x Ligationspuffer
2 µl	T4-Ligase
10 µl	H ₂ O _{DEPC}
1 µl	pCR II [®] -Vektor

Der Ansatz wurde über Nacht bei 22°C inkubiert.

Für die Transformation wurden 10 µl Ligationsprodukt und 100 µl chemisch kompetente DH 5a-Zellen verwendet. Die Selektion der Bakterienklone erfolgte nach Herstelleranleitung unter Verwendung von Ampicillin und einem Blau/Weiß-Screening.

2.2.10 Sequenzierung der rekombinanten Plasmide

Sequenzreaktionen wurden unter Verwendung des „Big Dye-Terminator-Kits“ (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Herstellerangaben durchgeführt. 200 ng Plasmid-DNA, sowie vektorspezifische T7 und SP6 Primer wurden eingesetzt. Das Programm BIG DYE ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Im Anschluss wurden die Ansätze bei Raumtemperatur mit 45 µl Ethanol gefällt, einmal mit 70% Ethanol gewaschen und bei 13.000 Upm für 20 min sedimentiert. Das Sediment wurde schließlich im Speed Vac Concentrator (Savant) getrocknet.

Der Gellauf sowie die Auswertung erfolgten im Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie des Universitäts Krankenhauses Eppendorf (UKE) unter Verwendung des 3100 Genetic Analysers (Applied Biosystems, Darmstadt).

2.2.11 Computerauswertung / Sequenzanalysen

Sämtliche Datenbankrecherchen wurden unter Verwendung der Datenbank BLAST des NCBI vorgenommen. Für Sequenzanalysen (Editing, Homologieabgleich, Translation) wurde die Software Lasergene, DNASTAR (GATC Biotech AG, Konstanz) verwendet.

2.2.12 Primerdaten

Für die RT- und PCR-Experimente zur Klonierung von Teilen Ebereschen-spezifischer Gene wurden folgende Primer verwendet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Daten der Primer für die Klonierung von Ebereschen-spezifischen Genabschnitten.

	Sequenz [5'>3']	T _m [°C]
1A-Tubulin FP	CTC TGG TCT CGG GTC TCT TCT TTT	62
1A-Tubulin RP	AGG CAC GCT TGG CAT ACA	56
2.Ubiquitin FP	TAC AAC ATC CAG AAG GAG TCC AC	61
3.Ubiquitin RP	CCA GCA AAG ATC AGC CTC TGC TG	64
Actin.cons 1 FP	CTC CCT CAT GCC ATC CTT CGT	61
Actin.cons 289 RP	CCA GCA GCT TCC ATT CCA AT	57
2.Polym II FP	CAT MGT GCT GGA GCG GAA YAT GCA	64
3.Polym II RP	GGA ATC AAA TGG TTK GAC ACR AAG AT	60

Die mit RP bezeichneten Primer wurden in die Reverse Transkription eingesetzt. Die mit FP bezeichneten Primer wurden in die PCR-Reaktionen eingesetzt. **R** (A oder G), **Y** (C oder T), **K** (G oder T).

Die Primer für Tubulin, Ubiquitin, Actin und eine Untereinheit der RNA-Polymerase II wurden von folgenden Datenbankeinträgen, bzw. deren resultierenden Consensus-Sequenzen abgeleitet:

Tubulin (1A-Tubulin FP, 1A-Tubulin RP): *Prunus amygdalus* X67162, *Populus tremuloides* EF583814, *Triticum aestivum* DQ435664 und *Hordeum vulgare* HVU40042.

Ubiquitin (2.Ubiquitin FP, 3.Ubiquitin RP): *Oryza sativa* AF184280, *Arabidopsis thaliana* NM178969, *Petroselinum crispum* X64344, *Malus x domestica* cultivar Fuji EU586196 und *Triticum aestivum* EU081898.

Actin (Actin.cons 1FP, Actin.cons 289RP): *Pyrus communis* AF386514, *Glycine max* GMU60502 und *Oryza sativa* X16280

UE der RNA-Polymerase II (2.Polym II FP, 2.Polym II RP): *Zea mays* AF519538 und *Glycine max* M90504.

Die 18S rRNA-spezifischen Primer (1.18S FP und 2.18S RP) gehen auf den Klon V77 2/1_4.13 zurück (Tabelle 1).

Tabelle 3: Daten der Ebereschen-RNA- und EMARAV-spezifischen Primer für qRT-PCR-Experimente.

	Herkunft	Sequenz [5'>3']	Tm [°C]	Produktlänge [bp]
1.18S FP	18S rRNA	TTC AAA GAT TAC CCG GGC CTG TC	60	109
2.18S RP		GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC CCT	60	
3.Tubulin FP	mRNA Tubulin	ATG ATA TCT GCA GGC GCT CTC TTG	60	81
3.Tubulin RP		AGG AAA TGA CCT GAG ACA CAA GGC	60	
1RT.Ubi FP	mRNA Ubiquitin	TTT GCT GGA AAG CAG CTT GAG GAC	60	84
1RT.Ubi RP		ACG AAG CAC CAA ATG GAG AGT GGA	60	
1RT.Actin FP	mRNA Actin	TCC CTC ATG CCA TCT TCG TTT GGA	60	93
1RT.Actin RP		TGG TGA AAG AGT AAC CAC GGT CAG	60	
6.Polym II FP	mRNA UE der RNA-Polymerase II	CAC TTG CAG TGG CCA ACA TGG ATT	60	82
4.Polym II RP		TGT CCC GTC ACG AAT CAT CCC TTT	60	
1.277 FP	RNA1	AGA GGA TAC TGT ATG CAC CAC CCA	60	84
1.360 RP		CAT GCC TCT GCA TCT CTA TAA GGG	60	
2.2174 FP	RNA 2	AGG ATT CGA TCT ACT GAT GCT GGC	60	82
2.2255 RP		ATG CGT GGG TAT GAA GAC AGG CAA	60	
3.630 FP	RNA 3	TCT CTC GGA CTG AAA GAG AAA GCT GC	60	81
3.710 RP		TGG GCT TAG ATT GAT CTG TCC TGC	60	
4.570 FP	RNA 4	CTA CAA GAG CAA CTC CAG TCT ATC AG	60	81
4.650 RP		CTG AGT CAC CAT GGG TAA TTG CTG	60	

Die mit RP bezeichneten Primer wurden in die Reversen Transkriptionen eingesetzt. Die mit FP bezeichneten Primer wurden in die PCR-Reaktionen eingesetzt.

Die in Tabelle 4 dargestellten Primer dienten der Überprüfung von rekombinanten Klonen bzw. wurden für Sequenzreaktionen eingesetzt.

Tabelle 4: Vektor-spezifische Primer zur Überprüfung der Klonierung und zur Sequenzierung.

	Sequenz [5'>3']	Tm [°C]
SP 6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	47
T 7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	54
M 13 FP	GTA AAA CGT CGG CCA G	50
M 13 RP	CAG GAA ACA GCT ATG AC	43

Tabelle 5: In *in situ*-RT-PCR-Experimenten verwendete Primer

	Sequenz [5'>3']	verwendet bei [°C]	Produktlänge [bp]
5.18S FP	AAG TTT CAG CCT TGC GAC CA	56	708
5.18S RP	AGG CGC GCA AAT TAC CCA AT	56	
5.Tubulin FP	ATG TGC CTC GCG CTG TGT TT	56	792
5.Tubulin RP	CAT CAC CAC GGT ACA TCA GAC	56	
2.1461 FP	GTT TTT GTG AAT CGC TTG TAT CTG	56	794
2.2255 RP	ATG CGT GGG TAT GAA GAC AGG CAA	56	
4. 349 FP	TCA AAC TGC TCA CAA GGT AAT CAT	56	679
83.1	GGA ATT CAC AAC ATA AGC ACA AA	56	

Die mit RP bezeichneten Primer (und 83.1) wurden in die Reversen Transkriptionen eingesetzt.

2.2.13 Erststrangsynthese mittels Reverser Transkription

Zur späteren Klonierung von mRNA-entsprechenden Sequenzen wurden ca. 2 µg Gesamt-RNA aus Ebereschen mit der MMuLV-Reversen Transkriptase (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Anleitung des Herstellers in cDNA überschrieben. Die eingesetzten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt.

In die folgende PCR (2.2.14) wurden jeweils 2 µl des Erststrangsynthese-Ansatzes eingesetzt. Falls diese nicht unmittelbar danach erfolgte, wurde die cDNA bei 4°C zwischengelagert.

Zur Herstellung von cDNA für real time PCR-Experimente wurde ausschließlich mit DNase I behandelte Gesamt-RNA (2.2.2) eingesetzt. Die für die Revese Transkription verwendeten Primer sind Tabelle 3 zu entnehmen. Je nach Fragestellung wurden bei den EMARAV-spezifischen Oligonukleotiden viral-genomische (vg) oder viral-copy (vc)RNA-bindende Primer eingesetzt.

Die Reaktionen wurden wie folgt durchgeführt:

10 µl Reaktionsansatz:

100 ng	Gesamt-RNA (DNA-frei)
1 µl	Primer (1 µM)
2 µl	5x RT-Puffer
0,5 µl	dNTPs (je 10mM)
ad 9,3 µl H ₂ O _{DEPC}	

10 min 70°C, anschließend sofort auf Eis und Zugabe von

0,5 µl	MMuLV-Reverse Transkriptase
0,3 µl	RNase-Inhibitor (40 Units/µl)

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 50°C inkubiert. In die folgende real time PCR wurden jeweils 2 µl der Erststrangsynthese eingesetzt. Falls diese nicht unmittelbar erfolgte, wurde die cDNA bei 4°C zwischengelagert.

2.2.14 Standard-PCR-Reaktionen

Alle Standard-PCR-Reaktionen wurden in den Gradientencyclern mit der Bezeichnung Mastercycler® oder Mastercycler® ep der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt.

Für die Standard-PCR-Reaktionen wurde folgender Ansatz verwendet:

2 µl	Erststrang-cDNA oder Bakterienmaterial einer einzelnen Kolonie
1µl	Erststrangprimer (20 pmol/µl)
1µl	Zweitstrangprimer (20 pmol/µl)
1 µl	dNTP Mix (10 mM)
5 µl	10 x PCR-Puffer
1 µl	Taq-Polymerase
ad 50 µl H ₂ O _{DEPC}	

In nachstehender Tabelle sind sämtliche verwendeten PCR-Programme aufgeführt. Alle Programme starten mit einem Denaturierungsschritt von 3 min bei 94°C und enden mit einer Kühlung auf 4°C.

Tabelle 6: Verwendete PCR-Programme

Programm	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen	Finale Elongation
A50EX2	94°C, 30sec	50°C, 1 min	72°C, 2 min	30	72°C, 6 min
A57EX2	94°C, 30sec	57°C, 1 min	72°C, 2 min	30	72°C, 6 min
A60 EX 1,5	94°C, 30sec	60°C, 30 sec	72°C, 1,5 min	30	72°C, 3 min
BIG DYE 50°C	96°C, 20 sec	50°C, 20 sec	60°C, 4 min	25	60°C, 4 min
GR 48 60 e1	94 °C, 45 sec	Gradient 48 bis 60°C, 1 min	72°C, 1 min	30	72°C, 5 min
GR 50 62 e1	94 °C, 45 sec	Gradient 50 bis 62°C, 1 min	72°C, 1 min	30	72°C, 5 min
GR 54 66 e1	94 °C, 45 sec	Gradient 54 bis 66°C, 1 min	72°C, 1 min	30	72°C, 5 min
GR5060E2	94°C, 1 min	50-60°C, 1 min	72°C, 2 min	30	72°C, 5 min
Qpcr 60 45 sec	94 °C, 45 sec	60°C, 45 sec	72°C, 1 min	30	72°C, 5 min
SP6 T7 90 sec	94 °C, 30 sec	53°C, 30 sec	72°C, 1:30 min	30	72°C, 3 min

2.2.15 qPCR-Reaktionen

Die qRT-PCR-Experimente wurden im iCycler der Firma Biorad (München) durchgeführt.

Für die real time PCR-Reaktionen wurde folgender 25 µl Ansatz verwendet:

2 µl	Erststrang-cDNA
2,5 µl	Erststrangprimer (1µM)
2,5 µl	Zweitstrangprimer (1µM)
12,5 µl	qPCR MasterMix Plus for SYBR [®] Green I
5,5 µl	H ₂ O _{DEPC}

Folgendes PCR-Programm wurde im iCycler verwendet:

Hitzeaktivierung der Polymerase für 10 min bei 95°C

45 x	{ 30 sec 95°C Denaturierung 30 sec 60°C Annealing 30 sec 72°C Elongation
------	--

Anschließend wurde das PCR-Produkt von 55°C beginnend in 90 0,5°C-Schritten aufgeschmolzen. Die Fluoreszenzintensität des Sybr Green wurde in jedem der 45 Zyklen vor der Denaturierung und während des gesamten Schmelzprozesses detektiert.

2.2.15.1 Mathematische Behandlungen der C_T -Werte aus qPCR-Experimenten

Jede Probe wurde im Triplet bearbeitet. Falls ein Wert deutlich von den anderen beiden abweicht, wurde dieser von weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Der Schwellenwert, der die Zyklenzahl, bei der die gemessenen Fluoreszenz über den Schwellenwert hinausgeht, also den C_T -Wert bestimmt, wurde von der iCycler Software festgelegt.

Um Schwankungen zwischen den einzelnen real time PCR-Reaktionen rechnerisch minimieren zu können, wurde bei jedem Lauf eine Referenz-Verdünnungsreihe mit einem Plasmid bekannter Konzentration durchgeführt und deren Effektivität ermittelt (Kalibrierung). Den C_T -Werten der PCR mit der geringsten Effektivität (z.B. 85%) wurde der Faktor 1 zugeordnet. Einer zweiten Reaktion mit einer höheren Effektivität y der Plasmid-Verdünnungsreihe wurde demnach der Faktor $x = 85 / y$ zugeordnet. Alle C_T -Werte dieser PCR wurden somit um diesen Faktor korrigiert.

Alle virusspezifischen C_T -Werte wurden außerdem normalisiert. Die Normalisierungsfaktoren sind gewebs-, versuchsbaum- und monatspezifisch und basieren auf relativierten Expressions (C_T)-Werten von zweien der fünf potentiell konstitutiv exprimierten Gene der Eberesche (Actin, Tubulin, Ubiquitin, 18S rRNA und UE der RNA-Polymerase II) der Eberesche.

W_R : relativer Expressionswert

E : Effizienz des Referenzgens (Ideal: 2)

C_T : *mittlerer* C_T -Wert (Triplikate)

$\min_{C_T}$: niedrigster aller gemittelter C_T -Werte

$$W_R = E^{(\min CT - C_T)}$$

Die relative Genexpression dient der Eingabe in GeNorm.

Welche dieser fünf mRNA-Niveaus sich zur Berechnung von Normalisierungsfaktoren eignen, wurde von dem Programm GeNorm ermittelt.

Eine dritte Korrektur der C_T -Werte basierte auf der unterschiedlichen Effektivität der real time PCR-Reaktionen in Abhängigkeit der verwendeten Primer (Relativierung). Diese wurde in Verdünnungsreihen von synthetischen cRNAs ermittelt (2.2.16). Eine 100%-ige Effektivität entspräche dem Faktor 2.

Abschließend wurden sämtliche kalibrierten, relativierten und normalisierten Ct-Werte für eine graphische Darstellung invertiert (hohe Werte entsprechen hohen RNA-Mengen) und die Standardabweichung berechnet. Sämtliche Berechnungen wurden durch ein von Frau Dr. Heike Pospisil (Universität Hamburg, Zentrum für Bioinformatik) geschriebenes Makro für Excel geleistet.

Nicht nur die Verhältnisse der verschiedenen RNAs untereinander sollte ermittelt werden, sondern auch Größenordnungen von Kopienzahl bestimmt werden. Für diesen Zweck wurde die Eichkurve, die auf den verschiedenen Verdünnungen des Tubulinplasmids basiert, als Grundlage genommen.

2.2.16 Herstellung von cRNAs

Verdünnungsreihen von synthetischen cRNAs wurden genutzt, um die Effektivitäten der in qRT-PCR-Experimenten eingesetzten Primer zu bestimmen. Zur Herstellung EMARAV- bzw. Ebereschenspezifischer Actin-, Tubulin-, 18S rRNA-, Ubiquitin- und RNA-Polymerase II-cRNAs wurden restringierte Plasmide (2.2.7), die entsprechende Sequenzen enthielten, linearisiert und mittels RNA-Polymerasen wie folgt transkribiert:

1-2 µg	linearisiertes Plasmid
2 µl	NTP-Mix (10 mM)
1 µl	RNase-Inhibitor (1Unit/µl)
4 µl	5x Transkriptionspuffer
2 µl	T3, T7 bzw. SP6 RNA-Polymerase
ad 20 µl H ₂ O _{DEPC}	

Die Ansätze wurden für 2 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch RNase-freie DNase I nach Herstellerangaben verdaut und die cRNA gefällt (2.2.6). Es folgt eine Überprüfung in einem denaturierenden 1,5%igen RNA-Agarosegel (2.2.8.1).

Die Auswahl der RNA-Polymerase erfolgte nach Orientierung des Inserts und den auf dem Vektor liegenden RNA-Polymerase-Bindungsbereichen. Die viralen cRNAs entsprechen den vcRNAs, die Ebereschenspezifischen cRNAs der mRNA Sequenz dieser Gene.

In Tabelle 7 sind Details zur cRNA-Synthese aufgeführt.

Tabelle 7: Daten bezüglich der Synthese von EMARAV- und Ebereschen-spezifischen cRNAs.

Klon	Herkunft	Vektor	Restriktions- enzym	RNA- Polymerase	cRNA-Länge [nt]
V103_44	vRNA1	pCR 4.TOPO	Not I	T 3	846
V107.10	vRNA 2	pCR 4.TOPO	Not I	T 3	1472
V133.14	vRNA 3	pGEM T-Easy	Pst I	T 7	1232
V130.19	vRNA 4	pCR 2.1 TOPO	Bam HI	T 7	1477
V 77 2/1_4.13	18S rRNA		Not I	T 3	454
Tubulin Klon 3	Tubulin- mRNA	pCR II	Bam HI	T 7	846
Actin Klon 10	Actin- mRNA	pCR II	Not I	SP 6	437
Ubiquitin Klon 8	Ubiquitin- mRNA	pCR II	Not I	SP 6	551
Polym Klon 8	UE RNA- Polymerase II-mRNA	pCR II	Not	SP 6	459

2.2.17 *In situ*-RT-PCR

Die hier verwendeten *in situ*-RT-PCR-Methoden basieren auf der Arbeit von Koltai und Bird (2000) und wurden nach Beratung mit Herrn Dr. Kryzsof Wieczorek und Herrn Prof. Dr. Florian Grundler (beide Universität für Bodenkunde, Wien) (Grunewald *et al.*, 2008) an die Gegebenheiten des Materials aus der Eberesche angepasst.

2.2.17.1 Einbettung von Pflanzenmaterial

Die Fixierung von Blättern und Blattstielen der Eberesche erfolgte mindestens über Nacht, höchstens 48 h bei 4°C in Fixierlösung. Für eine gute Durchdringung der Gewebe mit Fixierlösung wurden die Blätter in maximal 5 x 2 mm große Stücke geteilt. Die Blattstiele maßen nie mehr als 5 mm Länge.

Fixierlösung:

2% Formaldehyd
63% Ethanol
in PBS-Puffer, pH 7,2

PBS-Puffer inkl. 2% PVP:

10 mM Na_2HPO_4
130 mM NaCl
2% PVP, pH 7,5

Die fixierten Gewebestücke wurden 3 x 10 min in 60% Ethanol und 1 x 10 min in PBS-Puffer gewaschen. Die Einbettung erfolgte semisteril in DEPC-behandelte 8 bis 10%iger Low Melting Point-Agarose in PBS inkl. 2% PVP. Dazu wurden die Proben abgetupft und mittig in die ca. 50°C warme Agarose gelegt. Nach Aushärten der Agarose erfolgte eine Lagerung bei 4°C für ein bis drei Tage.

2.2.17.2 Schneiden des Pflanzenmaterials

Die eingebetteten Proben wurden großzügig aus den Petrischalen präpariert und anschließend in ca. 1 x 1 x 0,5 cm große Blöckchen getrimmt. Diese wurden mit Sekundenkleber auf einem Metallblock befestigt und in das Vibratom eingespannt. Das Schneiden erfolgte unter DEPC-behandeltem Wasser inklusive 2% PVP. Die Schnittdicke lag zwischen 10 und 30 µm.

Bis Proben wurden bis zur weiteren Verwendung, aber maximal über Nacht, bei 4°C in $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ gelagert.

2.2.17.3 *In situ*-Reverse Transkription und anschließende PCR

Für eine effektive RT-PCR-Reaktion, ist eine gute Permeabilität der zellulären Strukturen unbedingt nötig. Die Schnitte wurden daher zu sechs bis zehn Stück in 0,5 ml-Reagiergefäße aufgeteilt und wie folgt behandelt:

- 10 min 100 µl Macerozym (5 mg/ml), 37°C
- 2x mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ inkl. 2% PVP waschen, 4°C
- 10 min 100 µl Pronase (Roche) in PBS (0,125 mg/ml), 37°C
- mit 0,2% Glycin in PBS (2.2.17.1) waschen
- mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ inkl. 2% PVP waschen, 4°C

Anschließend erfolgt eine Reverse Transkription:

1 µl	Erststrangprimer (20 pmol/µl)
2 µl	10 x RT-Puffer
1 µl	dNTPs (je 10mM)
4µl	PEG (35%)
10 µl	H ₂ O _{DEPC} (1%PVP)

für 10 min bei 65°C denaturieren

1 µl	RNase-Inhibitor (40 Units/µl)
1 µl	eAMV-Reverse Transkriptase (Sigma-Aldrich, München)

für 1 h bei 50°C inkubieren

Der Überstand wurde abgenommen und sofort folgende PCR-Reagenzien zugegeben:

0,5 µl	Erststrangprimer (20 pmol/µl)
0,5 µl	Zweitstrangprimer (20 pmol/µl)
2,5 µl	10x PCR-Puffer
0,5 µl	Dig-dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP; 9,5 mM dTTP; 0,5 mM Dig-dUTP, Roche, Mannheim)
5 µl	PEG (35%)
0,5 µl	Tolerant-Taq-Polymerase (Peqlab, Erlangen)
15,5 µl	H ₂ O _{DEPC} (1%PVP)

Um eine bessere Anlagerung der Primer im Gewebe zu erzielen, wurden die Annealingtemperaturen verglichen mit einer Standard-PCR um ca. 3°C gesenkt. Die Elongationszeit wurde trotz kurzer Amplifikate, aus dem gleichen Grund erhöht. Das verwendete PCR-Programm „A56EX2 in situ“ beinhaltet folgende Schritte:

Anfängliche Denaturierung von 5 min bei 94°C, 30 Zyklen mit je 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 56°C, 2 min Elongation bei 72°C. Abschließend folgte ein 5 minütiger Schritt bei 72°C und die Abkühlung auf 4°C bis zur Detektion.

2.2.17.4 Detektion von *in situ*-RT-PCR-Produkten

Nach folgendem Protokoll wurden die Dig-markierten PCR-Produkte detektiert:

- 2x 5 min in PBS waschen (2.2.17.1)
- 30 min in 2% Blocking Reagenz in Maleinsäurepuffer inkubieren
- 1 h in 2% Blocking Reagenz mit anti-Dig-Antikörper (1: 250, Roche, Mannheim)
- 2x 15 min in Detektionspuffer äquilibrieren
- in 250 µl NBT/BCIP-Färbelösung für 30 bis 90 min detektieren

Maleinsäurepuffer:

100 mM Maleinsäure

150 mM NaCl

pH 7,5

Detektionspuffer:

100 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

pH 9,5

2% Blocking- Puffer:

Blocking-Reagenz in Maleinsäurepuffer
lösen

NBT/BCIP-Färbelösung:

6,6 µl NBT (50mg/ml, Promega,
Mannheim)

3,3 µl BCIP (50mg/ml, Promega,
Mannheim)

in 1ml Detektionspuffer

Die Dokumentation erfolgte im Lichtmikroskop Axiovert 35M von Zeiss (Jena).

2.2.17.5 Dapi-Färbungen von Ebereschengewebschnitten

Der DNA-interkalierende Farbstoff Dapi (4',6-Diamidino-2-phenylindol) wurde eingesetzt, um DNA in Ebereschengewebe zu detektieren. Die zuvor mit Macerozym, Pronase und zum Teil mit DNase behandelten Schnitte, wurden mit 1 µg/ml Dapi in ddH₂O für 30 Minuten gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit viel ddH₂O für je 10 Minuten gewaschen. Die Dokumentation erfolgte ebenfalls im Axiovert 35 M von Zeiss (Jena), allerdings unter Verwendung des Dapi-spezifischen Filters (Set 01 von Zeiss, Jena).

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis viraler RNAs in *Sorbus aucuparia* L. mittels *in situ*-RT-PCR

3.1.1 Etablierung der Versuchsbedingungen

Unterschiedliche Lösungen zur optimalen Fixierung des polyphenolreichen Blattgewebes der Eberesche wurden getestet. Für einen Nachweis von RNA ist eine Oxidation dieser Sekundärmetabolite zu vermeiden und die pflanzlichen und viralen RNA-Moleküle vor Abbau zu schützen. Die von (Roche, 2002) empfohlene Fixierlösung, enthielt ausschließlich 4% Formaldehyd in PBS (pH 7,5). Diese Fixierlösung wurde als ungeeignet eingestuft, weil die Ebereschengewebe beim Schneiden am Vibratom oft zerrissen und die daraus resultierenden Schnitte histologisch nicht einwandfrei waren. Mit Hilfe der Fixierung in FAA konnten zwar histologisch gute Schnitte erhalten werden, doch erwiesen sich einzelne Zelltypen teilweise als „deformiert“, was eventuell an dem niedrigen pH-Wert dieser Fixierlösung (ca. pH 3) liegen könnte. Die in dieser Arbeit verwendete Fixierlösung mit einem pH-Wert von 7,2 (2.2.17.1) ermöglichte dagegen histologisch gute Schnitte mit weitgehend intakt aussehenden Zellen.

Die relativ schweren Blatt-, sowie Blattstielstückchen mussten in 10%-iger Low Melting Point Agarose eingebettet werden, um ein Absinken der Proben zum Gefäßboden zu verhindern. Nur vollständig von Agarose umschlossene Proben können mit dem Vibratom geschnitten werden (2.2.17.2).

Häufig wird eine Proteinase in *in situ*-Experimenten genutzt, um die Permeabilität der untersuchten Gewebe zu erhöhen (Silva *et al.*, 2003; Dillon *et al.*, 2007). Mit Proteinase K konnten selten zuverlässige Farbsignale erhalten werden, weshalb als Alternative das Proteinasegemisch Pronase (Roche, Mannheim) getestet wurde. Zusammen mit dem Einsatz der Pectinase Macerozym gelang es dann zuverlässiger Signale zu detektieren.

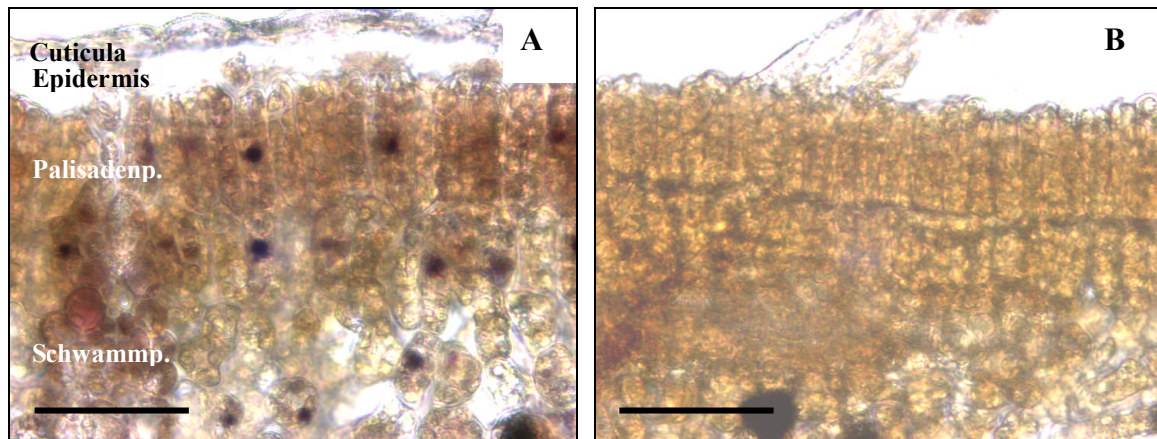
Die in Tabelle 5 dargestellten und in den *in situ*-RT-PCR-Experimenten genutzten Primer wurden zuvor in Standard-RT-PCR-Reaktionen getestet. Die Annelingtemperatur wurde um ca. 4°C gesenkt und die Amplifikationsdauer auf zwei Minuten verlängert (2.2.17.3), um den erschwerten Bedingungen im Gewebe Rechnung zu tragen. Die Ergebnisse dieser Etablierungen sind im Folgenden dargestellt.

Aufgrund der zu erwartenden hohen Konzentration an ribosomaler RNA, wurde die *in situ*-RT-PCR zunächst für die 18S rRNA unter Verwendung der Primer 5.18S FP und 5.18S RP (Tabelle 5, 2.2.12) etabliert.

Abbildung 4 zeigt Blattquerschnitte der Eberesche, die einer *in situ*-RT-PCR-Reaktion mit Dig-markierten Nukleotiden (2.2.17.3) unterzogen und anschließend colorimetrisch detektiert wurden (2.2.17.4). In einigen Zellen des Palisaden- und Schwammparenchyms sind deutliche punktförmige lilafarbene Signale von der Größe eines Zellkerns zu erkennen und auch das Cytoplasma scheint eine leichte Färbung, die auf eine Amplifikation von 18S rRNA hinweisen könnte, zu zeigen. Das in Abbildung 4 B gezeigte Blattgewebe wurde der gleichen Prozedur unterzogen, nur wurde keine Polymerase in die PCR-Reaktion gegeben. Hier sind keine Dig-spezifischen Farbsignale sichtbar.

In einem zweiten Ansatz wurden Tubulin-spezifische Primer (Tabelle 5) gewählt, da dieses Gen zwar konstitutiv exprimiert sein sollte, aber im Vergleich zur ribosomalen RNA eine deutlich geringere mRNA-Konzentration erwarten lässt. Auch hier waren in Palisaden- und Schwammparenchymzellen deutliche punktförmige, sowie diffuse Signale zu erkennen (Abbildung 4C). eine Kontrollreaktion ohne Taq-Polymerase zeigte auch hier keinerlei Signale (Abbildung 4D).

18S rRNA



Tubulin-mRNA

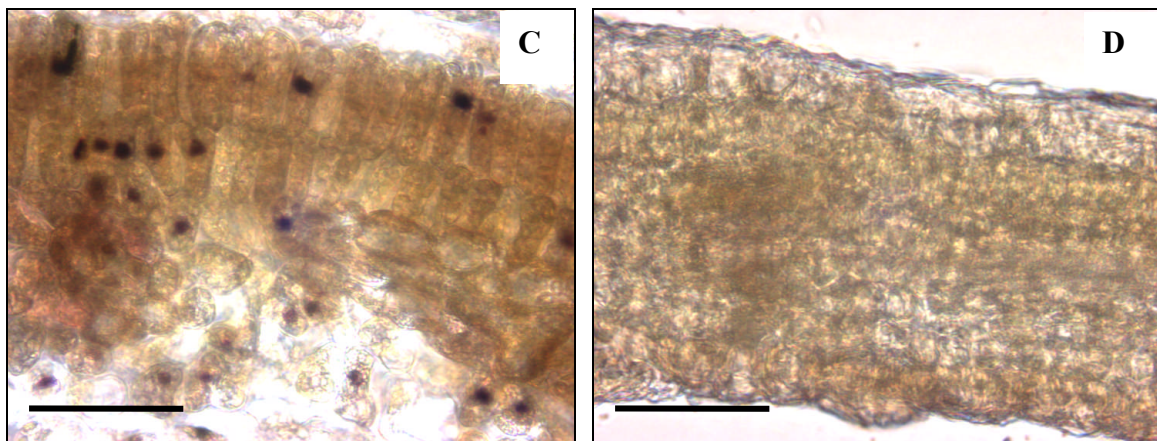


Abbildung 4: Querschnitte von Ebereschenblättern nach *in situ*-RT-PCR. **A:** Als Primer dienen die Ebereschen 18S rRNA-spezifischen Primer 5.18S RP und 5.18S FP. **B:** Ohne Polymerase in der PCR-Reaktion, sonst wie A. **C:** Als Primer dienen 5.Tubulin RP und 5.Tubulin FP, welche spezifisch für die Tubulin-mRNA der Eberesche sind. **D:** Ohne Polymerase in der PCR, sonst wie C. Die Maßstäbe entsprechen 500 μm .

Aufgrund der mechanischen Labilität und der recht intensiven polyphenolbedingten Braunfärbung des Blattgewebes wurden in weiterführenden Versuchen meist Blattstiele verwendet.

Abbildung 5A zeigt ein solches Übersichtsbild eines Blattstielquerschnittes. Die Schnitte wurden der gesamten *in situ*-RT-PCR-Prozedur (2.2.17) unterzogen, wobei erneut die Ebereschen-Tubulin-spezifischen Primer genutzt wurden (Abbildung 5B und Abbildung 5C). Die Blattstielquerschnitte zeigten deutliche cytoplasmatische lilafarbene Signale, welche auf die Amplifikation von Tubulin-mRNA-spezifischen Produkten im Phloem und vereinzelt in

parenchymatischen Xylemzellen schließen lassen könnten. Eine Kontrolle ohne Taq-Polymerase zeigte hingegen keine Amplifikationssignale (Abbildung 5D).

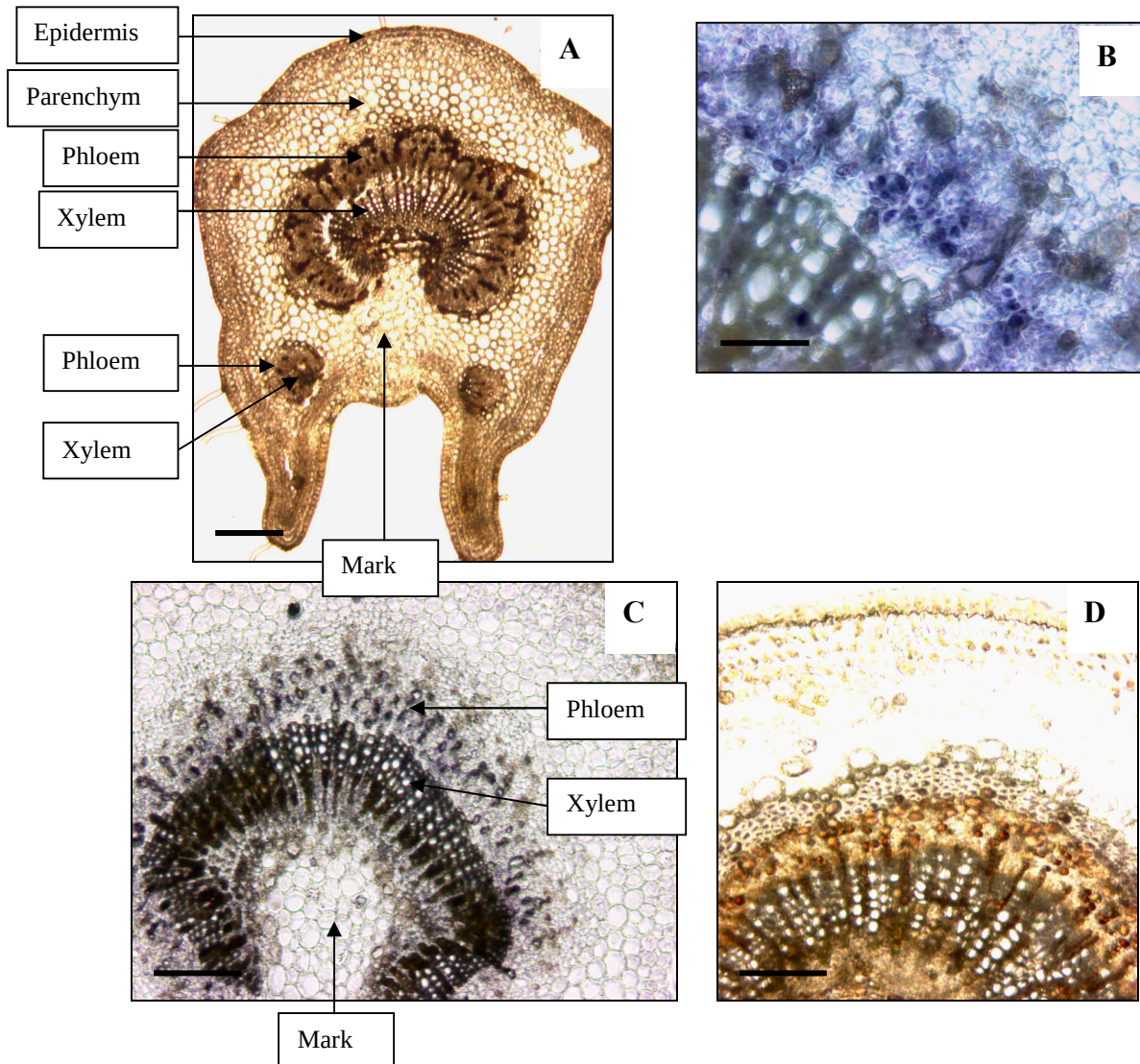


Abbildung 5: Querschnitte von Ebereschenblattstielen nach *in situ*-RT-PCR. Als Primer dienten die Ebereschen-Tubulin-spezifischen Primer 5.Tubulin FP und 5.Tubulin RP. **A:** Übersichtsbild. Ohne Polymerase in der PCR-Reaktion. **B** und **C:** Vollständige *in situ*-RT-PCR-Reaktion inklusive Polymerase. **D:** Ohne Polymerase in der PCR-Reaktion. Die Maßstäbe in **A:** entsprechen 0,1 cm, in **B:** 200 μ m, in **C:** und **D:** 300 μ m.

3.1.2 Nachweis von EMARAV-spezifischen RNAs in Blattstielen

Nachdem es gelungen war, die vermutlich in größeren Mengen vorhandene 18S rRNA und auch die in deutlich geringeren Mengen vorliegende Tubulin-mRNA nachzuweisen, wurde versucht, EMARAV-spezifische RNAs in den Blattstielen mittels der *in situ*-RT-PCR zu lokalisieren. Die hierfür verwendeten Primer sind in Tabelle 5 (2.2.12) aufgeführt.

Abbildung 6A und Abbildung 6C zeigen Ausschnitte von Blattstielquerschnitten des EMARAV-infizierten Baumes B1 nach einer *in situ*-RT-PCR mit vRNA2-spezifischen Primern. Sowohl in Phloemzellen und in parenchymatischen Xylemzellen (A), als auch in Parenchymzellen in Epidermisnähe (C), konnten eindeutig diffuse lilafarbene Signale detektiert werden. Im Gegensatz dazu waren in Schnitten des EMARAV-freien Baumes SF nur schwache Hintergrundsignale zu erkennen (Abbildung 6B und Abbildung 6D).

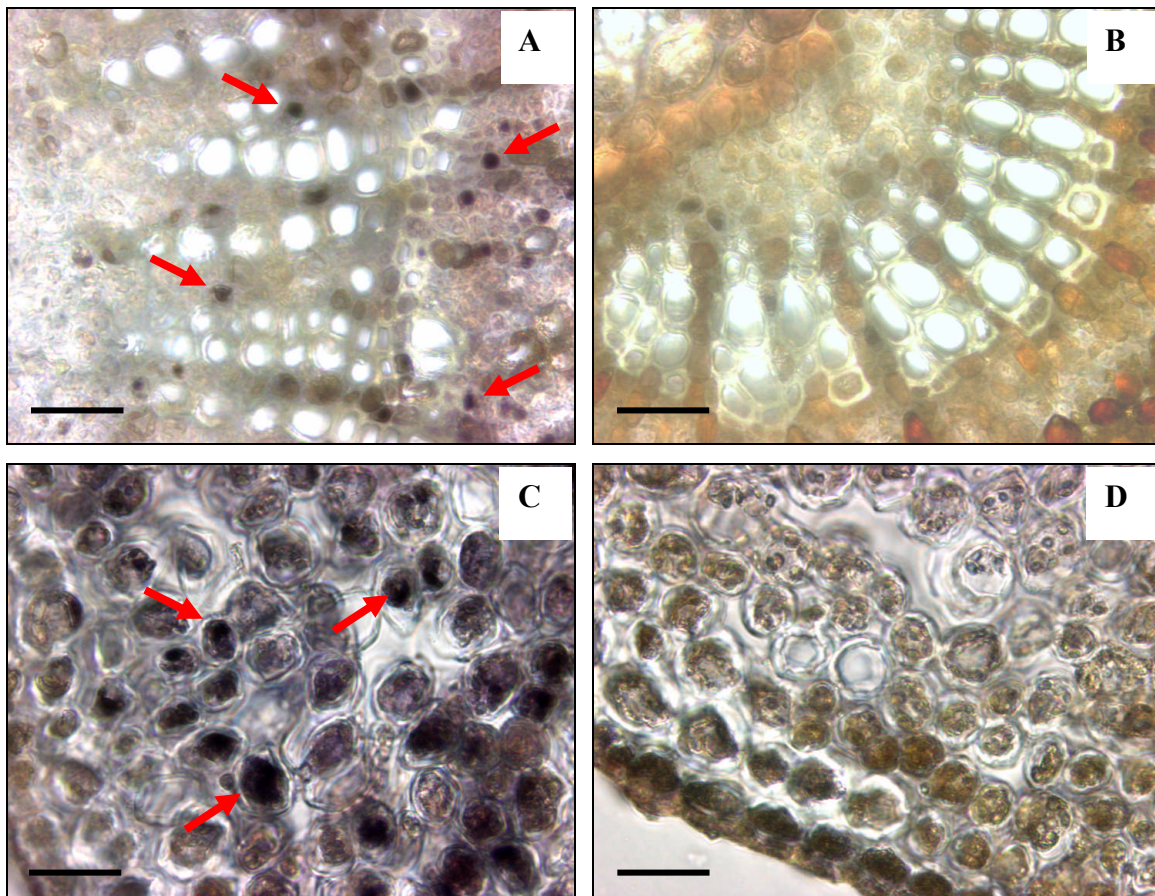


Abbildung 6: Querschnitte von Ebereschenblattstielen nach *in situ*-RT-PCR. Die vRNA2-spezifischen Primer 2.1461 FP und 2.2255 RP wurden verwendet. A und C: EMARAV-infizierter Baum B1. B und D: EMARAV-freier Baum SF. Die Maßstäbe entsprechen 200 µm.

Auch mit einem für die vRNA4-spezifischen Primerpaar gelang es mit diesem Verfahren in Blattstielquerschnitten des EMARAV-infizierten Baumes B1 Signale zu erhalten. Abbildung 7A zeigt eine diffuse Lilafärbung in parenchymatischen Zellen, die aber auch nach Wiederholung schwächer ausfiel, als die für die vRNA2erhaltenen Amplifikationssignale. In EMARAV-freiem Gewebe konnte kein Signal detektiert werden (Abbildung 7B).

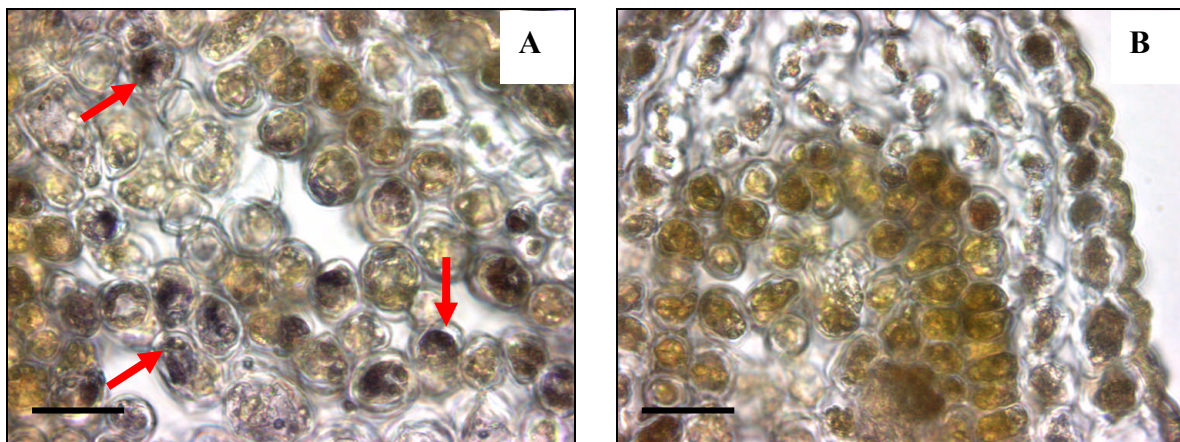


Abbildung 7: Querschnitte von Ebereschenblattstielen nach *in situ*-RT-PCR. Die vRNA4-spezifischen Primer 4.349 FP und 83.1 wurden verwendet. A: EMARAV-infizierter Baum B1. B: EMARAV-freier Baum SF. Die Maßstäbe entsprechen 200 µm.

Für die viralen RNA1 und RNA3 konnten ebenfalls Amplifikationssignale erhalten werden. Da die Signalverteilung im Gewebe und ihre Intensität denen der vRNA2 und vRNA4-spezifischen Signale weitgehend entsprach, wurde von einer Darstellung abgesehen.

3.1.3 Kontrollversuche zur Spezifität der *in situ*-RT-PCR-Signale

Um die Aussagekraft der mit diesem Nachweisverfahren erhaltenen Ergebnisse einschätzen zu können, wurden verschiedene Kontrollversuche durchgeführt. In einem ersten Ansatz sollte eine Dapi-Färbung nach DNase Behandlung des Gewebes klären, ob noch größere Mengen an genomischer DNA vorhanden sind, die eventuell die Ergebnisse der *in situ*-RT-PCR-Reaktionen verfälschen könnten.

Abbildung 8A zeigt exemplarisch einen Querschnitt durch ein Blatt der Eberesche, welches wie für eine *in situ*-RT-PCR fixiert, eingebettet, geschnitten und mit Macerozym und Pronase (2.2.17.1, 2.2.17.2, 2.2.17.3) behandelt wurde. Statt einer RT-PCR-Reaktion erfolgte jedoch eine Dapi-Färbung (2.2.17.5). Deutlich zu erkennen sind die blau fluoreszierenden Zellkerne. Abbildung 8B zeigt ein Blatt, welches direkt vor der Dapi-Färbung noch zusätzlich über Nacht mit DNase behandelt wurde. Die blaue Fluoreszenz der Zellkerne ist nicht mehr

erkennbar. Die Abbildung 8C zeigt den Ausschnitt eines Blattstiels, welcher ebenfalls über Nacht mit DNase behandelt, aber anschließend in eine *in situ*-RT-PCR mit 18S rRNA-spezifischen Primern eingesetzt wurde. Bei vermeintlich vollständigem Abbau genomischer DNA, ist festzustellen, dass sowohl das Cytoplasma, als auch die Zellkerne eine deutliche Dapi-Färbung aufwiesen. Diese beruhte wahrscheinlich auf einer erfolgreichen Amplifikation der 18S rRNA im Cytoplasma und in den Nukleoli.

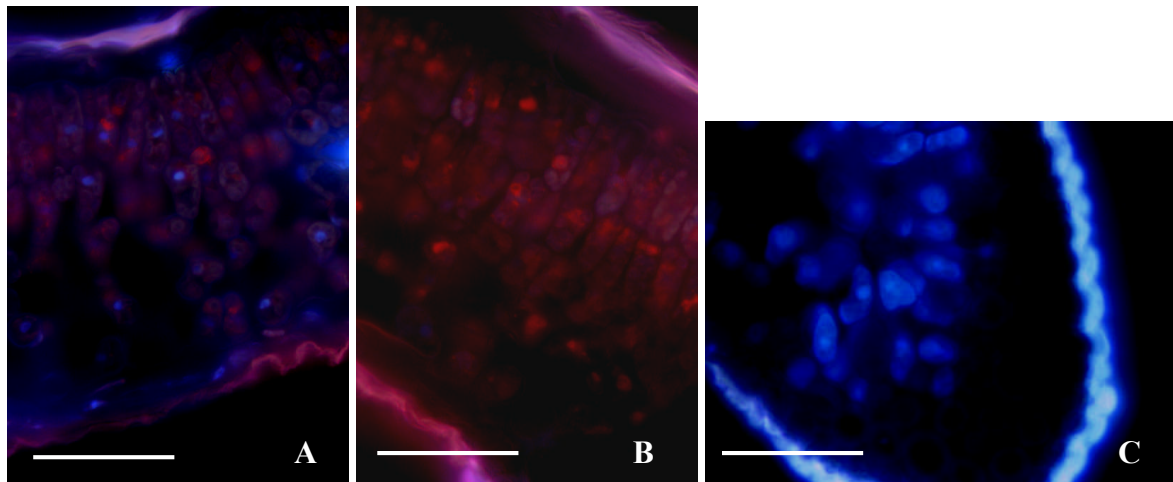


Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten. Die Ebereschengewebe wurden fixiert, eingebettet, geschnitten, mit Macerozym und Pronase behandelt und Dapi gefärbt. A: ohne DNase-Behandlung, B: DNase-Behandlung über Nacht, C: DNase-Behandlung über Nacht, RT-PCR mit 18S rRNA-spezifischen Primern. A, B: Blätter, C: Blattstiel. Die Maßstäbe entsprechen 500 μ m.

In einem weiteren Kontrollversuch wurden Ebereschen-Blattquerschnitte der vollständigen *in situ*-RT-PCR-Prozedur (2.2.17.1, 2.2.17.2, 2.2.17.3) inklusive DNase Behandlung und Detektion (2.2.17.4) unterzogen. Allerdings fehlten sowohl in der Reversen Transkriptions- als auch in der PCR-Reaktion jegliche Primer. Eine violette Farbreaktion, die auf Zellkerne hinweist, war in einigen Ansätzen in mehreren Zellen des Palisadenparenchyms sichtbar (Abbildung 9). Dieser Versuch legt nahe, dass bei Abwesenheit spezifischer Primer wahllos fragmentierte DNA-Moleküle als Primer fungieren könnten und so eine unspezifische Amplifikation von DNA- und oder RNA-Molekülen möglich ist.

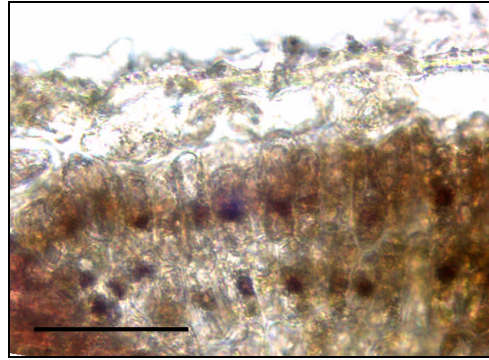


Abbildung 9: Ebereschen-Blattquerschnitt fixiert, eingebettet, geschnitten und mit Macerozym und Pronase und DNase behandelt. Die *in situ*-RT-PCR wurde ohne Primer, aber mit Dig-markierten Desoxinukleotiden durchgeführt und anschließend detektiert. Der Maßstab entspricht 500 µm.

3.2 Analysen zur Lokalisation und Quantifizierung von EMARAV-spezifischen RNAs in der Eberesche

Trotz intensiver Anstrengungen um eine Optimierung des Verfahrens der *in situ*-RT-PCR ließen sich keine eindeutigen Aussagen bezüglich der Lokalisation und Quantifizierung der EMARAV-spezifischen RNAs treffen. Daher wurde im zweiten Teil der Arbeit das sensitive und besser etablierte Verfahren der quantitativen real time RT-PCR eingesetzt. In dieser Arbeit wird real time RT-PCR zukünftig als qRT-PCR bezeichnet.

3.2.1 Klonierung von Genabschnitten aus der Eberesche als potentielle interne Standards

Zur Normalisierung von qRT-PCR-Daten (2.2.15.1) sollten im Rahmen dieser Arbeit mRNAs weitgehend konstitutiv exprimierter Gene der Eberesche als interne Standards verwendet werden. Als potentielle Standards wurden Transkripte von Actin, Tubulin, einer Untereinheit der DNA-abhängige RNA-Polymerase II, Ubiquitin und die 18S rRNA in Betracht gezogen, da diese häufiger als geeignete Standards in Pflanzen beschrieben wurden (Kim *et al.*, 2003; Volkov *et al.*, 2003; Czechowski *et al.*, 2005; Nicot *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2006; Gonzalez-Verdejo *et al.*, 2008). Sequenzinformationen über diese Gene lagen für die Eberesche nicht vor, weshalb zunächst Primer von bekannten Sequenzen anderer Pflanzen abgeleitet (2.2.12) und die daraus erhaltenen RT-PCR-Produkte (2.2.13 und 2.2.14) kloniert und sequenziert wurden (2.2.9 und 2.2.10). Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA aus Ebereschenblättern.

3.2.2 Ebereschen-spezifische mRNA-Sequenz von Actin

Durch Verwendung der Primer Actin.cons 1 FP und Actin.cons 298 RP (2.2.12) gelang es mit Annelingtemperaturen von 54, 58 und 62°C unter Verwendung des Programms GR 54 66 e1 (Tabelle 6, 2.2.14) ein ca. 300 bp langes RT-PCR-Produkt aus Gesamt-RNA zu amplifizieren (Abbildung 10A, Spuren 1 bis 3). Die Klonierung und Sequenzierung des Amplifikats (Klon Actin 6) ergab eine 308 bp lange DNA-Sequenz, die in der Datenbank eine maximale Identität von 98% mit der Actin mRNA-Sequenz von *Pyrus communis*, Rosaceae (AF386514) teilt (2.2.11, Abbildung 10B). Die Ebereschen-spezifische mRNA-Actin Teilsequenz ist online (NCBI) verfügbar (DQ849001).

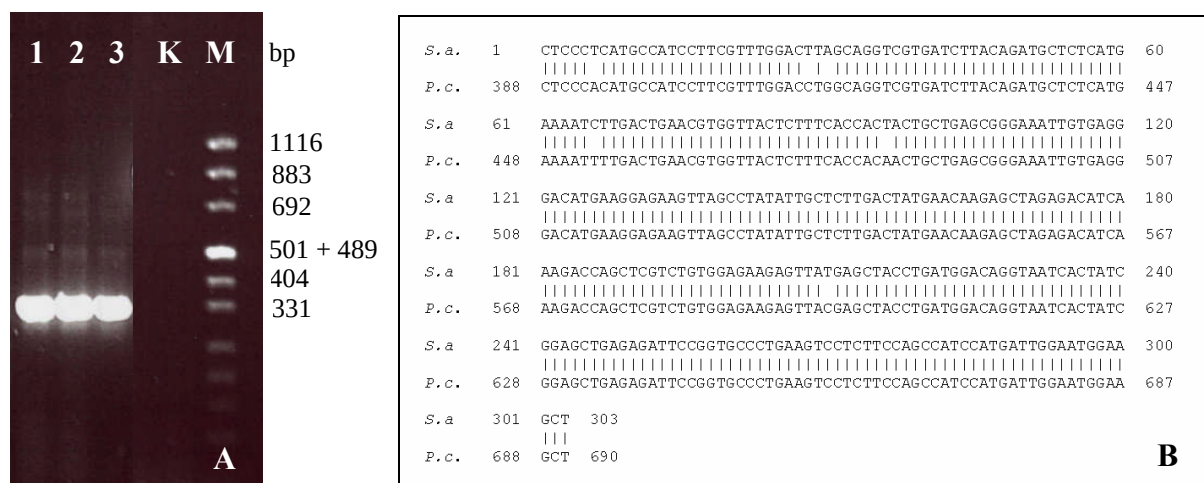


Abbildung 10: Fragment der Actin-cDNA aus *Sorbus aucuparia* L. A: Gelelektrophoretische Auftrennung von potentiell Actin-mRNA-spezifischen RT-PCR-Produkten die mit Hilfe der abgeleiteten Primer actin.cons 289 RP und actin.cons 1 FP (Tabelle 2) bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen amplifiziert wurden. Spur 1: 54°C, Spur 2: 58°C, Spur 3: 62°C, K: Wasserkontrolle, M: pUC-Mix Marker 8. Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA der Eberesche. **B:** Sequenzvergleich zwischen der *Sorbus aucuparia*- (*S.a.*) und der *Pyrus communis*- (*P.c.*) spezifischen mRNA Sequenz des Actins.

3.2.3 Ebereschen-spezifische mRNA-Sequenz von Tubulin

Die für Actin beschriebene Vorgehensweise (3.2.2) führte auch zur Amplifikation eines Ebereschen- α -Tubulin-spezifischen Genabschnitts. In der RT-PCR wurden die Primer 1A-Tubulin FP und RP (Tabelle 2) verwendet. Abbildung 11A zeigt die erfolgreiche RT-PCR mit Annealingtemperaturen von 58, 62 und 68°C, bei der scheinbar zwei Produkte amplifiziert wurden, die sich im Gel als Doppelbande darstellen. Möglicherweise handelt es sich um eine Gen- und eine mRNA-spezifische Sequenz. Die Sequenzierung (2.2.10) zweier Klone (3 und 10) ergaben eine 773 bp lange Tubulin-spezifische mRNA-Sequenz (DQ846866), die eine 93%-ige Identität mit der mRNA des α -Tubulins der Mandel (*Prunus dulcis* / *amygdalus*, Rosaceae X67162), (Stocker *et al.*, 1993) aufweist (Abbildung 11B).

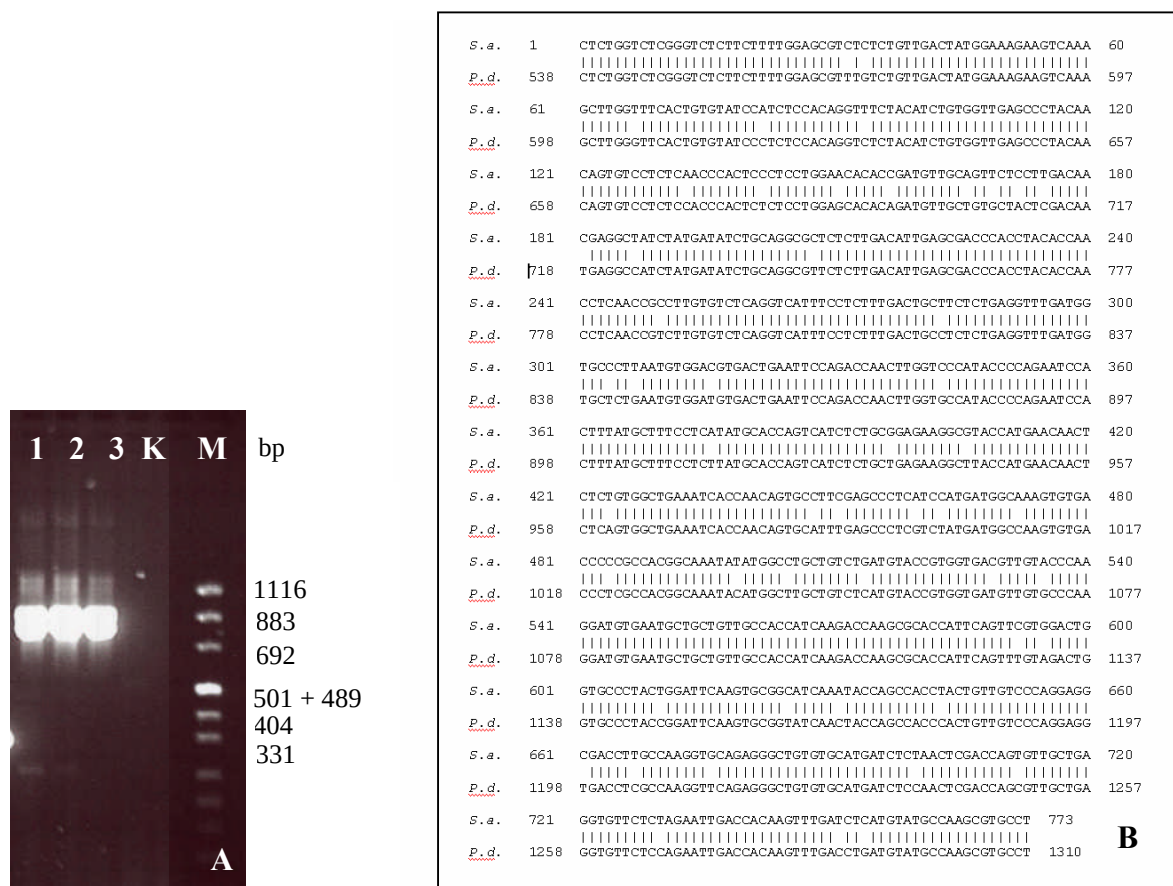


Abbildung 11: Fragment der Tubulin-cDNA aus *Sorbus aucuparia* L. A: Gelelektrophoretische Auftrennung von Tubulin-mRNA-spezifischen RT-PCR-Produkten, die mit Hilfe der abgeleiteten Primern 1A-Tubulin RP und FP (Tabelle 2) bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen amplifiziert wurden. (Programm GR 54 66 e1, Tabelle 6, 2.2.14). Spur 1: 58°C, Spur 2: 62°C, Spur 3: 66°C. M: pUC-Mix Marker 8. Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA der Eberesche. **B:** Sequenzvergleich zwischen der *Sorbus aucuparia*- (S.a.) und der *Prunus dulcis* / *amygdalus*- (P.d.) spezifischen mRNA Sequenz des α -Tubulins.

3.2.4 Ebereschen-spezifische mRNA-Sequenzen von Ubiquitin

Durch den Einsatz der Primer 2.Ubiquitin FP und 3.Ubiquitin RP (Tabelle 2) in RT-PCR-Experimenten gelang es ebenfalls bei verschiedenen Primerannealingtemperaturen (57, 60 und 65°C) neben zusätzlichen Produkten unter anderem ein PCR-Produkt der Größe von etwa 430 bp zu amplifizieren (Abbildung 12A, Spuren 1 – 3). Ein Fragment dieser Länge wurde aufgrund der Alignements der unter 2.2.12 angeführten Ubiquitin-spezifischen Sequenzen anderer Pflanzen erwartet. Nach Gelelektion und Klonierung ergab sich ein 422 bp langes Teilstück der Polyubiquitin-mRNA der Eberesche (Klon 8), welches sich aus einem 54 Basenpaar langem Ende eines Ubiquitin-Open reading frames (ORF), einem kompletten ORF (228 bp) und einem 140 bp langen Anfang des nächsten Ubiquitin-ORFs zusammensetzt (Abbildung 12B). In der insgesamt 422 bp langen Ebereschen-spezifischen Sequenz (DQ846865) befindet sich kein Intron. Sie weist eine 92%-ige maximale Identität mit der Ubiquitin-mRNA von *Malus domestica*, *Rosaceae* (MDU74358) auf (Abbildung 12 C).

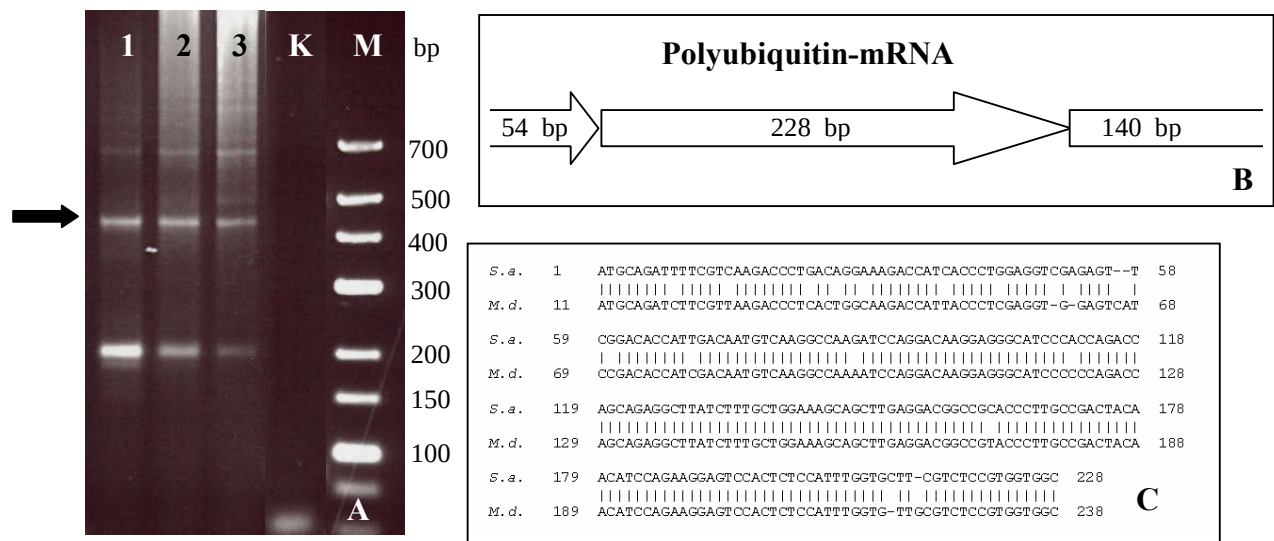


Abbildung 12: Fragment der Ubiquitin-cDNA aus *Sorbus aucuparia* L. **A:** Gelelektrophoretische Auftrennung von potentiell Ubiquitin-mRNA-spezifischen RT-PCR-Produkten, die mittels der Primer 2.Ubiquitin FP und 3.Ubiquitin RP (Tabelle 2) bei verschiedenen Annelingtemperaturen amplifiziert wurden. (Programm GR 54 66 e1, Tabelle 6, 2.2.14). Spur 1: 57°C, Spur 2: 60°C, Spur 3: 65°C, K: Wasserkontrolle M: DNA-Ladder Low Range. Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA der Eberesche. **B:** Graphische Darstellung der Teilsequenz des Polyubiquitin von *Sorbus aucuparia*. **C:** Sequenzvergleich zwischen dem ORF von *Sorbus aucuparia*- (*S.a.*) und der *Malus domestica*- (*M.d.*) spezifischen Ubiquitinsequenz.

3.2.5 Ebereschen-spezifische mRNA-Sequenz der fünft größten UE der RNA-Polymerase II (RPB7)

Mittels der degenerierten Primer 2.Polym II FP und 3.Polym II RP (Tabelle 2) gelang es, ein Produkt der gesuchten Größe von etwa 330 bp zu amplifizieren (Abbildung 13A, Spuren 1 bis 5.). Trotz verschiedener gewählter Annealingtemperaturen (51, 54, 56, 58, 60°C) wurden zahlreiche Nebenbanden erhalten. Daher wurde das Produkt vor der Klonierung aus dem Gel eluiert (2.1.3). Die Sequenzierung von Klon 8 ergab ein 330 bp langes Fragment (DQ846864), dessen Aminosäuresequenz im Blastx die größte Übereinstimmung mit der fünft-größten Untereinheit (RPB7, Untereinheit 7) der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II (RNA polymerase II subunit B7) von *Glycine max*, Fabaceae (P46279) zeigt.

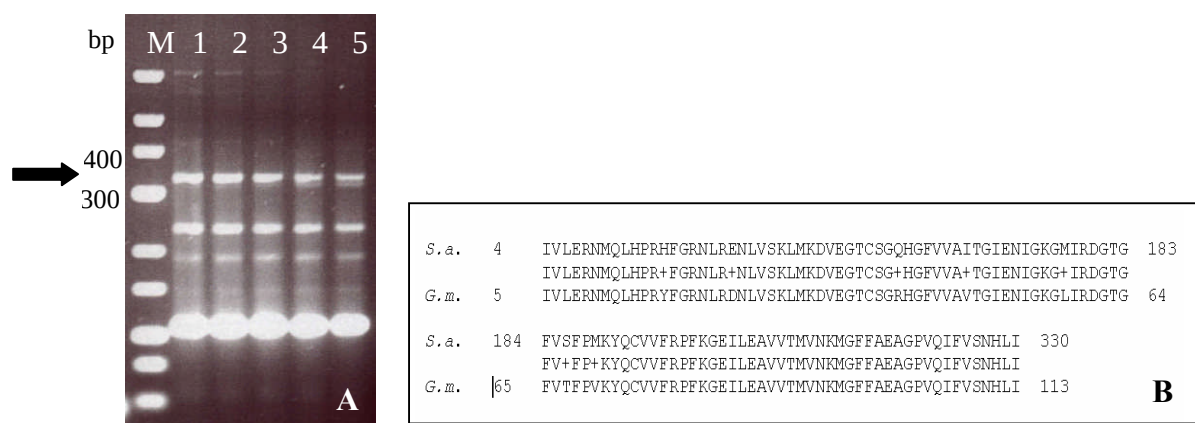


Abbildung 13: Fragment der RPB7-cDNA aus *Sorbus aucuparia* L. A: Gelelektrophoretische Auftrennung von potentiell RNA-Polymerase II-spezifischen RT-PCR-Produkten, die mittels der degenerierten Primer 2.PolymII FP und 3.PolymII RP (Tabelle 2) bei verschiedenen Annealingtemperaturen amplifiziert wurden. Spur 1: 51°C, Spur 2: 54°C, Spur 3: 56°C, Spur 4: 58°C, Spur 5: 60°C. M: DNA-Ladder Low Range. Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA der Eberesche. **B:** Aminosäuresequenzvergleich zwischen der *Sorbus aucuparia*- (*S.a.*) und der *Glycine max*- (*G.m.*) spezifischen Sequenz eines Teils der UE 7 der RNA-Polymerase II.

3.2.6 Ebereschen-spezifische 18S rRNA-Teilsequenz

Der von Frau Dr. Mielke (Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek) zur Verfügung gestellte Klon V77 2/1_4.13 (Tabelle 1) wurde bereits als 18S rRNA-spezifisch identifiziert. Er wurde daher vollständig sequenziert und die Sequenz veröffentlicht (DQ849000). Die Sequenz von 295 bp zeigt eine 99%-ige Übereinstimmung mit der 18S rRNA Sequenz von *Vauquelinia californica*, Rosaceae (DQ886382, Abbildung 14).

<i>S. a.</i>	1	CTAGCTATGCGGAGGT CAT CCT CCGCGGCCAGCTTCTTAGAGGGACTATGGCGGCTTAGG	60
<i>V. c.</i>	1230	CTAGCTATGCGGAGGT CAT CCT CCGCGGCCAGCTTCTTAGAGGGACTATGGCGGCTTAGG	1289
<i>S. a.</i>	61	CCAAGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCGCACGC	120
<i>V. c.</i>	1290	CCAAGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCGCACGC	1349
<i>S. a.</i>	121	GCGCTACACTGATGATTCAACGAGTCTATAGCCTTGGCGACAGGCCGGGTAATCTTT	180
<i>V. c.</i>	1350	GCGCTACACTGATGATTCAACGAGTCTATAGCCTTGGCGACAGGCCGGGTAATCTTT	1409
<i>S. a.</i>	181	GAAATTTATCGTGATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTGGTCTCAACGAGGAATCCT	240
<i>V. c.</i>	1410	GAAATTTATCGTGATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTGGTCTCAACGAGGAATCCT	1469
<i>S. a.</i>	241	AGTAAGCGCGAGTCATCAGCACGCGTTGACTACCTCCCTGCCCTTTGTACACACC	295
<i>V. c.</i>	1470	AGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGACTACGTCCTGCCCTTTGTACACACC	1524

Abbildung 14: Sequenzvergleich zwischen dem Teilstück der 18S rRNA-spezifischen *Sorbus aucuparia* (*S.a.*) und der *Vauquelinia californica* (*V.c.*) 18S rRNA-Sequenz.

3.2.7 Etablierung und Effektivitätsbestimmung der qRT-PCR-Primer

Von den bereits bekannten vollständigen Sequenzen der vier viralen RNAs und den ermittelten Teilsequenzen der Eberesch-mRNA-spezifischen Abschnitte für Actin, Tubulin, Ubiquitin, die UE 7 der RNA-Polymerase II (RPB7), sowie die 18S rRNA wurden Primer abgeleitet, die möglichst einheitliche Produktgrößen amplifizieren sollten. Eine weitgehend identische Produktgröße war gewünscht, weil in den real time PCR-Experimenten mit dem unspezifischen Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green gearbeitet werden sollte und unterschiedlich lange Amplifikate zu unterschiedlich intensiver Fluoreszenz führen (Tabelle 3, 2.2.12).

Abbildung 15 zeigt die Produkte der neun ausgewählten Primerpaare nach einer Standard-RT-PCR. Mit allen gewählten Primerpaaren konnte ein spezifisches Amplifikat der Größen von 81 bis 109 bp ohne zusätzliche Nebenbanden erhalten werden. Lediglich unter Verwendung des Ubiquitin-spezifischen Primerpaares wurde zusätzlich ein ca. 300 bp langes Fragment amplifiziert, welches auf Primerbindungen in zwei verschiedenen ORFs des Polyubiquitin beruht (Abbildung 15B). Dieses bereitete allerdings in real time PCR-Experimenten keinerlei Schwierigkeiten, da die Extentionszeit sehr kurz gewählt wurde.

Die virusspezifischen Primerpaare wurden sowohl mit Gesamt-RNA aus EMARAV-infiziertem Gewebe (Abbildung 15, Spuren 2, 4, 6 und 8), als auch auf Gesamt-RNA aus EMARAV-freiem Gewebe (Abbildung 15, Spuren 1, 3, 5 und 7) getestet. Wie erwartet, wurden nur in infiziertem Gewebe virusspezifische Nukleinsäuren nachgewiesen. Unter Verwendung von Gesamt-RNA aus nicht symptomtragenden Geweben waren lediglich Primerdimere von ca. 50 bp Länge im Gel sichtbar, welche auch in der Wasserkontrolle mit vRNA2-spezifischen Primern vorhanden sind. Diese Primerdimere waren nur in EMARAV-freien Proben detektierbar und zeigten sich in Schmelzkurven nach qRT-PCR-Experimenten in Form von flachen und unspezifischen Peaks. In Versuchen mit

Gesamt-RNA-Präparationen, die Virus enthielten, erschienen diese unspezifischen Peaks in Schmelzkurven nicht.

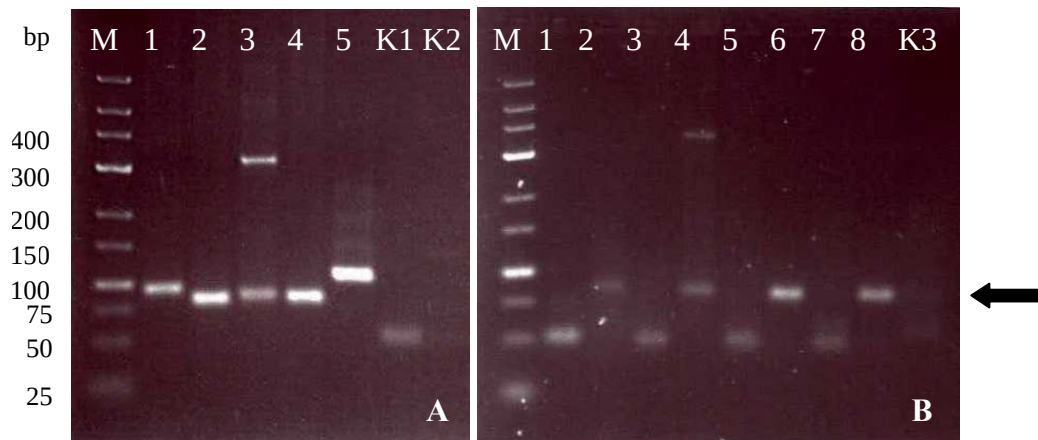


Abbildung 15: Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte der für die qRT-PCR ausgewählten Primerpaare (Tabelle 3) in einer Standard-RT-PCR-Reaktion. Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA EMARAV-infizierter und EMARAV-freier Blätter. **A: Eberesch-mRNA-spezifische Produkte.** M: DNA-Ladder Low Range, Spur 1: Actin-spezifisch (93 bp), Spur 2: Tubulin-spezifisch (81 bp), Spur 3: Ubiquitin-spezifisch (84 bp), Spur 4: UE der RNA-Polymase II-spezifisch (82 bp), Spur 5: 18S rRNA-spezifisch (109 bp), K1: Wasserkontrolle mit Tubulin-spezifischen Primern, K2: Wasserkontrolle mit 18S rRNA-spezifischen Primern. **B: EMARAV-spezifische Produkte.** M: DNA-Ladder Low Range, Spur 1: vRNA1-spezifische Primer mit EMARAV-freier Gesamt-RNA (84 bp), Spur 2: vRNA1-spezifische Primer mit EMARAV-haltiger Gesamt-RNA (84 bp), Spur 3: vRNA2-spezifische Primer mit EMARAV-freier Gesamt-RNA (82 bp), Spur 4: vRNA 2-spezifische Primer mit EMARAV-haltiger Gesamt-RNA (82 bp), Spur 5: vRNA 3-spezifische Primer mit EMARAV-freier Gesamt-RNA, Spur 6: vRNA 3-spezifische Primer mit EMARAV-haltiger Gesamt-RNA (81 bp), Spur 7: vRNA 4-spezifische Primer mit EMARAV-freier Gesamt-RNA, Spur 8: vRNA 4-spezifische Primer mit EMARAV-haltiger Gesamt-RNA (81 bp), K3: Wasserkontrolle mit vRNA 2-spezifischen Primern.

Zur Ermittlung der Effektivitäten der unterschiedlichen Primer in qRT-PCR-Reaktion (2.2.13 und 2.2.15) wurden Verdünnungsreihen *in vitro* transkribierter cRNAs (2.2.16) bekannter Konzentrationen (200 pg, 20 pg und 2 pg) erstellt und diese in die qRT-PCR-Reaktionen eingesetzt.

Abbildung 16 zeigt exemplarisch die graphische Darstellung des Fluoreszenzanstieges während der Amplifikation sowie die ermittelten qRT-PCR-Effektivitäten unter Verwendung der RPB7- (A) und der vRNA 2- (B) spezifischen Primer. Sie lagen bei 91,6 bzw. 83,5%. Die Amplifikationskurven zeigten den typischen, weitgehend exponentiellen Verlauf und endeten in der Sättigung.

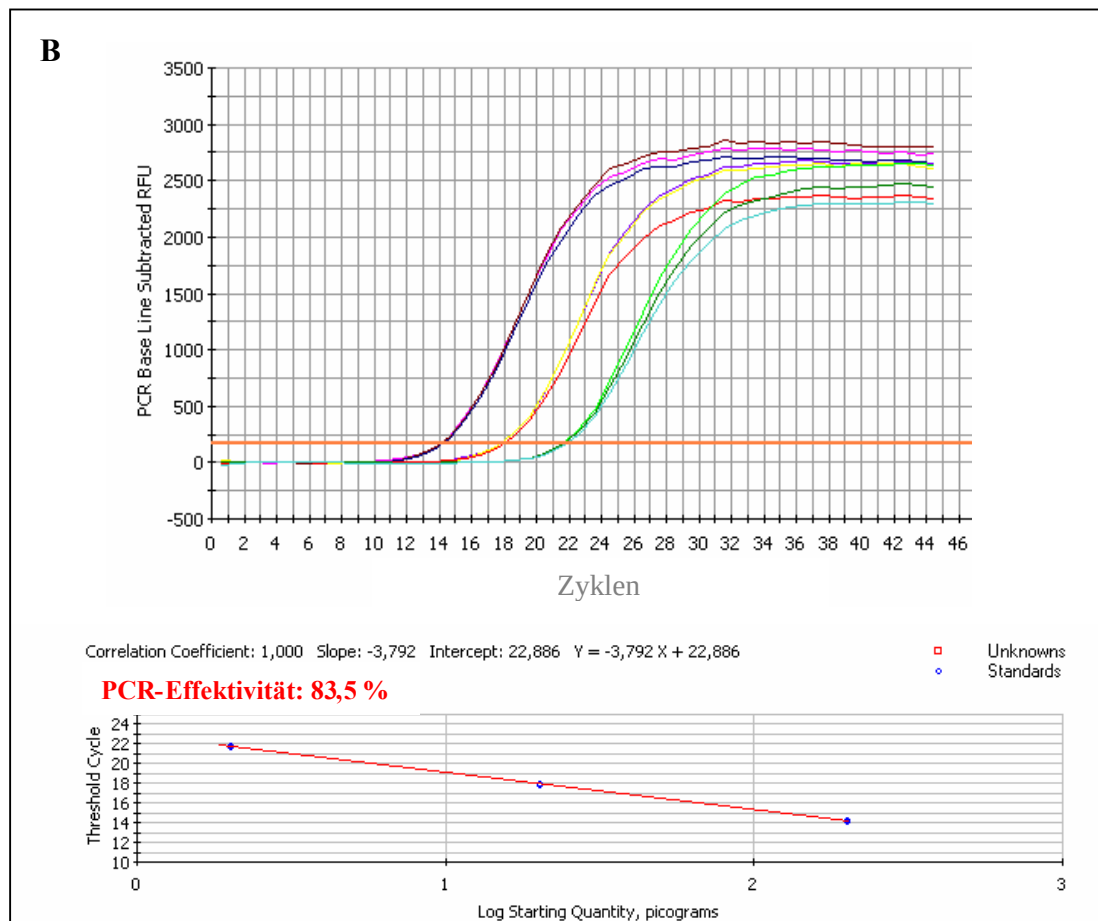
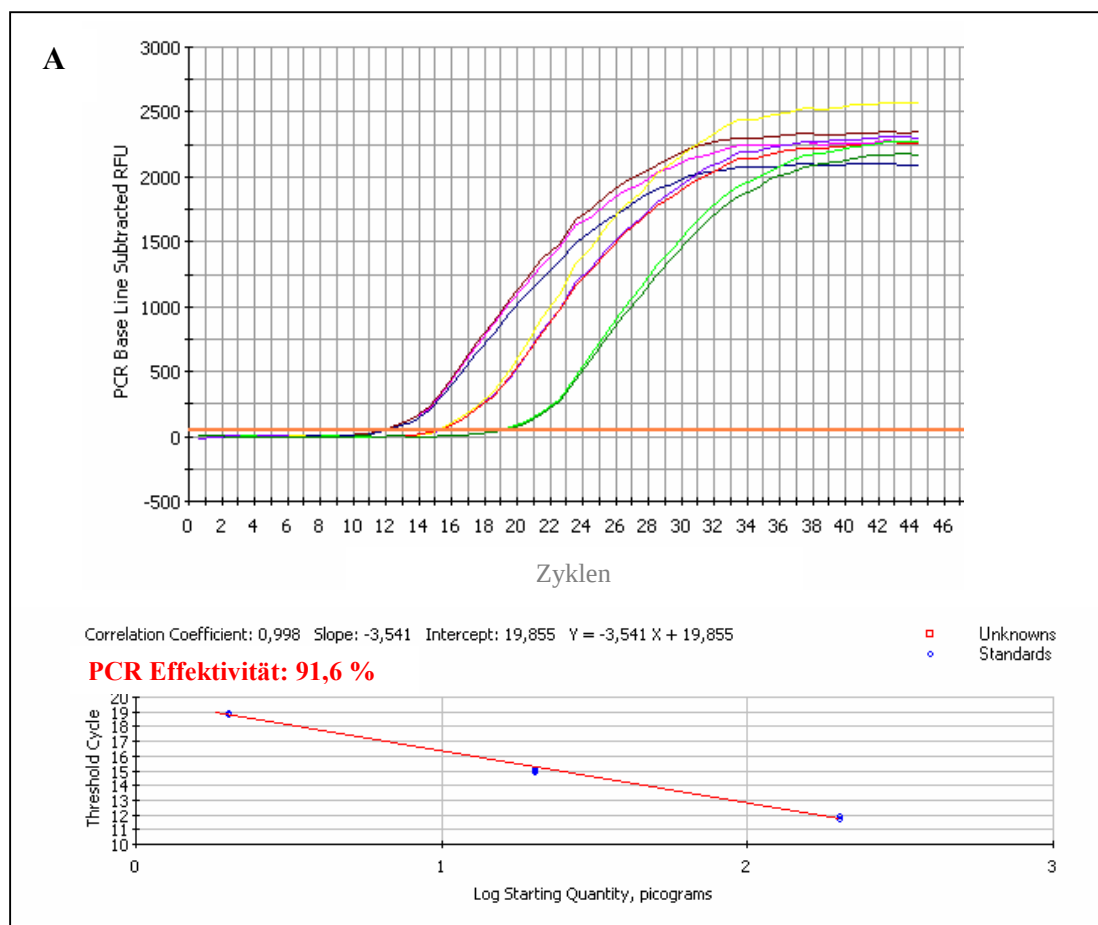


Abbildung 16: Graphische Darstellung des Fluoreszenzanstiegs während einer real time PCR-Reaktion und der Effektivitäten der Reaktionen, die durch Verdünnungsreihen von cRNAs durch die iCycler-Software erstellt wurden. A: Verwendet wurden die Primer 6.Polym II FP und 4.Polym II RP, die spezifisch für eine Untereinheit der RNA-Polymerase II sind. **B:** Verwendet wurden die vRNA2-spezifischen Primer 2.2174 FP und 2.2255 RP.

Die dazugehörigen Schmelzkurven der qRT-PCR-Produkte der RPB7 und der vRNA2, die der Überprüfung der amplifizierten Produktgröße (Produktsequenz) dienen, bestätigen den Erhalt eines einzigen, spezifischen Amplifikats (Abbildung 17). Für das Produkt der RPB7 ergab sich eine Temperatur von 78,5°C, für das der vRNA2 eine Schmelztemperatur von 77,5°C. Da Schmelztemperaturen abhängig von der Länge und dem G/C-Gehalt der Amplifikate sind, können falsche Amplifikate durch veränderte Schmelztemperaturen identifiziert werden.

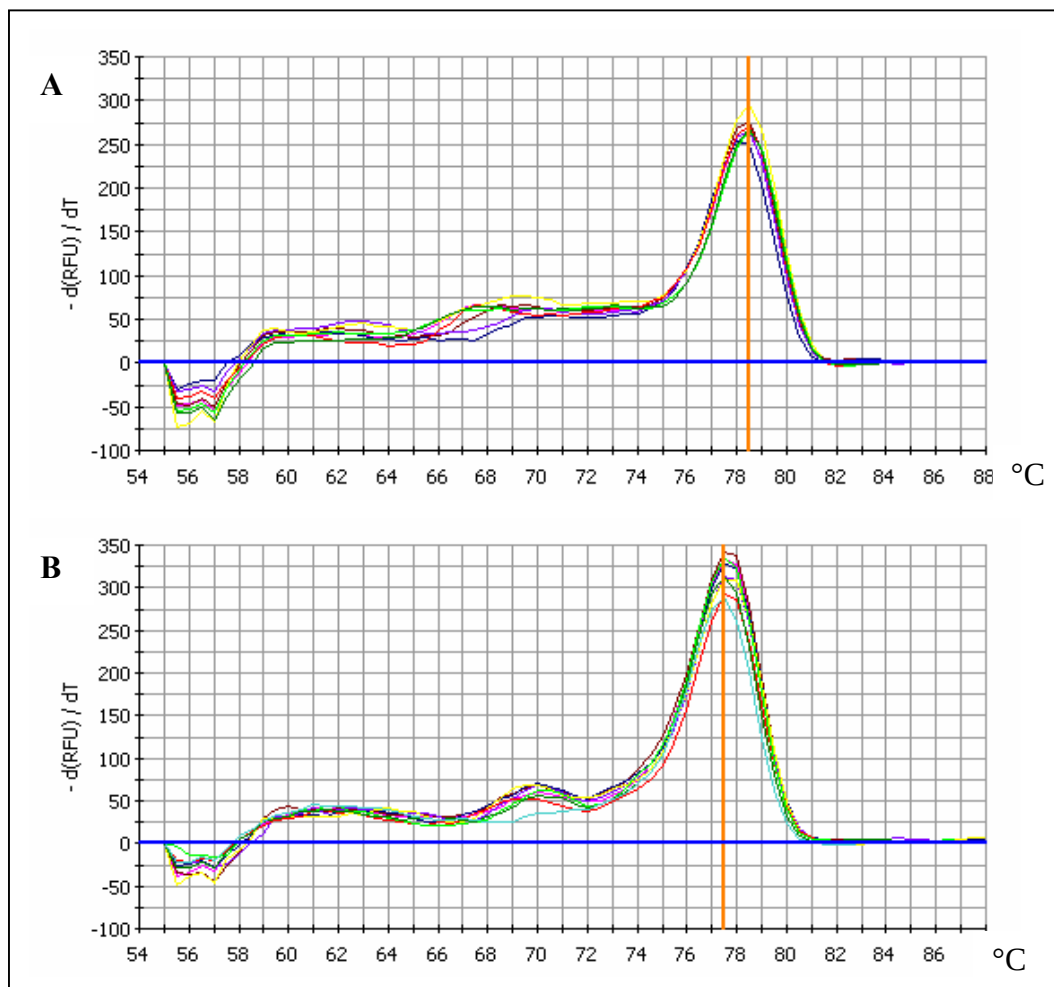


Abbildung 17: Schmelzkurve der mittels real time PCR erzeugten Produkte. A: Als Ausgangsmaterial diente cRNA spezifisch für die RPB7. Das spezifische Produkt schmilzt bei 78,5°C. B: Als Ausgangsmaterial diente cRNA spezifisch für die vRNA 2. Das spezifische Produkt schmilzt bei 77,5°C.

Tabelle 8 fasst die Reaktionseffektivitäten, Produktlängen und Schmelztemperaturen aller fünf getesteter potentieller Standards und der vier viralen RNA-Amplifikate zusammen.

Tabelle 8 : Amplifikationsdaten aller fünf Ebereschen-mRNA-spezifischen und der vier EMARAV-spezifischen qRT-PCRs.

	Effektivität [%]	Produktlänge [bp]	Schmelztemperatur [°C]
18S rRNA	83,2	109	82,0
Tubulin	95,3	81	80,5
Ubiquitin	84,6	84	81,5
Actin	79,7	93	78,5
RPB7	91,6	82	78,5
vRNA1	91,1	84	75,5
vRNA 2	83,5	82	77,5
vRNA 3	93,7	81	75,5
vRNA 4	91,2	81	77,5

3.2.8 Ermittlung geeigneter Standards zur Normalisierung von qRT-PCR-Experimenten

In dieser Arbeit wurden für die verschiedenen Versuchsbäume und Gewebe je zwei Ebereschen-spezifische Gene mit stabilen Expressionsniveaus als interne Standards zur Normalisierung (2.2.15.1) eingesetzt. Die Berechnungen zur Ermittlung, welche der fünf getesteten Gene in welchem Gewebe und Baum weitgehend konstitutiv exprimiert wurden, führte das Programm GeNorm (2.1.7) aus. Als Eingabewerte dienten relativierte C_t -Werte (2.1.7).

Abbildung 18 zeigt die von GeNorm gelieferte graphische Darstellung der am stärksten schwankenden und am stabilsten exprimierten Gene für die unterschiedlichen Bäume und Gewebe. Umso kleiner der M-Wert (mittlere paarweise Variation), desto stabiler werden die Gene im Jahresverlauf exprimiert. GeNorm eliminiert jeweils die am wenigsten stabil exprimierten Gene (in der Abbildung von links) bis zwei weitgehend konstitutiv exprimierte Gene zur Berechnung der Normalisierungsfaktoren verbleiben (rot markiert). Es sollte erwähnt werden, dass bereits eine gewisse Normalisierung auf Basis der 18S rRNA erfolgt ist, da sämtliche Quantifizierungen auf einer definierten Gesamt-RNA-Menge basieren. Es kann daher keine Aussage über die Expression der 18S rRNA-Gene erzielt werden.

Für die Blätter des EMARAV-freien Baumes SF heißt das, dass die relativierten C_t -Werte, die auf die mRNA-Konzentrationen der RPB7 zurückgehen als erste, die der mRNA von Actin danach und anschließend die der Tubulin-mRNA aus der Berechnung ausgeschlossen wurden. Nur die relativierten C_t -Werte der mRNA-Menge von Ubiquitin und der 18S rRNA wurden

demnach zur Ermittlung der Normalisierungsfaktoren von GeNorm empfohlen. Der M-Wert hierfür liegt bei 0,67 (Tabelle 9).

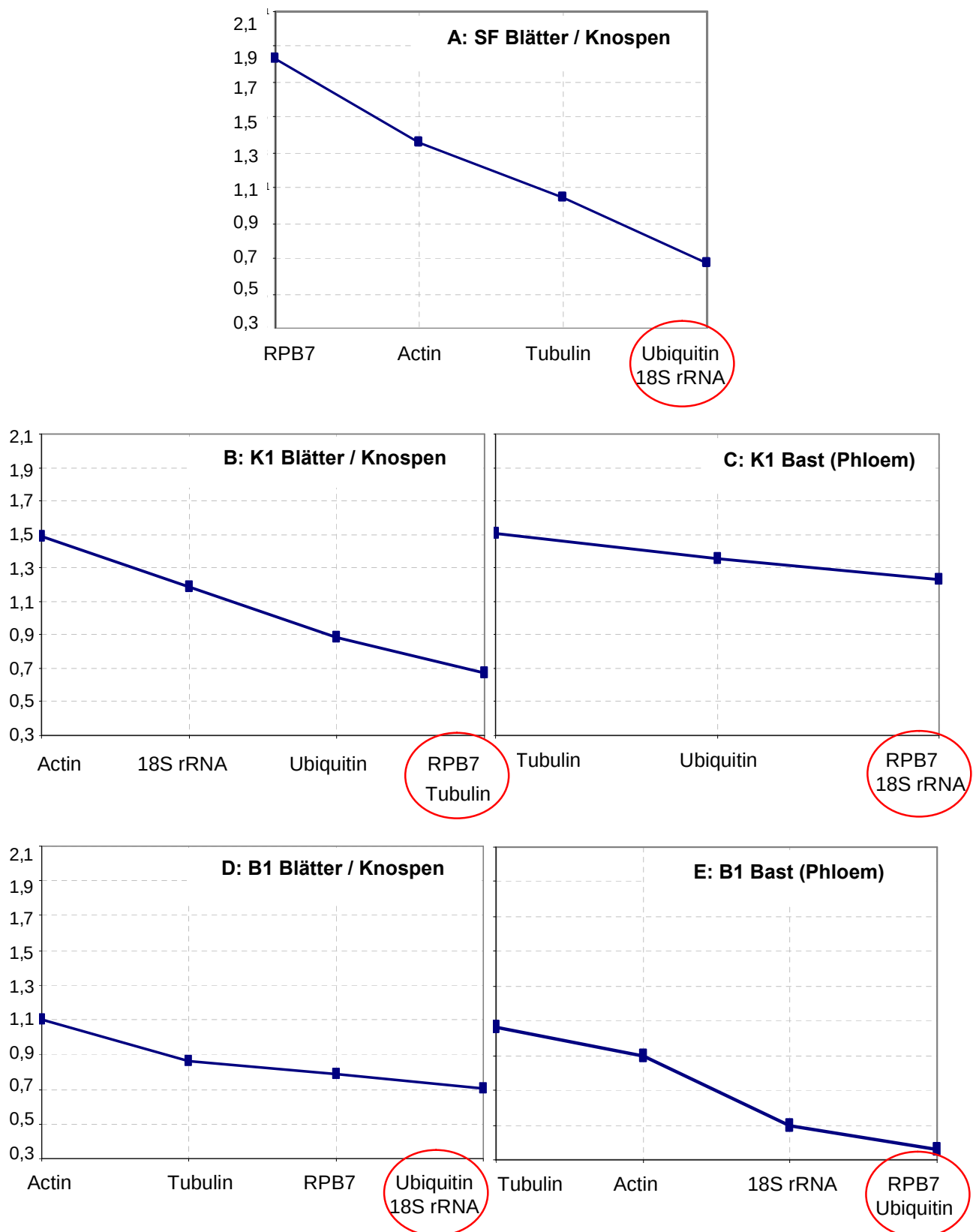


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Ermittlung der am stabilsten exprimierten Gene der Eberesche (M-Werte, nach GeNorm) in **A:** Blättern bzw. Knospen des EMARAV-freien Baumes SF. **B:** Blättern bzw. Knospen des EMARAV-infizierten Baumes K1. **C:** Bast (Phloem) des EMARAV-infizierten Baumes K1. **D:** Blättern bzw. Knospen des EMARAV-infizierten Baumes B1. **E:** Bast (Phloem) des EMARAV-infizierten Baumes B1.

Dementsprechend erwiesen sich für den EMARAV-infizierten Baum K1 in Blättern oder Knospen die Expression der RPB7 und Tubulin am stabilsten, im Bast (Phloem) hingegen die der RPB7 und der 18S rRNA. In dem EMARAV-infizierten Baum B1 waren in Blättern / Knospen Ubiquitin und die 18S rRNA am stabilsten exprimiert. Im Bast (Phloem) erwiesen sich die Expression der RPB7 und Ubiquitin als weitgehend konstitutiv. Auf die Ermittlung der relativen C_T -Werte für die mRNA des Actin beim Bast (Phloem) des Baumes K1 wurde verzichtet, da sich diese in vorhergehenden Versuchen als sehr schwankend dargestellt hatten. Die resultierenden M-Werte sind in Tabelle 9 dargestellt und lagen zwischen 0,36 (Baum B1, Bast) und 1,23 (Baum K1, Bast). Die Bedeutung der M-Werte wird in der Diskussion wieder aufgegriffen.

Tabelle 9: Normalisierungsfaktoren für alle untersuchten Gewebe der drei Versuchsbäume und die M-Werte als Expressionsstabilitätswert*.

	SF	K1	K1	B1	B1
	Blätter/Knospen	Blätter/Knospen	Bast	Blätter/Knospen	Bast
	Ubiquitin	RPB7	RPB7	Ubiquitin	Ubiquitin
	18S rRNA	Tubulin	18S rRNA	18S rRNA	RPB7
Januar	1,04966596	3,50882122	1,10673659	0,9304	1,12898837
Februar	1,16164937	0,99888994	1,69170611	0,6502	1,80062409
März	0,89148516	3,47852706		0,9332	
April	0,91590168	9,66930279		1,1714	
Mai	0,9829442	0,92535252	1,73360087	1,3336	1,03044408
Juni	1,26200899	0,65721776	1,07756125	0,7388	1,39389074
Juli	1,19932066	0,41465295		1,2866	
August	0,91937465	0,317221		0,4456	
September	1,12669585	0,17050164	0,39849613	1,0271	0,2814493
Oktober	0,8466164	0,25409942	0,71748963	1,4754	1,21684184
November	1,14726905	0,96199522		1,4936	
Dezember	0,67101626	2,54426431		1,1826	
M-Werte	0,67	0,67	1,23	0,7	0,36

*: M-Wert: Je kleiner der M-Wert ist, desto gleichmäßiger (stabiler) ist die Expression der jeweiligen Gene im Jahresverlauf.

3.2.9 Quantifizierung potentieller Standards

Die Kopienzahlen, die mit Hilfe der Tubulin-Plasmid-Eichkurve (2.2.15.1) für die fünf potentiellen Standards näherungsweise berechnet wurden, sind als Balkendiagramm in Abbildung 19 dargestellt. Die Daten in Abbildung 19A stammen exemplarisch von den Juni-Blättern des EMARAV-infizierten Baumes B1. Wie zu erwarten, befindet sich am meisten 18S rRNA (ca. 5×10^7 Moleküle) in 20 ng Gesamt-RNA. Von Ubiquitin (ca. 3×10^5), über Tubulin (ca. 1×10^5) und Actin (ca. 3×10^4), hin zu der RPB7 (ca. 2×10^4), nimmt die Konzentration der entsprechenden mRNA-Spezies ab.

Auch im Bast (Phloem) des gleichen Baumes (B1) vom Juni (Abbildung 19B), ist die 18S rRNA das am stärksten vertretene Transkript der fünf getesteten potentiellen Standards. Mit ca. 4×10^8 Molekülen die Menge der 18S rRNA im Bast sogar fast 10x höher als in Blättern (ca. 5×10^7 Moleküle). Ubiquitin-mRNA, die wie zuvor beschrieben (3.2.8) auch als Standard beider B1-Gewebe ausgewählt wurde, stellt wie in Blättern, so auch im Bast die zweitgrößte Fraktion der untersuchten mRNAs und kommt in Blättern und Bast (ca. 5×10^5 Moleküle) in der gleichen Größenordnung vor. Dagegen findet sich mehr RPB7-mRNA (ca. 1×10^5 Moleküle) als Actin-mRNA (ca. 2×10^4 Moleküle) im Bast. Die Menge Tubulin-spezifischer mRNA (ca. 6×10^2 Moleküle), welche in den Berechnungen der zu wählenden Standards von GeNorm ausgeschlossen wurde, ist im Bast am geringsten.

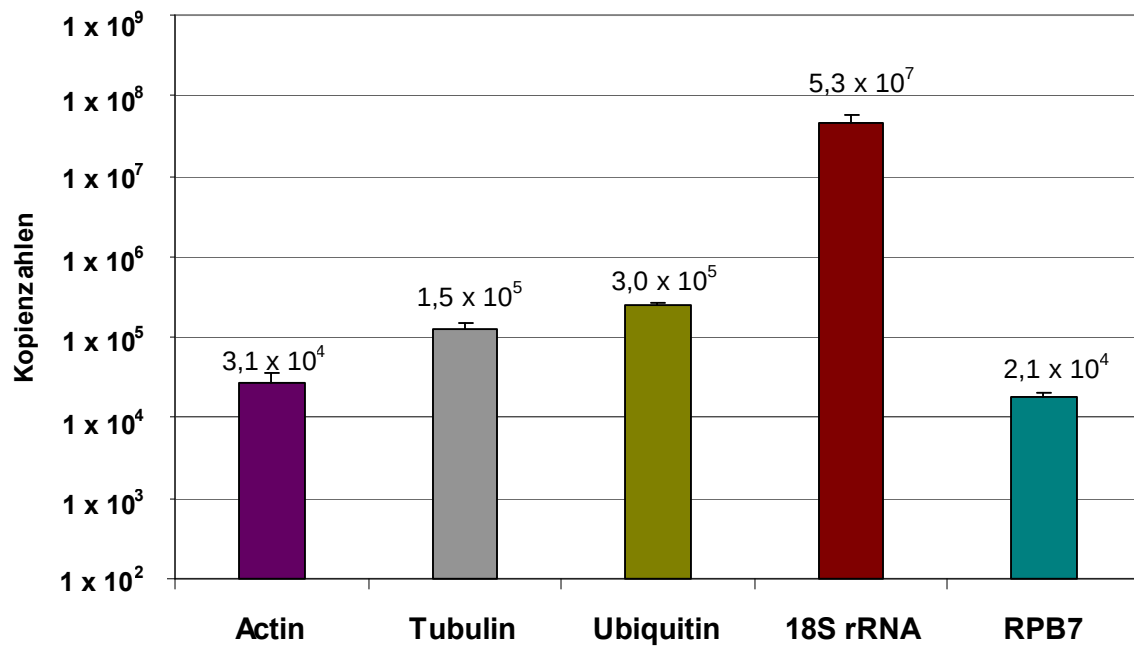
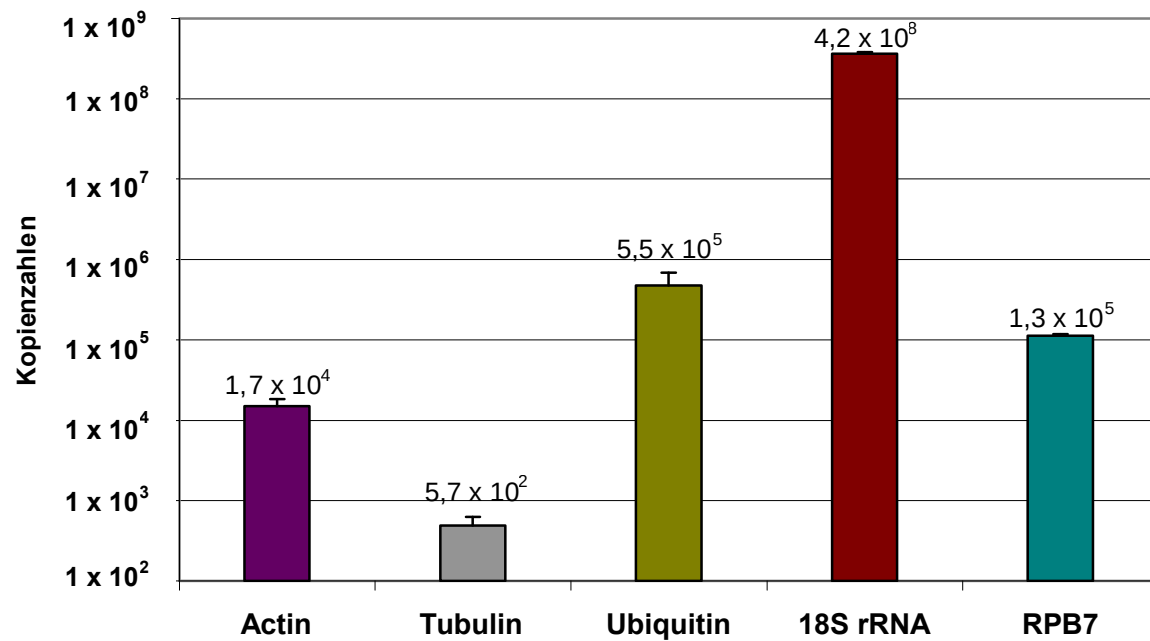
A**B**

Abbildung 19: Kopienzahlen aller fünf potentieller Standards per 20 ng Gesamt-RNA im Monat Juni.
A: Blätter, B: Bast (Phloem) des EMARAV-infizierten Baumes B1.

3.2.10 Die Quantifizierung von EMARAV-RNAs in *Sorbus aucuparia* L.

qRT-PCR bietet die Gelegenheit, verschiedenste Mengen und Verhältnissen der hier untersuchten EMARAV-spezifischen bzw. Ebereschen-spezifischen RNAs zu ermitteln. Eine solch sensitive Methode kann aber auch unspezifische Signale erzeugen. Als Kontrolle wurde so stets das virale RNA2-spezifische Primerpaar mit Gesamt-RNA aus dem EMARAV-freien Baum SF eingesetzt.

Abbildung 20 macht deutlich, dass abgesehen vom Februar in allen Monaten signifikante Unterschiede zwischen unspezifischen Signalen eines EMARAV-freien Baumes und echten Signalen bestanden haben. Deutlich wurde dies daran, dass die invertierten C_T -Werte des EMARAV-freien Baumes SF lediglich minimal zwischen 17 und 19 schwankten, wohingegen die Werte des infizierten Baumes B1 im Jahresverlauf den Bereich von 18 (im Februar) bis 32 (im Juni) überspannten.

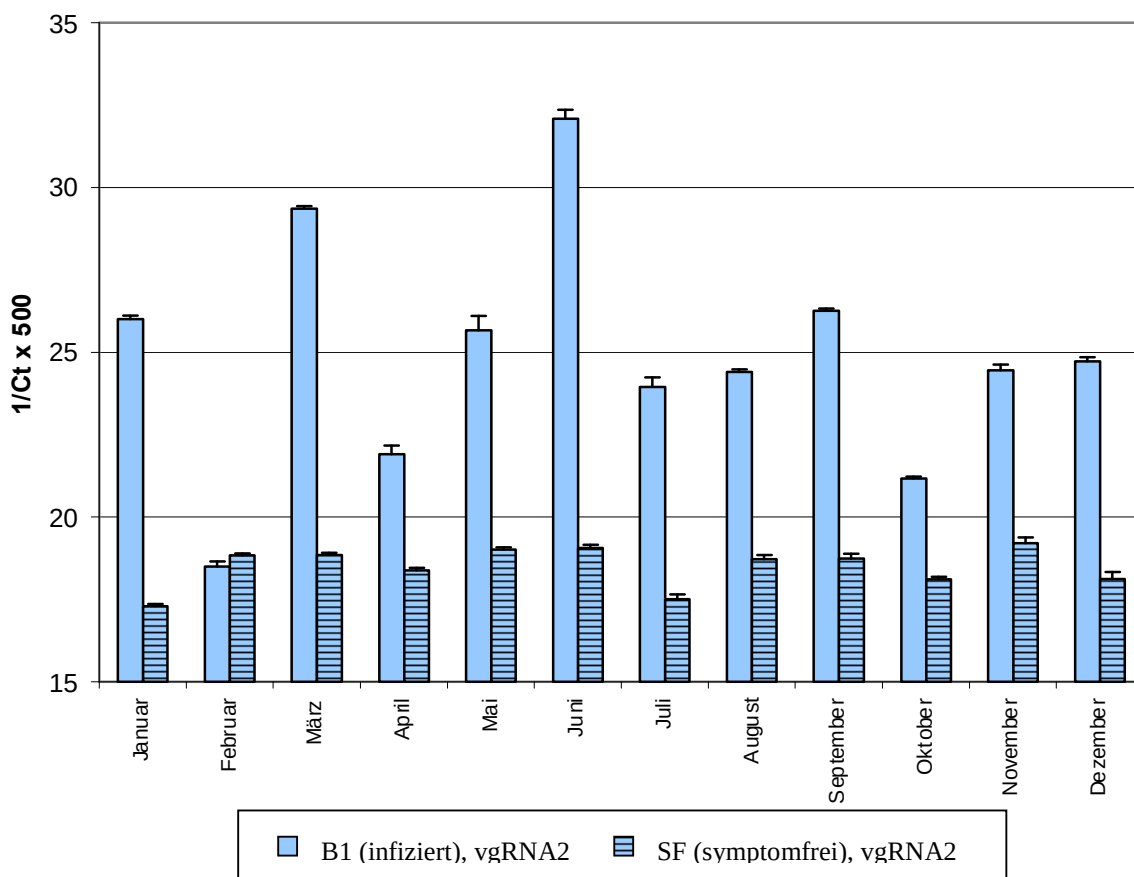


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Verhältnisse zwischen den spezifischen Signalen der vgRNA2 aus Baum B1 und den unspezifischen Signalen der vgRNA2 aus Baum SF. Die Werte sind normalisiert. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 20 ng Gesamt-RNA.

Die Analysen der Schmelzkurven ergaben für virusfreies Pflanzenmaterial oft sehr flache Schmelzkurven mit mehreren Peaks. Gelegentlich wurden auch Peaks detektiert, die eine korrekte, dem Amplifikat der vRNA2 entsprechende Schmelztemperatur von 77,5°C (Tabelle 8) aufwiesen.

Zur weiteren Klärung dieser unspezifischen Signale, wurden Verdünnungsreihen von Gesamt-RNA-Isolationen eines EMARAV-infizierten Baumes (K1) und des symptomfreien Baumes (SF) erstellt und mittels qRT-PCR untersucht. Die Abbildung 21 gibt die invertierten Ct-Werte der auf 200, 20, 2 und 0,2 ng Gesamt-RNA basierenden Versuche wieder. Im Fall des symptomfreien Baumes SF macht es keinen signifikanten Unterschied ob 0,2 ng oder 200 ng, also die 1000-fache Menge Ausgangsmaterial eingesetzt wurden (Abbildung 21, SF). Für den EMARAV-infizierten Baum K1 hingegen fallen die Werte in vier deutlichen Stufen von 32 auf 20 ab (Abbildung 21, K1).

Es lässt sich also festhalten, dass die unspezifischen Signale für den EMARAV-freien Baum unabhängig von der Menge der eingesetzten Template-RNA sind, wohingegen für den Baum K1 eine eindeutige Korrelation zwischen der eingesetzten RNA-Menge und der Bildung des EMARAV-spezifischen Amplifikats bestand. Mehr eingesetzte Gesamt-RNA führte zu deutlich höheren invertierten C_t -Werten.

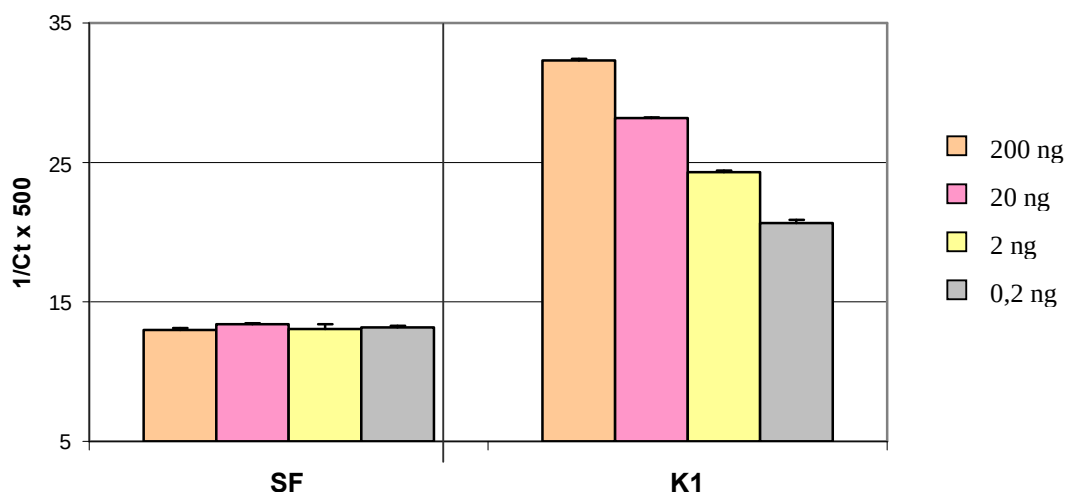


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Mengenverhältnisse, die aus Verdünnungsreihen von Gesamt-RNAs eines symptomfreien (SF) und eines EMARAV-infizierten Baumes (K1) berechnet wurden. Das verwendete Primerpaar war für die vRNA2 spezifisch. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 200, 20, 2 und 0,2 ng Gesamt-RNA. Die Werte sind nicht normalisiert.

3.2.11 Quantifizierung der vier EMARAV-vgRNAs im Jahresverlauf und in unterschiedlichen Geweben

Eine wichtige epidemiologische Fragestellung ist die gewebsspezifische Lokalisation von EMARAV in seiner Wirtspflanze. Die qRT-PCR wurde daher eingesetzt, um die viralen RNAs in verschiedenen Geweben (Blatt, Blattknospen, Bast / Phloem) nachzuweisen und zu quantifizieren. Letztendlich ist auch zu klären, in welchem der Gewebe das Virus den Winter überdauert. Für die Analysen wurden beide EMARAV-infizierten Bäume (B1 und K1) im Jahr 2006 herangezogen.

Abbildung 22 zeigt den normalisierten Verlauf aller vier vRNAs im Jahresverlauf in Blättern bzw. Knospen. Die Gesamtmenge der viralen RNAs in Blättern bzw. Knospen des Baumes B1 befand sich im Februar auf einem Tiefpunkt (Abbildung 22). Es folgte eine Zunahme bis in den Mai. In den Monaten Juni und Juli lagen die Mengen der viralen RNAs unterhalb des Höchststandes im Mai, aber noch auf hohem Niveau. Im August hingegen wurden, wie im Februar, nur sehr geringe Mengen aller vier vgRNAs detektiert. In den Monaten September bis Januar befanden sich ähnlich viele vRNA-Kopien in den Blättern bzw. Knospen, wie in jungen Blättern der Monate März bis Juli. Der Höchststand dieser Herbst- und Wintermonate lag dabei im November.

Die in Abbildung 22 dargestellten qRT-PCR Ergebnisse machen außerdem deutlich, dass in den EMARAV-infizierten Blättern bzw. Knospen des Baumes B1 in elf von zwölf Monaten im Jahr 2006 die vgRNA2, die für den putativen Glykoproteinprecursor kodiert, deutlich höher konzentriert war als die anderen drei vgRNAs. Lediglich im Mai überwogen die Kopienzahlen der vgRNA3 und vgRNA4 die der vgRNA2 geringfügig.

Bei der Betrachtung der Mengen der vgRNA1, der vgRNA3 und der vgRNA4 untereinander fiel auf, dass diese in fast allen Monaten gleichbleibende Verhältnisse besitzen. Die Mengen dieser drei vgRNAs liegen immer deutlich dichter beieinander, als die der vgRNA2. Trotzdem erwies sich keine der vgRNAs (1, 3 oder 4) immer als zweitstärkste Fraktion.

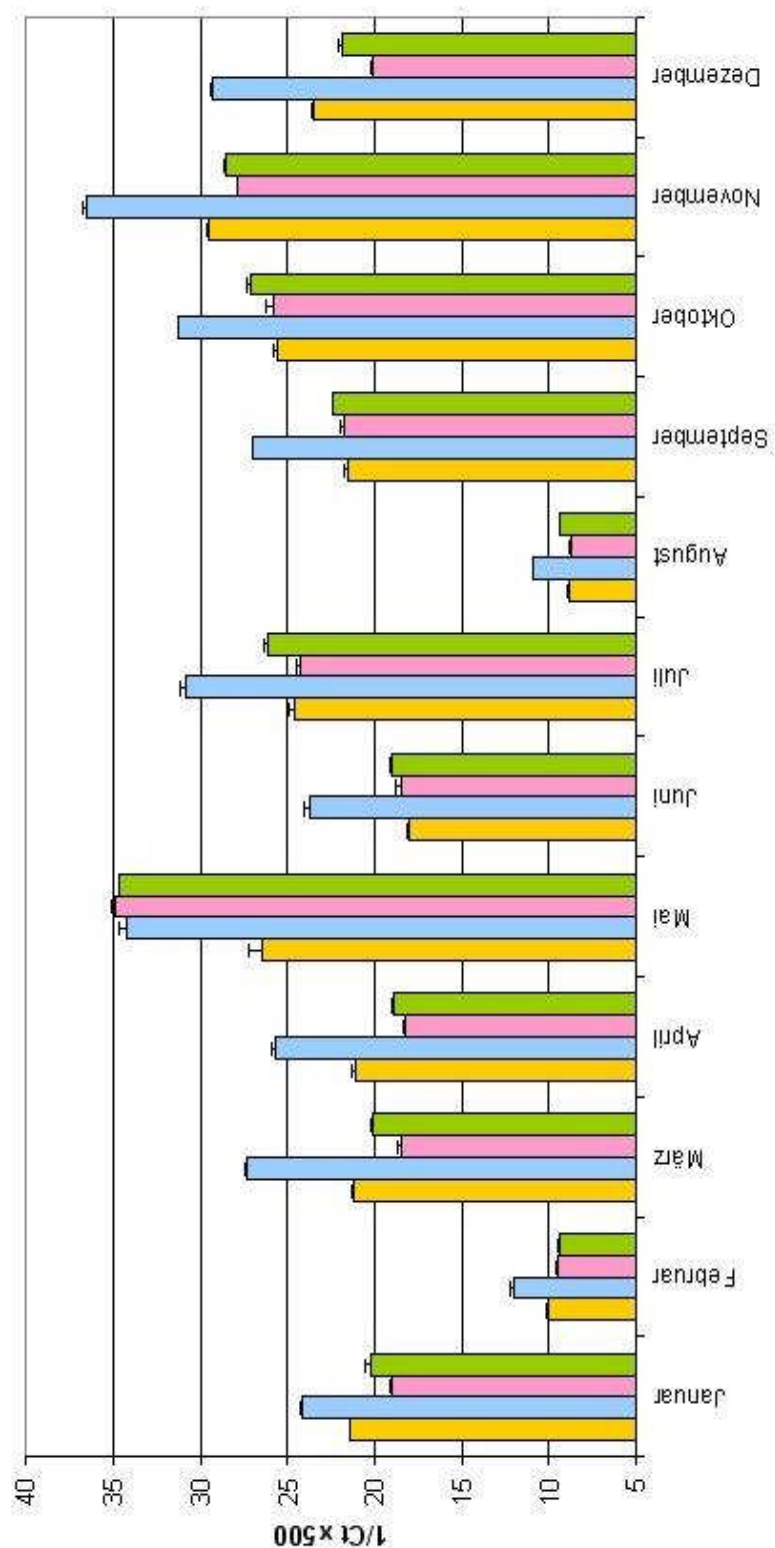
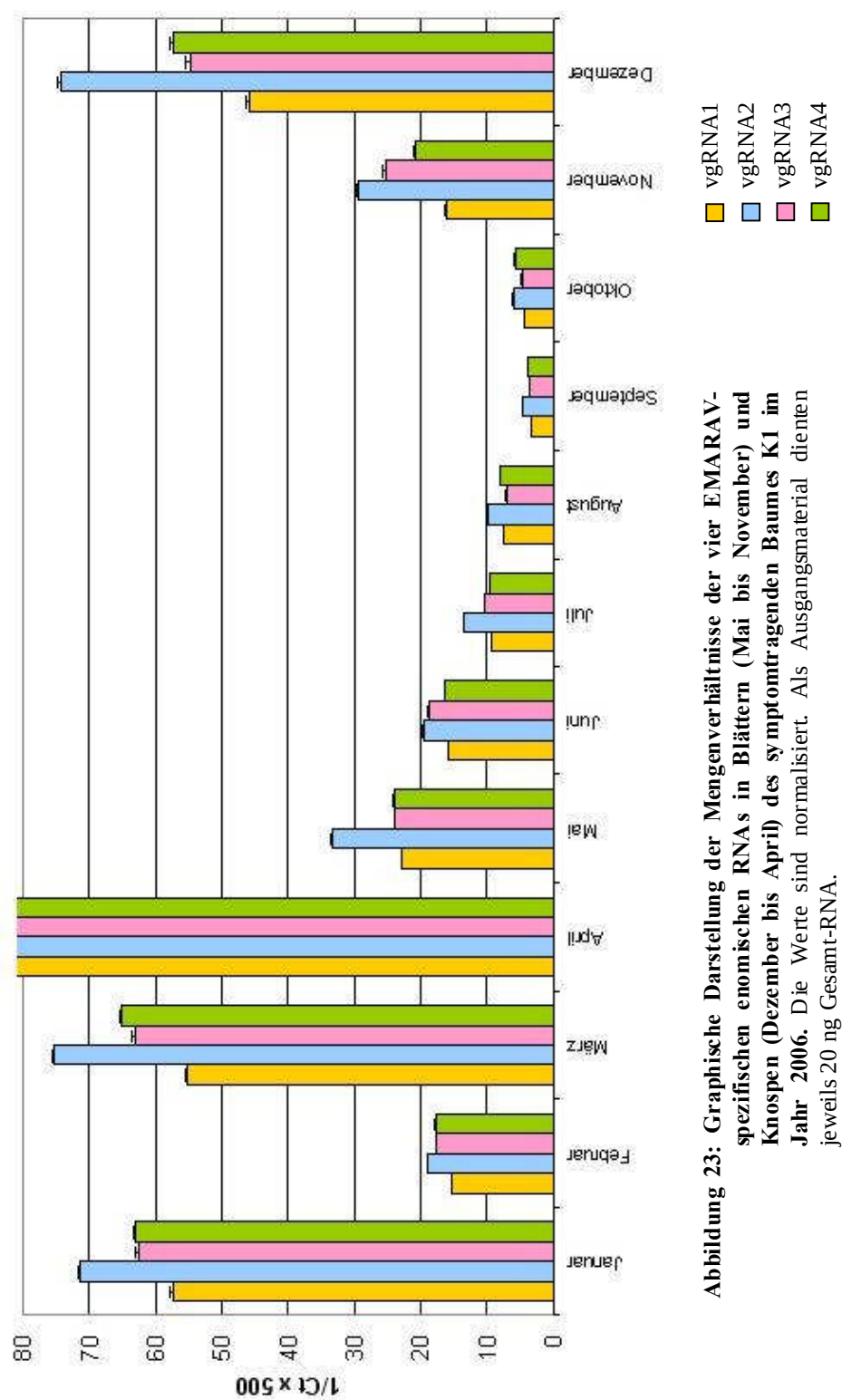


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Mengenverhältnisse der vier EMARV-spezifischen genomischen RNAs in Blättern (Mai bis November) und Knospen (Dezember bis April) des symptomtragenden Baumes B1 im Jahr 2006. Die Werte sind normalisiert. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 20 ng Gesamt-RNA.

Für den zweiten infizierten Baum K1 ergab sich bei der Betrachtung der normalisierten C_t -Werte ein etwas anderes Bild (Abbildung 23). Nachdem im Februar ebenfalls ein Tiefpunkt der Gesamtmenge aller vgRNAs ermittelt wurde, stiegen die Niveaus der vgRNAs über März zu April extrem schnell und stark an und es wurden absolute Höchstwerte von ca. 300 erhalten. Die im Mai erhaltenen Werte lagen bei ca. 25 und somit etwas unter den Mai-Werten des Baumes B1 (Abbildung 22). Im Baum K1 sanken die vgRNA-Niveaus von Mai bis in den Oktober konstant ab. Ein sehr deutlicher Anstieg der Mengen aller vgRNAs wurde im November gemessen. In den Blattknospen aus Dezember und Januar waren ähnlich große vgRNA-Mengen nachweisbar wie im März.

Beim Vergleich der beiden Bäume B1 und K1 fällt auf, dass beide einen Tiefststand an vgRNAs im Februar und im Hoch- bis Spätsommer (August, bzw. September) aufwiesen. Hohe Niveaus wurden sowohl im Frühling (Mai, bzw. April) als auch in spätherbstlichen Blättern, bzw. in Blattknospen im Januar detektiert. Die Verläufe der vgRNA-Mengen in beiden Bäumen weisen Ähnlichkeiten auf, bewegen sich aber oft auf sehr verschiedenen Niveaus.

Im Baum K1 (Abbildung 23) überwog in allen 12 Monaten wie schon im Baum B1 (Abbildung 22) die vgRNA2. Am geringsten konzentriert schien hier die vgRNA1 zu sein, die die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) kodiert. Die berechneten Konzentrationen der vgRNAs verändern sich im Jahresverlauf in Blättern bzw. Knospen des Baumes K1 (Abbildung 23) extremer als die des Baumes B1 (Abbildung 22). Der extremste Ausschlag im jahreszeitlichen Verlauf im Baum K1 lag im April (ca. 300) und beruhte größtenteils auf dem hohen Normalisierungsfaktor (Tabelle 9, 3.2.8) in diesem Monat. Daher wird der Einfluss der Normalisierung im folgenden Abschnitt dargestellt. Die sich hier bereits andeutende Problematik der mathematischen Normalisierung wird in der Diskussion ausführlich behandelt.



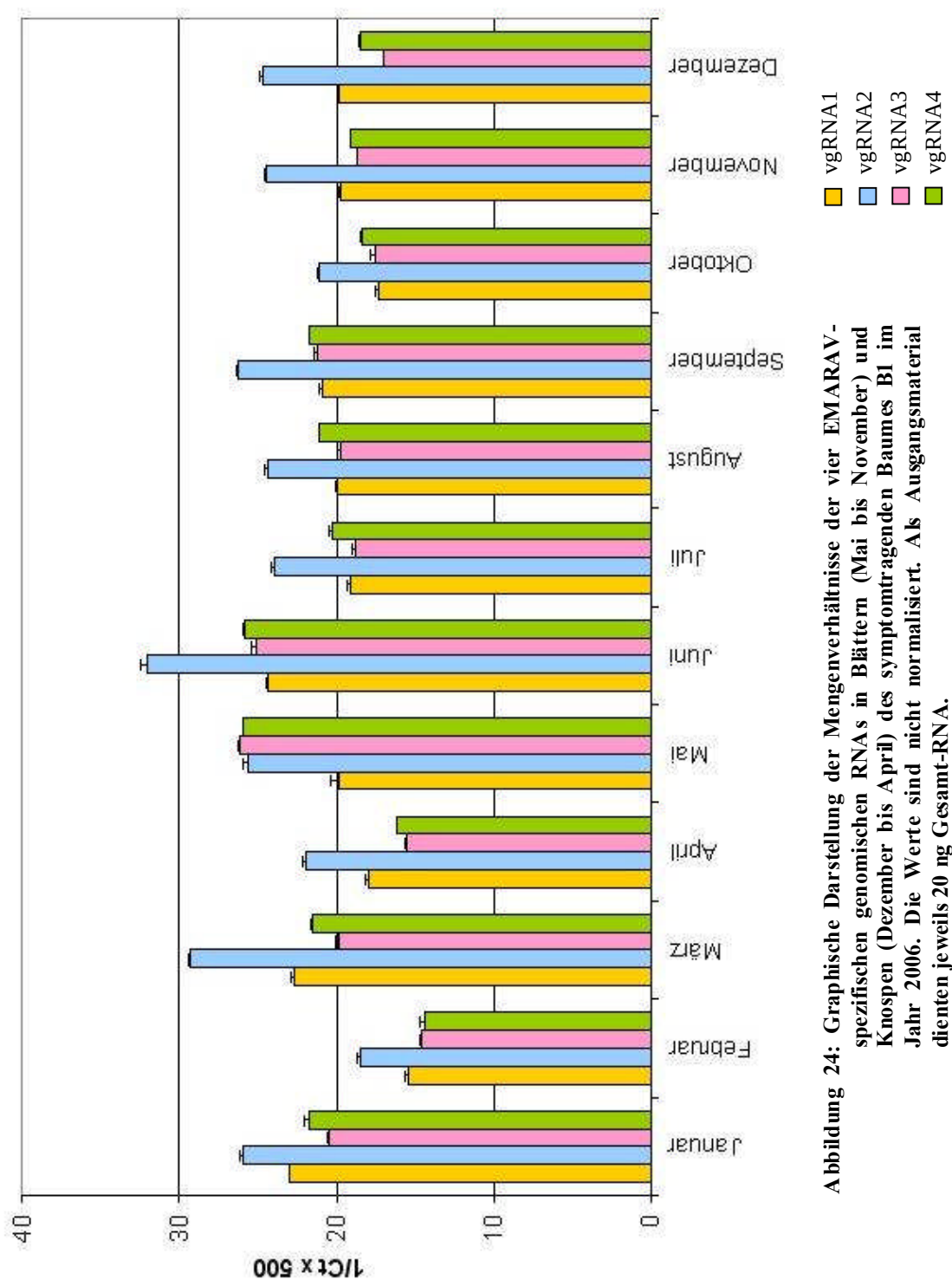
Normalisierungsfaktoren beruhen auf möglichst stabil exprimierten Genen des Versuchsorganismus. In diesem Fall besitzt jedes Gewebe jeder untersuchten Eberesche in jedem Monat einen spezifischen Normalisierungsfaktor. Diese Faktoren haben keinen Einfluss auf Verhältnisse der untersuchten RNA Mengen in einem Gewebe zu einem Zeitpunkt, sehrwohl aber auf den jahreszeitlichen Verlauf und auf die Vergleiche zwischen zwei Geweben oder Bäumen.

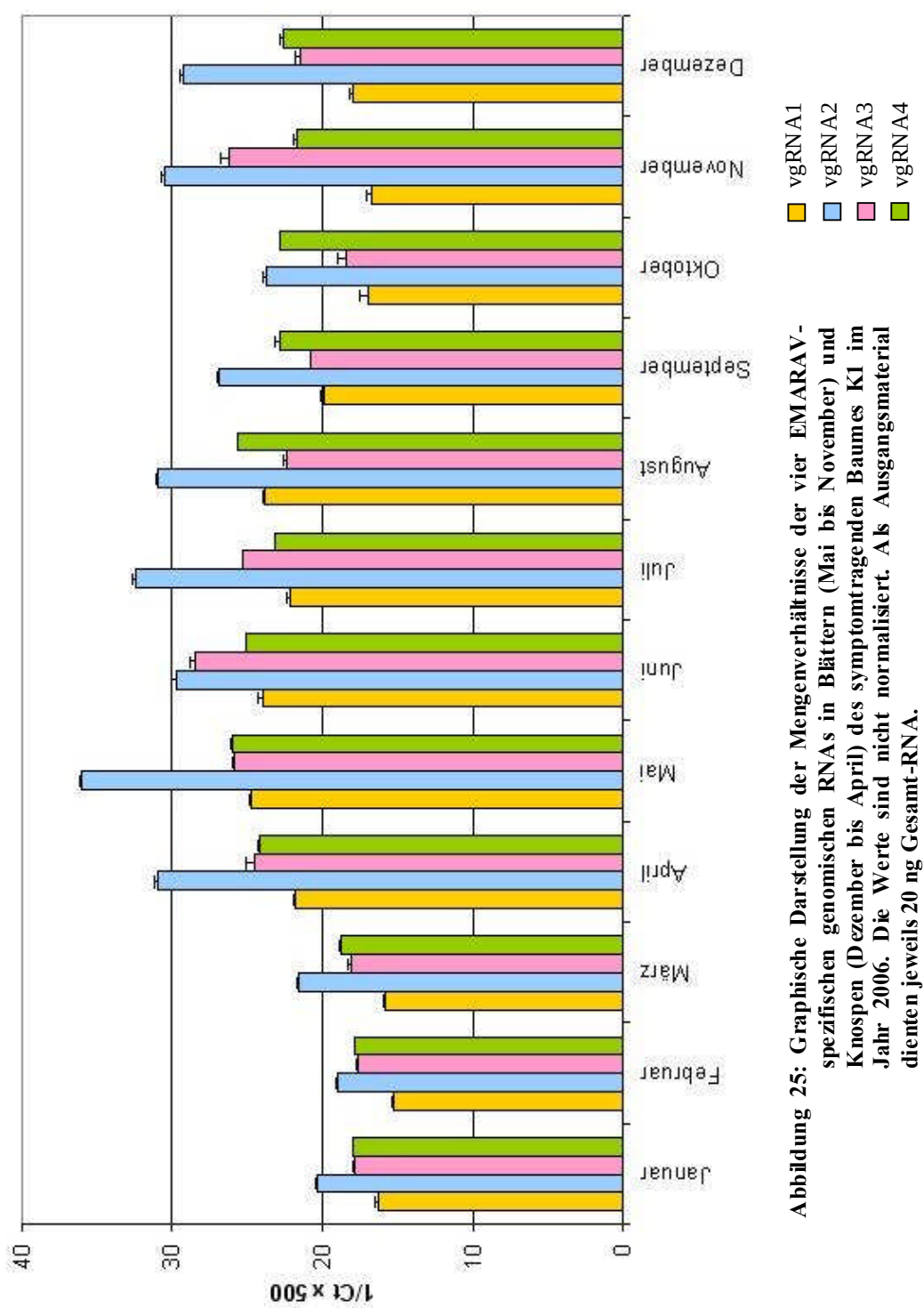
Zur Verdeutlichung des Einflusses der Normalisierungsfaktoren (Tabelle 9, 3.2.8) stellen die Abbildung 24 und Abbildung 25 die nicht normalisierten Verläufe der vgRNAs im Jahr 2006 dar. Die nicht normalisierten Werte überspannten im Jahresverlauf einen geringeren Bereich (14 und 32, Abbildung 24), als es die normalisierten Werte es taten (9 bis 36, Abbildung 22). Der starke Rückgang der Werte der Monate Februar und August nach der Normalisierung beruhte vermutlich auf den kleinen Normalisierungsfaktoren (0,6502 und 0,4456). Die nicht normalisierten Werte im August entsprechen weitestgehend denen im Juli, September und November (Abbildung 24), stellten folglich keinen Tiefpunkt viraler RNA-Mengen dar.

Die höheren Werte der ermittelten normalisierten Virusmengen im Vergleich zu den nicht normalisierten Mengen in den Monaten Mai und November (Abbildung 22) beruhten zum Teil auch auf den hohen Normalisierungsfaktoren dieser Monate (1,3336 und 1,4936).

Die Normalisierungsfaktoren für Blätter bzw. Knospen des Baumes K1 (Tabelle 9, 3.2.8) waren für den Monat April extrem (9,6693) und für die Monate Januar, März und Dezember (zwischen 2,5443 und 3,4785) immer noch sehr groß. Abbildung 23 zeigt die extrem hohen normalisierten Werte für die viralen RNAs in diesen Monaten. Im Gegensatz dazu lagen die nicht normalisierten Mengen der vgRNAs das ganze Jahr hindurch dicht zusammen (15 bis 37, Abbildung 25). Relativ große nicht normalisierte vgRNA-Mengen wurden den Frühling und Sommer hindurch, aber auch im November und Dezember detektiert (Abbildung 25).

Die Normalisierungsfaktoren des Baumes K1 und damit auch ihr Einfluss auf die gemessenen RNA-Mengen im Baum K1 waren größer als die Normalisierungsfaktoren und deren Einfluss auf den Baum B1. Es werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit überwiegend die Werte des EMARAV-infizierten Baumes B1 betrachtet.





Die beiden gewählten EMARAV-infizierten Versuchsbäume unterscheiden sich in natürlichen Faktoren wie Standort und Vitalität. Der Baum K1 war jünger als 10 Jahre, zeigte schwächere Symptome und stand am Waldrand, wohingegen B1 älter als 20 Jahre war, starke Symptome auf Blättern vieler Zweige zeigte, starken Pilzbefall aufweist und in einer Baumgruppe in der Nähe eines Baches stand (2.1.6). Auch die Normalisierungsfaktoren (Tabelle 9, 2.2.15.1) unterscheiden sich. In Abbildung 26 sind die Verhältnisse der vgRNA1 in Blättern beziehungsweise Knospen der Versuchsbäume B1 und K1 dargestellt. Besonders große Unterschiede bestanden in den Monaten Januar, März, April und Dezember. In all diesen Monaten überragte die vgRNA1-Menge in Baum K1, die im Baum B1 um ein Vielfaches. Das umgekehrte Bild zeigte sich in den Monaten Juli, September, Oktober und November. In diesen Monaten ist sehr viel mehr vgRNA1 in dem Baum B1 als im Baum K1 nachweisbar. Dieses uneinheitliche Bild (Abbildung 26) korreliert nicht mit dem Ausmaß an Symptomen, sondern dürfte ursächlich auf die sehr unterschiedlichen Normalisierungsfaktoren (Tabelle 9) zurückzuführen sein, die wie bereits erwähnt, für K1 sehr uneinheitlich waren. Ein direkter Vergleich der viralen RNA-Konzentrationen in diesen Bäumen ist daher nicht möglich.

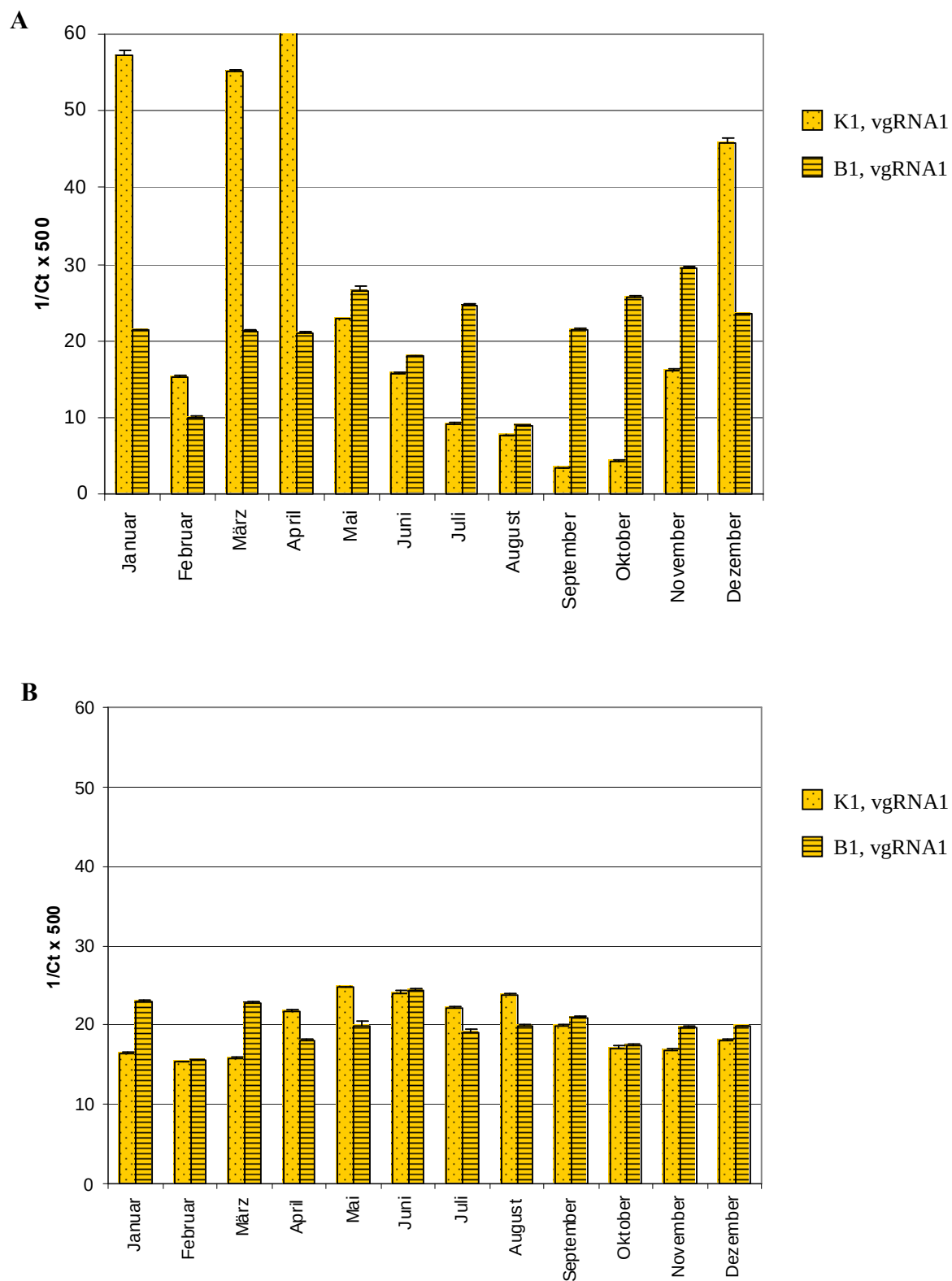


Abbildung 26: Mengenverhältnisse der vgRNA1 in Blättern bzw. Knospen der beiden EMARAV-infizierten Bäume B1 und K1. A: Die Werte sind normalisiert. B: Die Werte sind nicht normalisiert. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 20 ng Gesamt-RNA.

Für die Analyse der viralen RNAs im Bast (Phloem) wurden drei Blöcke von je zwei Monaten untersucht. Diese befanden sich im Winter (Januar und Februar), im Frühsommer (Mai und Juni) und im Herbst (September und Oktober).

Von den genomischen RNAs im Bast (Phloem) junger Zweige im Baum B1 war die vgRNA2 immer am stärksten vertreten (Abbildung 27). In allen sechs untersuchten Monaten stellte die vgRNA4 die zweitstärkste Fraktion dar, wobei in den Monaten Mai und September die vgRNA3 keine signifikanten Unterschiede zur vgRNA4 erkennen ließ. In allen untersuchten Proben wies die vgRNA1 stets die geringste Menge auf (Abbildung 27).

Die niedrigste Konzentration aller vier vgRNAs wurde im Bast in dem Monat September ermittelt (Abbildung 27), während in den Blättern für den September relativ hohe Werte gefunden wurden (Abbildung 22).

Hingegen waren die vgRNA-Konzentrationen im Februar 2006 im Bast am höchsten (Abbildung 27), während in Blattknospen in diesem Monat nur sehr geringe Mengen an vgRNA ermittelt wurden (Abbildung 22).

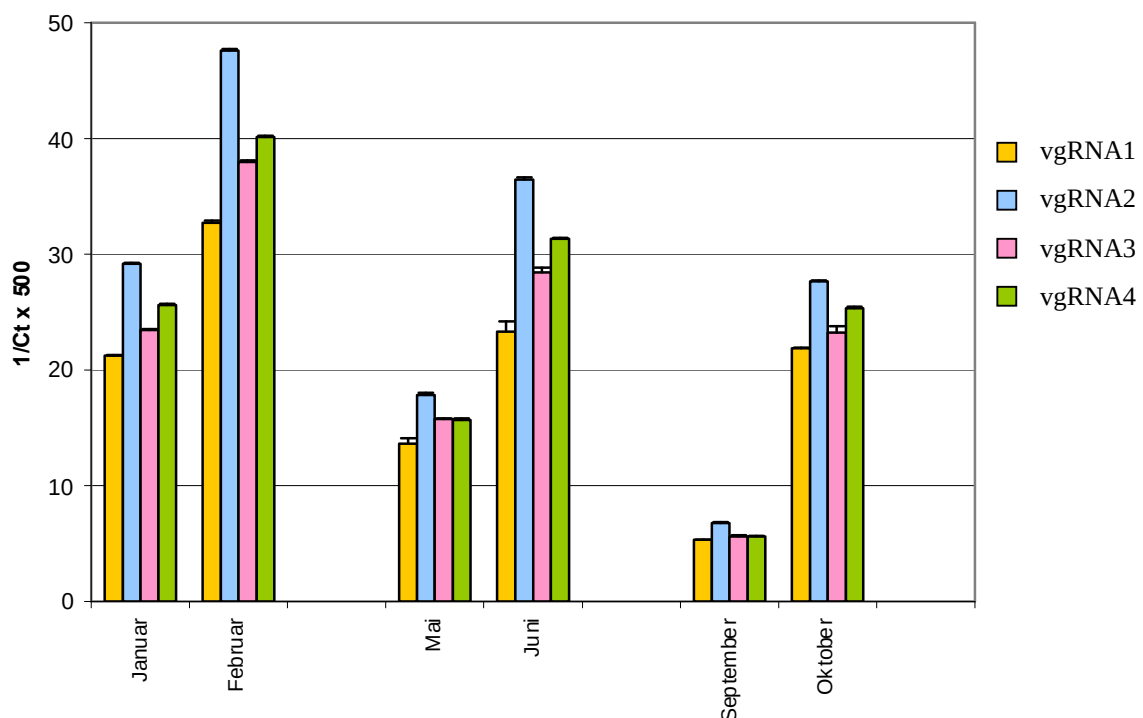


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Mengenverhältnisse der vier EMARAV-spezifischen genomischen RNAs im Bast (Phloem) junger Zweige des symptomtragenden Baumes B1 in den Monaten Januar, Februar, Mai, Juni, September und Oktober des Jahres 2006. Die Werte sind normalisiert. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 20 ng Gesamt-RNA.

Bei der Betrachtung der Mengenverhältnisse der EMARAV-spezifischen genomischen RNAs im Bast (Phloem) junger Zweige bei Baum K1 hingegen waren jeweils die vgRNA2 und die vgRNA4 die am stärksten konzentrierten viralen RNAs (Abbildung 28). Das Mengenverhältnis dieser beiden RNAs war in allen sechs Monaten ähnlich. Die vgRNA1 und die vgRNA3 zeigten geringere Konzentrationen und die Unterschiede zwischen diesen beiden RNAs waren meist nicht signifikant (Abbildung 28).

Wie bei dem Baum B1 wurden auch im Bast des Baumes K1 die geringsten Mengen an viraler RNA im September, die höchsten im Februar gemessen.

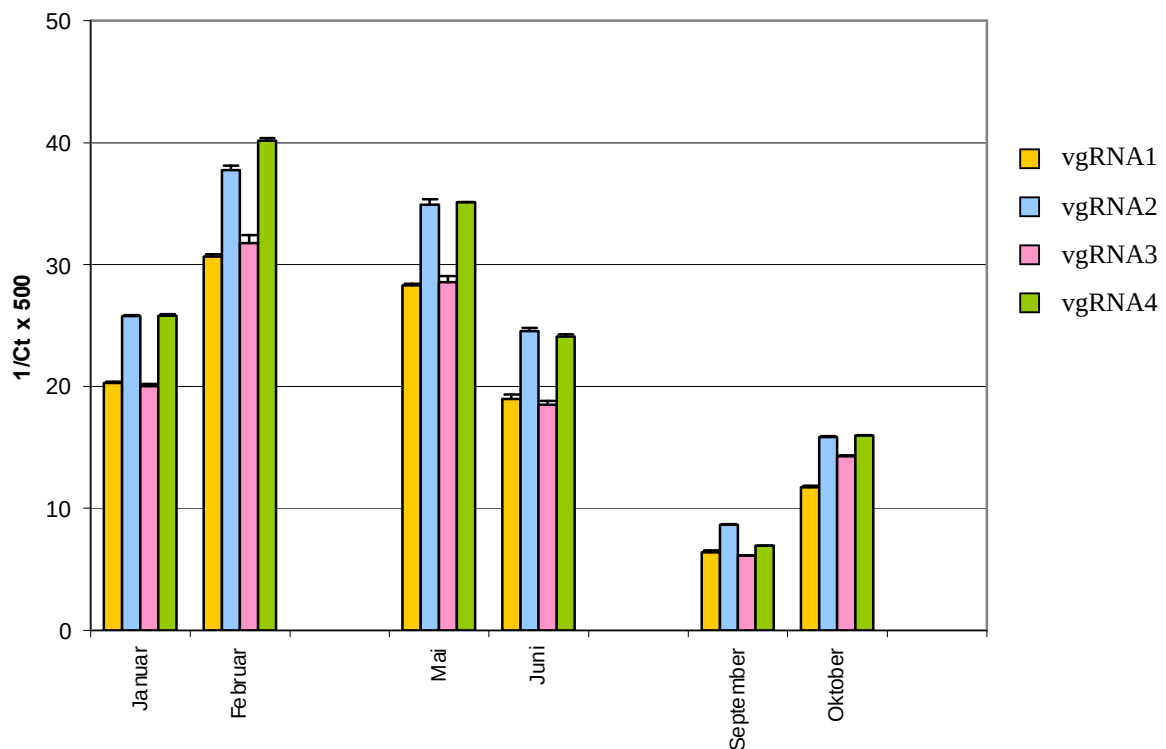


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Mengenverhältnisse der vier EMARAV-spezifischen genomischen RNAs im Bast (Phloem) des symptomtragenden Baumes K1 in den Monaten Januar, Februar, Mai, Juni, September und Oktober des Jahres 2006. Die Werte sind normalisiert. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 20 ng Gesamt-RNA.

In Abbildung 29 sind die Mengen der vgRNA1 und der vgRNA2 in drei Blöcken zu je zwei Monaten dargestellt. Die Daten der beiden vgRNAs stammen jeweils aus Blättern bzw. Knospen oder dem Bast (Phloem) der Wintermonate Januar und Februar, aus dem Mai und Juni, sowie aus den Herbstmonaten September und Oktober. An jedem untersuchten Zeitpunkt, lag die Menge der vgRNA2 sowohl im Bast, als auch in Blättern bzw. Knospen höher als die der vgRNA1.

Im Januar fanden sich nur geringfügig höhere Mengen der beiden vgRNAs1 und 2 im Bast als in Knospen (Abbildung 29). Im Februar überragten die vgRNA-Mengen im Bast (33 und 47) jene in Knospen (10 und 11) sehr deutlich und stiegen auf das höchste Niveau im Jahresverlauf. Im Mai fanden sich größere Mengen der viralen RNAs in jungen Blättern als im Bast junger Zweige. Die Unterschiede waren aber nicht so extrem wie im Februar. Die zweitgrößte Menge der beiden untersuchten vgRNAs in den sechs betrachteten Monaten ließ sich im Juni im Bast für die vgRNA2 ermitteln. Auch das Niveau der vgRNA1 lag im Juni im Bast über dem der Blätter. In den Blättern des Septembers ließen sich etwas größere Mengen an vgRNAs nachweisen als in Blättern des Junis. Im Gegensatz dazu stand der extreme Abfall der Konzentrationen der vgRNAs im Bast mit invertierten C_t -Werten um 37 im Juni und 7 im September. Im Oktober lagen die Mengen der vgRNA1 und der vgRNA2 in beiden Geweben auf ähnlichem Niveau. Ihre invertierten C_t -Werte lagen ähnlich denen im Januar zwischen 21 und 32.

Abschließend lässt sich sagen, dass in drei von sechs Monaten (Mai, September und Oktober) in Blättern bzw. Knospen mehr virale RNAs vorliegen als im Bast und in den verbleibenden drei Monaten (Januar, Februar und Juni) der Bast mehr vgRNA 1 und vgRNA2 enthält.

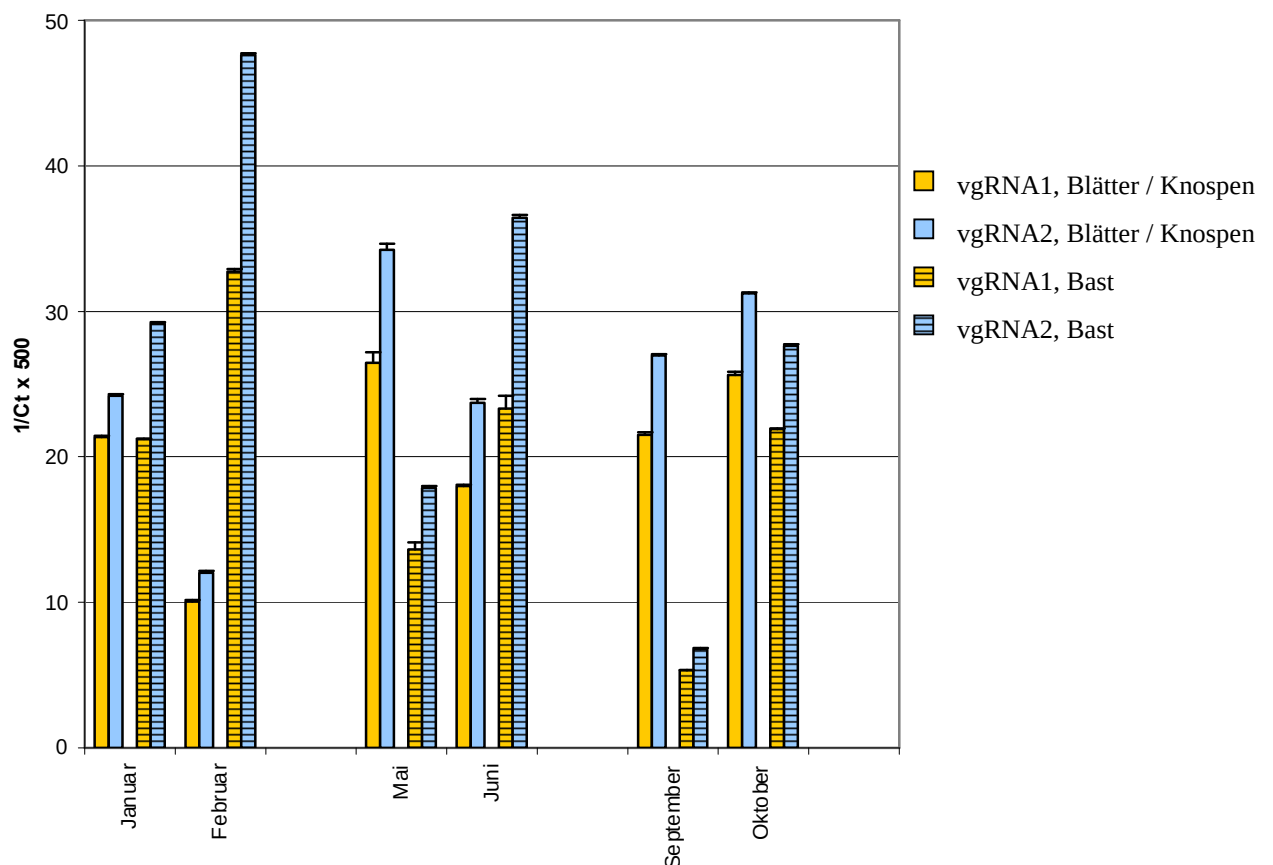


Abbildung 29: Graphische Darstellung der Mengenverhältnisse der EMARAV-spezifischen genomischen RNA1 und RNA2 im Bast (Phloem) und in Blättern bzw. Knospen des symptomtragenden Baumes B1 in den Monaten Januar, Februar, Mai, Juni, September und Oktober des Jahres 2006. Die Werte sind normalisiert. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 20 ng Gesamt-RNA.

3.2.12 Verhältnisse von genomischen Minus-Strang RNAs zu copy Plus-Strang RNAs

In einem ersten Versuch zur weiteren Charakterisierung von EMARAV, bzw. seines Replikationszyklusses sollte das Verhältnis von viraler genomischer (vg) (-)Strang-RNA zu viraler copy (vc) (+)Strang-RNA untersucht werden. Hierfür wurden sowohl Blätter bzw. Knospen als auch Bast (Phloem) analysiert.

Abbildung 30 gibt die Kopienzahl aller vier vgRNAs und vcRNAs wieder. Die jeweils untersuchten 20 ng Gesamt-RNA aus zwei verschiedenen Monaten stammten vom symptomtragenden Baum B1. Von allen viralen RNAs wurden stets mehr Kopien vgRNA-Spezies als vcRNAs detektiert. Die vgRNA1 lag im Januar in Blattknospen in ca. 5×10^5 Kopien vor, wohingegen nur ca. 1×10^4 Exemplare des Plus-Strangs (vc) gemessen wurden (Abbildung 30). Dies entsprach einem 50-fachen Überschuß an vgRNA. Für die vRNA2 galt Ähnliches. Es lagen 3×10^6 vgRNA2-Kopien und 4×10^5 vcRNA2-Kopien vor, also ca. 8-mal so viel vgRNA wie vcRNA. Von RNA3 waren 1×10^5 Kopien vgRNA3 und 3×10^4 Kopien vcRNA3 vorhanden und von RNA4 2×10^5 Kopien vgRNA4 und 4×10^4 Kopien vcRNA4. Somit lag bei RNA3 und RNA4 die genomische RNA im 3-fachen Überschuss vor, verglichen mit der vcRNA. Auch bei den im Juni geernteten Blättern wurden jeweils vielfach höhere Anteile der vgRNAs im Vergleich zu den vcRNAs gefunden. Es befanden sich 20mal so viel vgRNA1-, 30mal so viel vgRNA2-, 5mal so viel vgRNA3- und 12mal so viel vgRNA4-Kopien in Blättern als die entsprechenden vcRNAs.

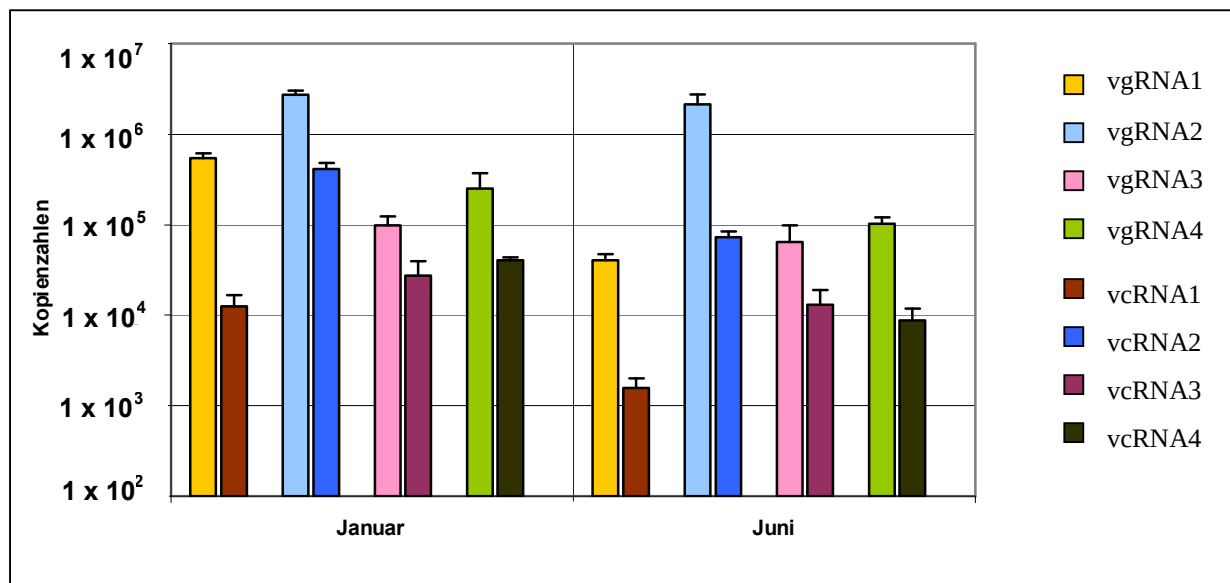


Abbildung 30: Kopienzahl der vier EMARAV-spezifischen Minus- (vg) und Plus- (vc) Strang-RNAs in Blättern bzw. Knospen des Baumes B1 in den Monaten Januar und Juni.

Abbildung 31 veranschaulicht die Kopienzahlen der Minus- (vg) und Plus- (vc)-Stränge der vRNA2 und der vRNA3 im Bast junger Zweige des EMARAV-infizierten Baumes B1. Auch hier konnten für beide RNAs in beiden Monaten mehr Kopien der vgRNAs, als vcRNAs nachgewiesen werden. Mit 2×10^7 Kopien vgRNA2 und 3×10^6 Kopien vcRNA2 im Januar ließ sich auch im Bast ein ähnliches Verhältnis, wie es bereits für Blätter bzw. Knospen gefunden wurde bestätigen. Die Menge der vgRNA2 überstieg die Menge an vcRNA2 um das siebenfache. Die vgRNA3 liegt im Vergleich zur vcRNA3 in einem 10-fachen Überschuß vor. Ein ähnliches Bild wurde für den Monat Juni erhalten.

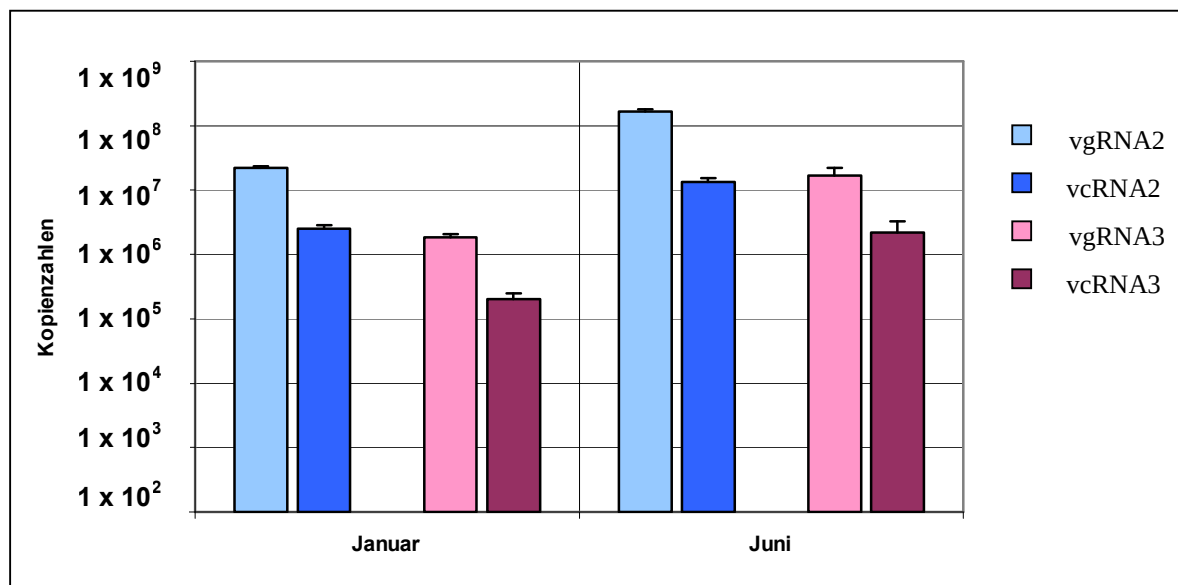


Abbildung 31: Kopienzahl der EMARAV-spezifischen vgRNA2 und vgRNA3, bzw. vcRNA2 und vcRNA3 im Bast junger Zweige des Baumes B1 in den Monaten Januar und Juni. Als Ausgangsmaterial dienten 20 ng Gesamt-RNA.

3.2.13 Quantifizierung der vgRNA2 in unterschiedlich symptomatischen Blattarealen

Bis heute ist nicht bekannt, weshalb an EMARAV-infizierten Bäumen oft auf ein und demselben Blatt unterschiedliche Symptome, in Form von Ringflecken und Scheckungen nebeneinander auftreten. So sind häufig typische Ringflecken neben einem eher uneinheitlichen als Scheckung bezeichnetem Muster zu erkennen (Abbildung 32A und Abbildung 32B). Mit qRT-PCR-Experimenten sollte somit geklärt werden, ob eine Korrelation zwischen den Symptomen und der Konzentration an viraler RNA in diesem Bereich vorliegt. Abbildung 32 zeigt Blätter mit den unterschiedlichen Symptomen sowie ein Ebereschensblatt, aus dem symptomfreie, ringfleckige und gescheckte Blattbereiche

ausgeschnitten wurden. Aus diesen kleinen Blattstücken wurde wie zuvor Gesamt-RNA isoliert und zur Quantifizierung der viralen genomischen RNA2 eingesetzt.

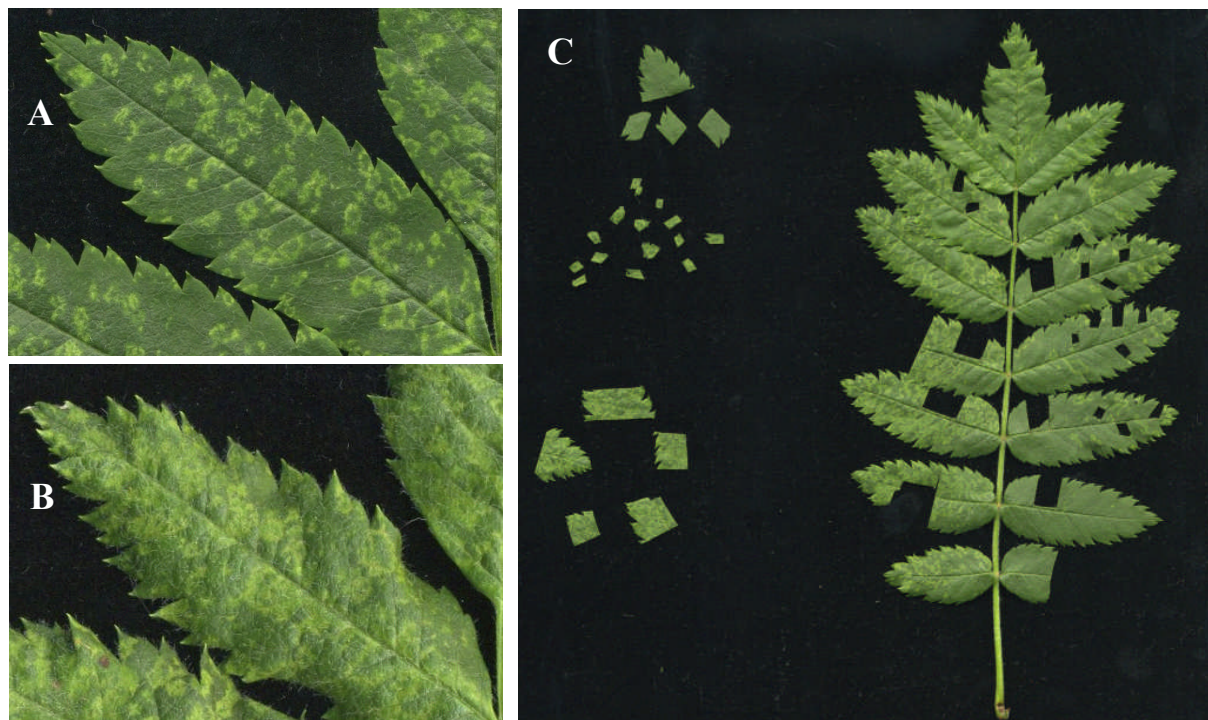


Abbildung 32: A: Chlorotische Ringflecken B: Scheckungen auf Blättern EMARAV-infizierter Eberesche. C: Ebereschenblatt, aus dem Bereiche unterschiedlicher Symptome ausgeschnitten wurden. Oben: symptomfrei, mittig: Ringflecken, unten: Scheckungen.

Abbildung 33 zeigt die graphische Darstellung der kalibrierten und invertierten C_T -Werte, die für die vgRNA2 in unterschiedlichen Blättern und Symptomen ermittelt wurden. Es wurden jeweils in vier verschiedenen Blättern die Mengen der vRNA2 bestimmt. Auch hier wird durch einen gewissen, als unspezifisch zu betrachtenden Hintergrund, der in nicht EMARAV-infizierten Proben (Baum SF) beobachtet wurde, die hohe Sensitivität und Sensibilität der qRT-PCR deutlich (Abbildung 33A, „nicht infiziert“). In symptomfreien Blattarealen infizierter Bäume wurden C_T -Werte zwischen 20 und 27 bestimmt (Abbildung 33A), was etwa 1×10^5 bis 1×10^7 Kopien entspricht (Abbildung 33B). Der Unterschied zu den Konzentrationen in ringfleckigen und gescheckten Blattbereichen ist signifikant, wohingegen zwischen letzteren beiden keine signifikanten Abweichungen bezüglich der Menge der vgRNA2 bestanden. Die symptomatischen Areale der vier infizierten Blätter weisen deutlich höhere kalibrierte und invertierte C_T -Werte zwischen 34 und 38 auf (Abbildung 33A), also zwischen 9×10^7 bis 3×10^8 Kopien pro 20 ng Gesamt-RNA (Abbildung 33B). Dies entspricht demnach einer 10- bis 1000-fachen Menge an vgRNA2 im Vergleich zu symptomfreien Bereichen eines infizierten Blattes.

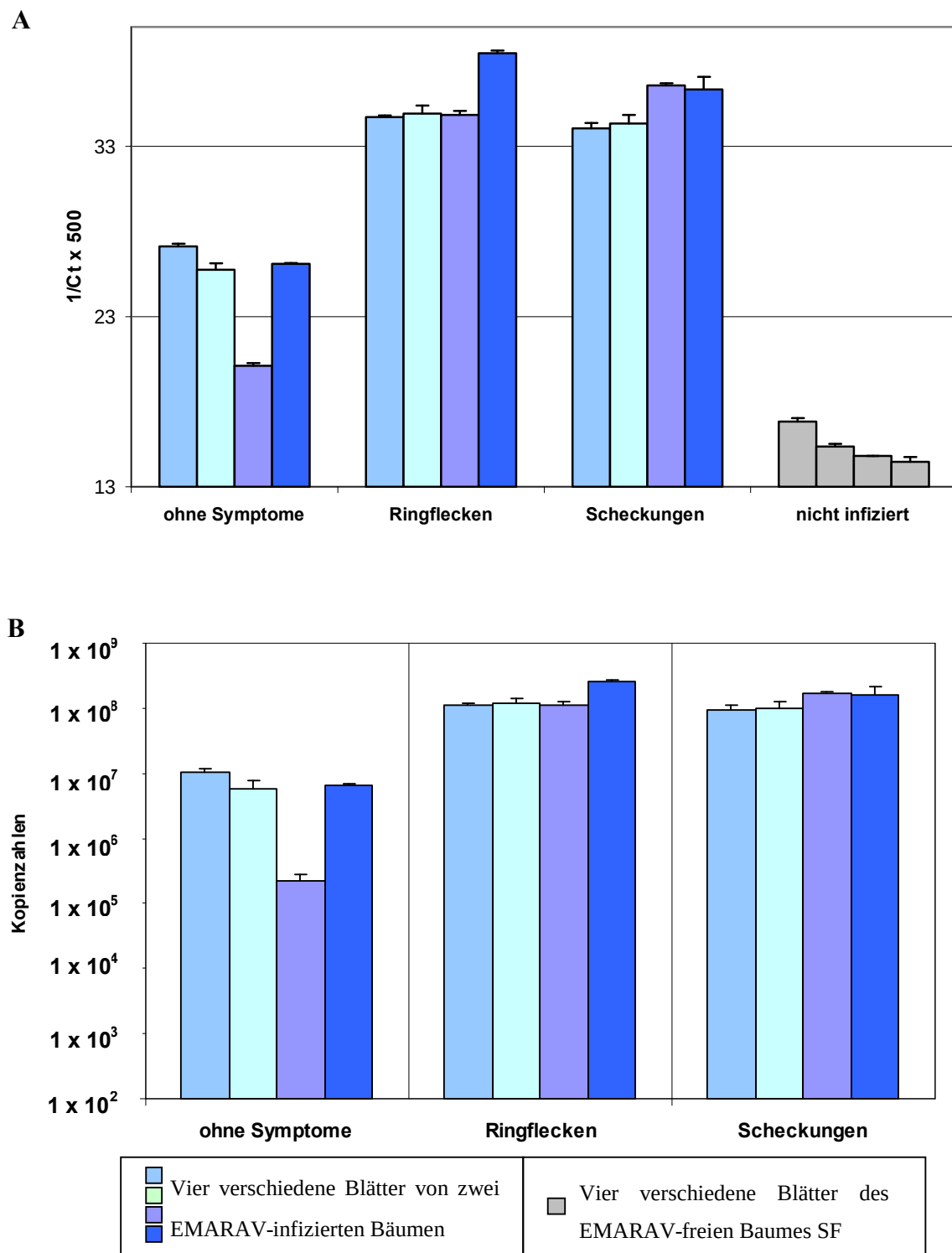


Abbildung 33: Graphische Darstellung der Mengenverhältnisse (A) und Kopienzahlen (B) der vgRNA2 in verschiedenen EMARAV-infizierten Blättern (ohne Symptome, Ringflecken, Scheckungen) und in Blättern des EMARAV-freien Baumes SF (nicht infiziert). Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 20 ng Gesamt-RNA.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte mit zwei verschiedenen Verfahren die virale RNA des EMARAV in unterschiedlichen Geweben detektiert werden. Während die *in situ*-RT-PCR eine Lokalisation der EMARAV-spezifischen Nukleinsäuren insbesondere in Parenchymzellen und im Phloem vermuten lässt, ermöglichte die real time RT-PCR (im weiteren Verlauf qRT-PCR genannt) darüber hinaus deren zuverlässige Quantifizierung. Die erhaltenen Ergebnisse liefern somit wichtige neue Erkenntnisse bezüglich des Replikationszyklus von EMARAV in seiner Wirtspflanze *Sorbus aucuparia* L. und tragen maßgeblich zu einer weiteren Charakterisierung dieses neuartigen Pflanzenvirus bei.

4.1 *In situ*-RT-PCR

4.1.1 Etablierung der Versuchsbedingungen

Eine besondere Herausforderung bei dem Nachweis von RNA mittels *in situ*-Experimenten (Hybridisierungen und RT-PCRs) stellt sicherlich die Vielfältigkeit der zu untersuchenden Gewebe dar. Bei herkömmlichen RT-PCR oder Northern-Blot-Experimenten ist es ausschlaggebend, intakte und reine RNA aus dem Gewebe oder Organismus zu isolieren. Im Gegensatz dazu müssen Gewebe, die für *in situ*-Experimente eingesetzt werden sollen, so behandelt werden, dass das geschnittene Gewebe gut erhalten bleibt und dennoch alle für RT-PCR oder Hybridisierung nötigen Substanzen in das Gewebe gelangen können. Darüber hinaus ist natürlich auch hier unabdingbar, dass die RNA während der ganzen Prozedur intakt und auch zugänglich bleibt. Es ist leicht vorstellbar, dass die Einbettung und Fixierung verschiedenster Gewebe wie menschliche Knochen, Mosquito- oder Hela-Zellen, Arabidopsiswurzeln, Protoplasten, embryonales Maisgewebe oder Ebereschblätter einer eigenen Etablierung bedarf.

Für den Nachweis EMARAV-spezifischer Nukleinsäuren mit Hilfe der *in situ*-RT-PCR (IS RT-PCR) wurden in dieser Arbeit Blätter und Blattstiele der Eberesche eingesetzt. Da dieser nord- und mitteleuropäische Baum physiologischen und jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt, war es nicht immer möglich, Gewebe des gleichen Entwicklungsstadiums für die Versuche einzusetzen. Dies kann unter Umständen mitverantwortlich für die zum Teil schwachen Signale nach der Immunodetektion der RT-PCR-Produkte sein, da der Gehalt an Virus, aber auch an inhibitorischen sekundären Pflanzenstoffen schwankt. So ist bekannt, dass

viele Viren, die in Gehölzern vorkommen, heterogen verteilt sind und ihre Konzentrationen sich jahreszeitlich verändern (Bitterlin, 1984). Für EMARAV ist bekannt, dass seine Replikationsintermediate (dsRNA) am zuverlässigsten in der Zeit von Mitte Mai bis Anfang Juni, aber zum Teil auch bereits ab April nachzuweisen sind (Benthack *et al.*, 2005). Ferner ist die Eberesche reich an Polyphenolen und Polysacchariden, die durch Bindung an Nukleinsäuren die PCR-Effektivität beeinträchtigen können (Rezaian und Krake, 1987; Singh *et al.*, 2002; van Raemdonck *et al.*, 2005).

Die Fixierung des Ebereschengewebes mit 63% Ethanol und 2% Formaldehyd in einem PBS-Puffer erwies sich aus histologischer Sicht als gut geeignet. Das Formaldehyd bedingt eine Protein-DNA-RNA-Quervernetzung und hat gewebskonservierende Eigenschaften (Komminoth *et al.*, 1992; Teo und Shaunak, 1995), birgt allerdings auch die Gefahr spätere enzymatische Reaktionen wie die RT-PCR zu inhibieren, da es sich nur schwer vollständig aus Geweben wieder entfernen lässt (Puchtler und Meloan, 1985). Auch ist bekannt, dass Formaldehyd DNA-Einzelstrangbrüche verursachen kann (Grafstrom *et al.*, 1984). Die in der *in situ*-RT-PCR eingesetzten Dig-markierten Desoxynukleotide könnten zur Reparatur dieser Einzelstrangbrüche genutzt werden und so zu unspezifischen Signalen im Zellkern führen (Sallstrom *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2003). Da Formaldehyd Proteine sehr stark quervernetzt ist diese Fixierung nicht sehr empfehlenswert, wenn man Histon-assoziierte DNA untersuchen möchte, da diese dann unzugänglich für Polymerasen und andere Versuchsschritte sein könnte (Komminoth *et al.*, 1992). Zwar ist davon auszugehen, dass auch die virale RNA stark mit Nucleocapsidproteinen besetzt ist, doch ist die durch Formaldehyd verursachte Bindung zwischen RNA und Protein nicht so fest, wie die von DNA und Protein (Teo und Shaunak, 1995). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die Signalstärke der EMARAV-spezifischen Amplifikate hierdurch beeinträchtigt wurde.

Die Einbettung der untersuchten Ebereschengewebe in Agarose erfolgte aufgrund der Tatsache, dass dieses Verfahren wesentlich schneller und vermutlich auch schonender für die RNA ist als eine Einbettung in Kunststoffe oder Wachse (wie z.B. Paraplast), die aufwendig infiltriert und wieder aus dem Gewebe entfernt werden müssen. Allerdings können mit einer Agaroseeinbettung nicht für alle Gewebe zufrieden stellende Schnittqualitäten und -dicken erzielt werden. Da Agarose das Gewebe nicht infiltriert, sondern lediglich umschließt, müssen beide ähnliche Festigkeit besitzen. Ist dies nicht der Fall bricht die Probe während des Schneidens am Vibratom aus der Agarose heraus. Für Blätter und Blattstiele der Eberesche erwies sich jedoch die Einbettung in acht bis 10%-ige Agarose als ausreichend, denn es

konnten gute Querschnitte erhalten werden, die den typischen Aufbau eines bifacialen Laubblattes, sowie eines Blattstiels wiedergaben.

Die Entscheidung, ob *in situ*-Experimente auf Objektträgern oder schwimmend in Reagiergefäßen ablaufen sollen, hängt unter anderem davon ab, wie viele Proben bearbeitet und ob mit einer Sonde hybridisiert oder in einer RT-PCR amplifiziert werden soll. Die meisten PCR-Geräte bieten nur Aufsätze für wenige Objektträger, wohingegen bis zu 96 Reagiergefäße Platz haben. Das sehr häufige Wechseln von Wasch- und Enzymlösungen im Laufe von *in situ*-Experimenten ist in Reagiergefäßen zwar aufwendiger, bedarf aber insgesamt geringerer Mengen an Lösungen als das Waschen von Objektträgern in dafür vorgesehenen Gefäßen. In dem Fall der Eberesche hatte die Durchführung der *in situ*-RT-PCR in Reagiergefäßen gegenüber den Objektträgern zudem den entscheidenden Vorteil, dass keine Schnitte während der langwierigen Prozedur verloren gingen, denn trotz zahlreicher getesteter Objektträgerbeschichtungen waren die Verluste an Blattschnitten enorm.

Ein ebenfalls experimentell zu etablierender und besonders wichtiger Schritt ist das Erzielen einer gewissen Durchlässigkeit des Gewebes für die verschiedensten Reagenzien, ohne dieses zu zerstören. Im Fall von Arabidopsiswurzeln mit Syncytien scheint kein enzymatischer Schritt zur Erhöhung der Permeabilität vor RT-PCR-Experimenten nötig zu sein (Wieczorek *et al.*, 2006; Hofmann *et al.*, 2007), wohingegen Nuovo *et al.* (1992) Trypsinogen bzw. Pepsinogen zur späteren Detektion von DNA der *Human papillomaviren 6 und 11* (HPV, *Alphapapillomavirus*, *Papillomaviridae*) in menschlichen Schleimhäuten einsetzten. Dillon *et al.* (2007) verwendeten Proteinase K im Rahmen von Expressionstudien bezüglich Proteasen-kodierender Gene (z.B. Cathepsin L) in Schistosomen und Silva *et al.* (2002) stellten fest, dass Pektinasen und Pepsin sich positiv auf die Durchlässigkeit von Geweben des Mandelbaumes auswirkten. Auch bei den in dieser Arbeit eingesetzten Ebereschenblattgeweben erwies sich die Verwendung der Pektinase Macerozym als erfolgreich und wurde durch das Proteinasegemisch Pronase (Roche) ergänzt, welches sowohl native, als auch denaturierte Proteine bis zu einzelnen Aminosäuren abbaut. Somit bestand hiermit die Möglichkeit Nucleocapsidproteine, die, wie bereits erwähnt, durch Formaldehyd mit der viralen RNA quervernetzt worden sein könnten, zu entfernen.

Die *in situ*-RT-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit gegenüber der *in situ*-Hybridisierung (ISH) bevorzugt, weil nicht bekannt war, wie viel virale RNA-Moleküle in den einzelnen Geweben vorhanden waren und die RT-PCR als sensitiver gilt (Long *et al.*, 1993). Zwar konnten bereits mit der Hybridisierung erste Erfolge zum Nachweis EMARAV-spezifischer Nukleinsäuren in Ebereschenblättern erzielt werden, allerdings war die Stärke der Signale

nicht immer zufriedenstellend (Schlattermund, 2004). Bei der Auswahl der Primerpaare für die *in situ*-RT-PCR wurde darauf geachtet, dass die Amplifikate möglichst länger als 300 bp sind, da von Long *et al.*, (1993) berichtet wurde, dass kurze DNA-Fragmente eventuell aus den anverdauten Zellen herausdiffundieren könnten und somit keine korrekte Lokalisation möglich wäre. Desweiteren können in kleinen Amplifikaten weniger Dig-markierte Nukleotide eingebaut werden und somit die Signalstärke beeinträchtigen. Zu lange Produkte sind allerdings auch zu vermeiden, weil dann große Bereiche der als Template dienende RNA für die Reverse Transkriptase zugänglich und intakt sein müssen (Johansen, 1997; Silva *et al.*, 2003).

Da die Gewebe der Eberesche sehr phenolhaltig sind, sogar die der Eiche, die als Gerbstoffdroge im Deutschen Arzneibuch geführt wird, übersteigen und diese Stoffe im Laufe der Prozedur durch Oxidation zu bräunlichen Polyphenolen (Newbury und Possingham, 1977) werden, sind starke lilafarbene Signale nach der Fällungsreaktion mit NBT/BCIP wünschenswert. Um die Entstehung hochmolekularer Polyphenole zu minimieren wurde deshalb auch Polyvinylpyrrolidon (PVP) in alle Lösungen gegeben. Dies absorbiert (Poly)phenole, die sonst von Phenoloxidasen zu komplexbildenden Verbindungen oxidiert würden und dann gegebenenfalls auch Nukleinsäuren blockieren könnten (Saunders und Parkes, 1999). Die starke Eigenfluoreszenz der Ebereschengewebe, insbesondere durch Lignine (Peters, 1964) und Polyphenole (Prasetya und Roffael, 1991) sprach gegen den alternativen Einsatz von Fluoreszenz-markierten Nukleotiden.

Da in dieser Arbeit die Etablierung der *in situ*-RT-PCR zunächst mit der mRNA von Tubulin, sowie der hoch konzentrierten 18S rRNA erfolgen sollte, mußte die zelluläre DNA mit DNase I abgebaut werden. Mittels Dapi-Färbung wurde gezeigt, dass die DNA aus dem Zellkern nicht vollständig, aber größtenteils entfernt werden konnte. Weitestgehend DNA-freies Gewebe wurde somit in eine RT-PCR mit 18S rRNA-spezifischen Primern eingesetzt. Nach einer Dapi-Färbung wurden Fluoreszenzsignale im Cytoplasma und auch deutlich in den Zellkernen sichtbar. Dies lässt vermuten, dass 18S rRNA-Moleküle sowohl im Cytoplasma, als auch in den Nukleoli erfolgreich amplifiziert wurden. Es kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass noch einige der zahlreichen Genkopien der 18S rDNA trotz DNase Behandlung vorhanden waren.

Auch Koltai und Bird (2000) beobachteten in ihrer *in situ*-RT-PCR Kernsignale, konnten aber nicht klären ob diese gegebenenfalls zusätzlich auf 18S rDNA oder auf defekte, mit Dig-dUTPs reparierte DNA-Stränge zurückzuführen waren. Die hier in *Lycopersicon esculentum* und *Arabidopsis thaliana* erzielten cytoplasmatischen 18S rRNA spezifischen Signale waren

allerdings deutlich stärker als die in Ebereschen erhaltenen. Eine mögliche Ursache hierfür könnten eine Formaldehyd-bedingte Quervernetzung der 18S rRNA mit ribosomalen Proteinen und somit eine für Primer und die Reverse Transkriptase bestehende Unzugänglichkeit gewesen sein. Allerdings nutzen Koltai und Bird FAA zur Fixierung, welches ebenfalls 2% Formaldehyd enthält, allerdings sehr sauer ist. Die beobachteten Unterschiede in der Signalintensität könnten daher eher auf dem pH-Wert der Fixierlösung oder aber auf dem verwendeten Pflanzengewebe beruhen, welches deutlich weniger inhibierende Stoffe enthielten, als die Eberesche. Dennoch waren, wie erwartet, die *Sorbus aucuparia* rRNA-spezifischen Signale jedoch deutlich stärker als die der Tubulin-mRNA, die auf sehr viel weniger Genkopien zurückzuführen ist. Sowohl in Pappel (Oakley *et al.*, 2007) als auch in der Gerste (Schroder *et al.*, 2001) konnte die Expression mehrerer α -Tubulin-Gene in Blattgeweben gezeigt werden. In Pappel wurden acht (Oakley *et al.*, 2007), und in Gerste mindestens fünf α -Tubulin-Gene identifiziert (Schroder *et al.*, 2001).

4.1.2 Lokalisation EMARAV-spezifischer RNAs

Nachdem die exakten Versuchsbedingungen etabliert waren, sollte geklärt werden in welchen Zelltypen und Geweben EMARAV beziehungsweise seine RNA nachweisbar ist. Der Erhalt eindeutiger lilafarbener Signale in verschiedensten Blatt-, sowie Blattstielzellen EMARAV-infizierter Bäume bewies zunächst eine erfolgreiche RT-PCR und Detektion, da ohne die Zugabe von Taq-Polymerase nie ein Signal erhalten wurde. Allerdings kann nicht restlos ausgeschlossen werden, dass falsch-positive Signale durch unspezifische Anlagerung von Primern und anschließender Amplifikation während der PCR-Reaktion entstanden sind.

Aufgrund routinemäßig durchgeführter RT-PCR-Analysen und dsRNA-Präparationen ist bekannt, dass EMARAV in bislang allen untersuchten Geweben wie Blättern, Blattstielen, Knospen, Früchten, Samen und in Bastgeweben junger Zweige EMARAV-infizierter Ebereschen nachweisbar ist (Mielke, 1999; Mielke, 2004; Benthack *et al.*, 2005). Dies würde demnach für eine systemische Infektion der Bäume sprechen. In den meisten Fällen wird ein Pflanzenvirus durch mechanische Übertragung oder einen tierischen Vektor an oder in die Epidermis des Wirtes gebracht. Für eine erfolgreiche systemische Verbreitung des Virus muss dieses in eine Zelle eindringen, sich vermehren und benachbarte Zellen befallen. Diese Zell-zu-Zell-Verbreitung bedarf in der Regel eines Movementproteins (Scholthof, 2005; Taliansky *et al.*, 2008). Die systemische Verbreitung, mittels Langstreckentransport, geschieht dann über Siebzellen des Phloems (van Bel *et al.*, 2002; Peleg *et al.*, 2007; Gosálvez-Bernal *et al.*, 2008; Taliansky *et al.*, 2008).

Ein solcher Transportmechanismus, der üblicherweise in kleineren Leitgefäßen beginnt, wäre theoretisch auch für das EMARAV denkbar, nur konnte bis heute keinem der viralen Peptide die Funktion eines Movementproteins zugeordnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch IS RT-PCR eine Verteilung von EMARAV bzw. der vgRNA2 und der vgRNA4 in parenchymatischen Zellen in Epidermisnähe und im Xylem sowie in Phloemzellen gezeigt werden. Dies unterstreicht die Ergebnisse vorangegangener ISH, bei denen die vgRNA3 in Schwamm- und Palisadenparenchymzellen infizierter Blätter nachgewiesen wurde (Schlattermund, 2004). Immerhin konnten nun zusätzlich vgRNA2-spezifische Signale in Phloemgeweben von Blattstielchen gezeigt werden. Der Nachweis viraler RNA außerhalb des Phloems schließt somit eine Phloemlimitierung von EMARAV aus.

Es ist bekannt, dass der Entwicklungsstatus der Wirtspflanze und Umgebungsbedingungen einen Einfluss auf die Verbreitung eines Virus in seiner Wirtspflanze haben können (Wang *et al.*, 1996). Das *Bean dwarf mosaic virus* (*Begomovirus*, *Geminiviridae*) ist in fast allen Zelltypen in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana* verbreitet. Die Virusmenge ist auch vom Entwicklungsstand des befallenen Gewebes abhängig. Ding *et al.* (1999) konnten zeigen, dass die Temperatur, bei der Gerste (*Hordeum vulgare*) kultiviert wird, einen Einfluss auf die Lokalisation des *Brome mosaic virus* (BMV, *Bromovirus*, *Bromoviridae*) innerhalb der Gewebe haben kann. Die zeitweise Inkubation der Pflanzen bei 34/30°C anstatt bei 24/20°C, sorgte dafür, dass das Virus statt überwiegend in Zellen der Leitgewebe dann vermehrt auch in Mesophyllzellen deutlich außerhalb der Leitbahnen nachweisbar war. Da die ausgewählten Ebereschen jedoch schon seit vielen Jahren infiziert sind und die Bäume unter natürlichen Bedingungen wachsen, sollten die detektierten Zelltypen auch denen der natürlichen Verbreitung des EMARAV innerhalb der Pflanze entsprechen. Die Ungleichmäßigkeit der Signale deutet auf eine heterogene Verteilung hin. Auch für andere Viren in Gehölzen, wie dem *Plum pox virus* (*Potyvirus*, *Potyviridae*) ist dies seit langem bekannt. Das *Prune dwarf virus* (*Ilarvirus*, *Bromoviridae*) wurde mittels IS RT-PCR in Leitgeweben junger Blätter und Blütenknospen, sowie in Mesophyllzellen von Blütenanlagen und in Pollenkörnern nachgewiesen. Die intrazelluläre Lokalisation zeigte die RNA den Zellkern umgebend und auch im Cytoplasma (Silva *et al.*, 2003). Über die intrazelluläre Lokalisation des Nichtstrukturproteins 3 und des Nucleocapsidprotein des *Rice hoja blanca virus* (RHBV, *Tenuivirus*) ist bekannt, dass es im Cytoplasma seiner Wirtspflanze nachweisbar ist (Espinoza *et al.*, 1992; Munoz *et al.*, 2004). Ebenfalls im Cytoplasma konnte das Nichtstrukturprotein (NSm) des Tospivirus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in *Nicotiana rustica* detektiert werden (Storms *et al.*, 1995). Das Nucleocapsidprotein des

TSWV wurde sowohl in Aggregaten in der Nähe des Zellkerns, als auch frei im Cytoplasma nachgewiesen (Snippe *et al.*, 2005). Die Verpackung der Nucleocapside des TSWV und die Anhäufung der beiden Glykoproteine erfolgt an den Membranen des Golgi-Apparates (Snippe *et al.*, 2007).

Die Lokalisation der viralen RNA-, bzw. DNA-Moleküle innerhalb einer Zelle hängt maßgeblich davon ab, wo das Virus repliziert. Während Retro- oder DNA-Viren im Zellkern replizieren (Jacquot *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2008) und deshalb auch oder hauptsächlich dort nachweisbar sind, vermehren sich RNA-Viren ohne DNA-Zwischenstufen, die lediglich viruseigene und cytoplasmatische Zellkomponenten zur Replikation benötigen, in der Regel außerhalb des Zellkerns. Für das ss (+)RNA Virus, *Tomato bushy stunt virus* (*Tombusvirus*, *Tombusviridae*) zum Beispiel wurde als Ort der Replikation in Hefen und Pflanzen hauptsächlich die Membranen der Peroxisomen ausgemacht (Wang und Nagy, 2008). Dennoch gibt es einige RNA-Viren neben den Retroviren, die im Zellkern replizieren wie z.B. Influenza- und Bornaviren (Modrow *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu den tierpathogenen Rhabdoviren replizieren auch einige der mehr als 40 pflanzenpathogenen Rhabdoviren im Zellkern, wie das *Sonchus yellow net virus* (Jackson, 1987; Wagner *et al.*, 1996). Für Viren, die im Zellkern replizieren und transkribieren, ist die Möglichkeit die wirtseigenen Spleissmechanismen nutzen zu können, von Vorteil (Schneider, 2005; Garaigorta und Ortin, 2007; Chiang *et al.*, 2008). Mit dieser Kodierungsstrategie können sie das kleine Genom optimal nutzen. Bunya- und Tenuiviren replizieren außerhalb des Zellkerns (Matthews, 1992). Da die Glykolisierung viraler Proteine, sowie die Bildung der Partikel im bzw. am Golgi-Apparat nachgewiesen wurde, ist von einer Replikation assoziiert mit diesen Membranen auszugehen (Elliott, 1997; Shi *et al.*, 2007). EMARAV konnte durch die vorliegenden IS RT-PCR Ergebnisse keine Replikation im Zellkern nachgewiesen werden, da keinerlei Signale im Kern erhalten wurden.

Leider ließen die hier angewandten Techniken keine konkreten Rückschlüsse auf Zellkompartimente ziehen, in denen sich EMARAV bzw. seine Nukleinsäuren befinden. Ein Protoplastensystem würde sich hier gut eignen um einzelne RNAs, aber auch die bisher bekannten Proteine zu lokalisieren und weitere wichtige Erkenntnisse bezüglich des Replikationsortes zu erhalten.

4.2 qRT-PCR

4.2.1 Etablierung der Versuchsbedingungen

Die q(RT)-PCR stellt heute die sensitivste Methode zum Nachweis von Nukleinsäuren dar und findet sowohl in der Routine-Diagnostik zum Nachweis von Pathogenen als auch für die verschiedensten Fragestellungen der Forschung Anwendung.

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Kategorien von Detektionsverfahren für qPCR. Entweder wird ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, meist Sybr Green, in den Ansatz gegeben oder es werden fluoreszenz-markierte Primer oder Sonden (z.B. molecular beacons, TaqMan-Sonden) genutzt, um die Zunahme amplifizierter, doppelsträngiger DNA zu detektieren (Orlando *et al.*, 1998; Bustin, 2002). Die Verwendung von TaqMan-Sonden erlaubt die hochspezifische Detektion der Amplifikate, wohingegen Sybr Green unspezifisch in jedes doppelsträngige DNA-Molekül interkaliert und deshalb sehr spezifische Primer und Versuchsbedingungen erfordert. Es muss allerdings bedacht werden, dass das Design von optimalen TaqMan-Sonden weder einfach noch der Erwerb günstig ist und nicht für alle Sequenzen gute Primer-Sonden-Kombinationen gefunden werden können. Des Weiteren stellte sich heraus, dass TaqMan-basierte qRT-PCR auch so spezifisch sein können, dass bereits kleinste Mutationen die Detektion der Zielsequenz unmöglich machen. Im Fall des *West nile virus* (*Flavivirus*, *Flaviviridae*) waren bereits zwei veränderte Nukleotide in der TaqMan-Sonden-Bindungsstelle ausreichend, um kein einziges positives Signal mehr zu erhalten (Papin *et al.*, 2004). Gerade für eine zuverlässige Routine-Diagnostik bei recht schnell mutierenden und rekombinierenden RNA-Viren (Chare *et al.*, 2003) müssen solch hochempfindliche Verfahren regelmäßig überprüft und angepasst werden. Die Verwendung von Sybr Green ist unanfälliger gegen Punktmutationen, finanziell günstiger und ermöglicht es dem Experimentator ohne zeitaufwendige Etablierung von Sonden neue Fragestellungen zu bearbeiten. Allerdings müssen die verschiedenen Amplifikate in etwa die gleiche Länge aufweisen, um Fehlinterpretation variierender Fluoreszenz-Signale aufgrund unterschiedlich eingelagerter Sybr Green-Mengen zu verhindern. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit mit Sybr Green gearbeitet und viel Sorgfalt in die Etablierung der Primerpaare und Versuchsbedingungen gelegt. Für die EMARAV-spezifische RNA2 mussten rund 10 Primerkombinationen getestet werden, bevor nur ein spezifisches Amplifikat ohne Nebenprodukte erhalten wurde. Die EMARAV- und Eberesch-mRNA-spezifischen Produkte waren zwischen 81 und 109 bp lang, wobei erstere sich maximal in nur drei Basenpaaren Länge unterschieden. Die Länge der Produkte ist nicht unerheblich für den

Erhalt zuverlässiger Resultate. Mouillesseaux *et al.* (2003) fanden heraus, dass Produkte von 75 bis 100 bp Länge eine höhere Sensitivität und auch Spezifität beim Nachweis von *Taura syndrome virus* (*Dicistroviridae*) und *Yellow head virus* (*Okavirus*, *Roniviridae*) in Krabben besaßen, als ca. 50 bp kurze Amplifikate. Die Amplifikation deutlich längerer DNA-Sequenzen verlängert die Laufzeit der qRT-PCR, da längere Denaturierungs- und Extensionszeiten pro Zyklus verwendet werden müssen und bringt häufig eine geringere Effektivität der Reaktion mit sich (Bustin, 2000). Dies kann in der Routinediagnostik ungewollt sein (Bustin *et al.*, 1999). Da die routinemäßig bestimmten Schmelztemperaturen jedes qRT-PCR-Produkts eine Kombination aus Nukleotidzusammensetzung und Länge des Amplifikats sind, können unterschiedliche Schmelztemperaturen zur Unterscheidung verschiedener Virusstämme herangezogen werden (Mouillesseaux *et al.*, 2003; Varga und James, 2005). Mittels einer in 0,1°C Schritten ausgeführten Schmelzkurvenanalyse eines 74 bp langen Amplifikats, gelang es die *Plum pox virus*-Stämme C, EA und W (*Potyvirus*, *Potyviridae*) zu differenzieren (Varga und James, 2006).

4.2.2 Bedeutung der RNA-Qualität und Ermittlung der qRT-PCR-Effektivität

Um bei der Verwendung verschiedener Primerpaare und Templates untereinander vergleichbare und aussagekräftige Ergebnisse mit qRT-PCRs zu erhalten, sollten die Reaktionen nach Möglichkeit gleiche Effektivitäten besitzen. Eine 100%-ige Effektivität bedeutet, dass tatsächlich in jedem Zyklus der PCR jedes DNA-Molekül verdoppelt wird. In Standard-PCR-Reaktionen spielt die Effektivität keine so große Rolle, da man den Endpunkt der Reaktion betrachtet und nicht quantifiziert. In qRT-PCRs sollten die Effektivitäten möglichst über 80% und unter 100% liegen. Da es in einem PCR-Zyklus nicht möglich ist, ein DNA-Molekül mehr als zu verdoppeln, entsteht eine Effektivität >100% aufgrund unspezifischer Amplifikation. Diese sind unbedingt zu vermeiden (Bustin, 2000; Vandesompele *et al.*, 2002). Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Effektivitäten zwischen 79,7 und 95,3% (Tabelle 8, Seite 45), gehen auf cRNA-Verdünnungsreihen zurück und liegen innerhalb des gewünschten Bereichs. Sie gingen als Skalierungsfaktor in die Berechnungen der C_T -Werte ein. Die so ermittelten Skalierungsfaktoren berücksichtigen allerdings die teilweise RT-PCR inhibierenden sekundären Pflanzenstoffe nicht. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass die Effektivitäten der Reaktionen in Abhängigkeit der RNA-Isolationen variieren. Es wäre also optimal gewesen, für jedes Primerpaar die Effektivität jeder RNA-Isolation individuell durch eine Verdünnungsreihe zu bestimmen, da nur so der Einfluss inhibierender Sekundärstoffe hätte ermittelt werden können.

Da von einer solchen Effektivitäts-Überprüfung aufgrund der hohen Anzahl an untersuchten Proben abgesehen wurde, ist es möglich, dass in Monaten, in denen viele Inhibitoren in der Gesamt-RNA-Isolation vorhanden waren, tatsächlich größere RNA-Mengen enthalten waren als mittels qRT-PCR detektiert werden konnten. Ein weiterer wichtiger Punkt bezüglich der in qRT-PCRs eingesetzten RNA ist deren Qualität und exakte Menge (Bustin, 2002). Der Einfluss von unterschiedlichen RNA-Isolierungsmethoden und daraus resultierenden Verunreinigungen oder Degradationen der RNA erwies sich im Fall des *Potato spindle tuber viroid*-Nachweises (*Pospiviroid*, *Pospiviroidae*) als sehr deutlich (Boonham *et al.*, 2004) und hatte einen größeren Einfluss, wenn ältere Kartoffelblätter genutzt worden. Eine höhere Aufreinigung mittels cheotroper Reagenzien und einer Phenol/Chloroform-Extraktion lieferte deutlich höhere Amplifikationsraten als gröbere RNA-Präparationen. Bei der Isolierung von mRNAs über Poly-(A)-Aufreinigungskits ist ebenfalls mit sehr geringen Verunreinigungen auch durch DNA zu rechnen, doch besteht im Fall von EMARAV diese Möglichkeit nicht, da die viralen RNAs keine polyadenylierten 3'-Enden besitzen (Mielke und Muehlbach, 2007). Zur Isolierung der Ebereschen-Gesamt-RNA wurde daher eine effektive Nukleinsäureisolationmethode genutzt, bei der allerdings neben RNA auch DNA angereichert werden kann. In einem solchen Fall muss sichergestellt werden, dass diese DNA vollständig abgebaut und aus dem RNA-Ansatz entfernt wurde, bevor die Gesamt-RNA-Konzentration bestimmt wird (Nolan *et al.*, 2006). Auch ist besonders wichtig, dass auf DNA beruhende PCR-Produkte für die potentiellen Standards auszuschließen sind (Peters *et al.*, 2004). Es war in keiner der qPCRs zur Amplifikation Ebereschen-spezifische mRNAs eine DNA-Kontaminationen zu beobachten. Eine zusätzliche Sicherheit zum Ausschluss genomischer DNA bieten Primer, die Intron-Exon-Grenzen überspannen (Xu und Miller, 2004). Im Fall der Eberesche bestand diese Möglichkeit nicht, da keine Introns in den zur Verfügung stehenden Sequenzen enthalten waren.

Das für die polyphenolreichen Gewebe der Eberesche etablierte RNA-Isolationsverfahren (Mielke und Muehlbach, 2007) gewährleistet neben einer ausreichenden Quantität eine hohe RNA-Qualität, die sich hier für qRT-PCR-Versuche als gut geeignet herausgestellt hat.

4.2.3 Normalisierung

Oft werden qPCRs genutzt, um relative Mengen der zu analysierenden Nukleinsäure zu bestimmen. Die erhaltenen Mengen werden dann meist in Relation zu mRNA-Konzentrationen möglichst konstitutiv exprimierter Gene angegeben, die dann als interne Standards bezeichnet werden. Als Verwendung eines externen Standards bezeichnet man hingegen die Zugabe einer bekannten, organismusfremden Nukleinsäure bekannter Konzentration, deren Fluoreszenzanstieg parallel, aber unabhängig zum Fluoreszenzanstieg der zu quantifizierenden Nukleinsäure gemessen wird (Kim *et al.*, 2003). Heutzutage werden überwiegend interne Standards zur Normalisierung genutzt (Brunner *et al.*, 2004; Goncalves *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2006; Nygard *et al.*, 2007; Gonzalez-Verdejo *et al.*, 2008), denn diese minimieren Fehler, die auf den biologischen Schwankungen des untersuchten Organismus beruhen und sorgen dafür, dass zum Beispiel Einflüsse, die durch Verwendung unterschiedlicher Polymerasen entstehen können, mitberücksichtigt werden. Die Etablierung guter Standards ist allerdings zeit- und arbeitsintensiv, denn diese müssen für jeden Organismus, jedes Gewebe und die jeweiligen Versuchsbedingungen neu etabliert werden (Vandesompele *et al.*, 2002; Remans *et al.*, 2008). Als gute interne Standards kommen theoretisch sehr viele Gene in Frage und umso mehr potentielle Standards getestet werden, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit die besten Standards zu erhalten. So ermittelten Czechowski *et al.* (2005) für *Arabidopsis thaliana* recht aufwendig zuverlässige Standards. Sie nutzen Microarrays um hunderte weitgehend konstitutiv exprimierter Gene zu identifizieren und wählten aus diesen einige aus um sie in quantitative PCR-Experimente einzusetzen. Als gute Standards stellten sich unter anderem eine Untereinheit der Phosphatase 2A, ein mit Ubiquitin konjugiertes Enzym und eine Coatomer Untereinheit heraus. Ein Coatomer besteht aus mehreren Hüllproteinen, die Vesikel formen, welche Proteine vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum transportieren.

Häufig verwendete Standards in qPCR-Experimenten in Pflanzen sind die mRNAs von Actin, Tubulin, Ubiquitin und die 18S rRNA (Brunner *et al.*, 2004; Czechowski *et al.*, 2005; Nicot *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2006; Gonzalez-Verdejo *et al.*, 2008). In manchen Pflanzen sind Genfamilien dieser Standards bekannt. Actin und Tubulin zum Beispiel, gehören zu einer Multigen-Familie mit oft drei bis fünf hoch konservierten Isoformen (Schroder *et al.*, 2001), häufig kommen noch Pseudogene hinzu (Sturzenbaum und Kille, 2001). So befinden sich 20 bis 30 Actingene im Genom von *Nicotiana tabacum* (Thangavelu *et al.*, 1993) und ca. 25 im Genom der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) (Moniz de Sa und Drouin, 1996). Es ist anzunehmen, dass auch die Eberesche Genfamilien besitzt. Demnach könnten die gewählten

Primer zur Quantifizierung der Tubulin-mRNA tatsächlich einen Pool an diesen mRNAs, die auf die Expressionen verschiedener Tubulingene zurückzuführen ist, detektieren. Stellt sich das gemeinsame Expressionsniveau dieser Gene als konstitutiv heraus, ist diese Genfamilie als Standard geeignet.

Keine der in der Datenbank bei NCBI zu *Sorbus aucuparia* L. veröffentlichten Sequenzen repräsentieren heutzutage übliche Standards, so dass die im Rahmen dieser Arbeit klonierten Genabschnitte für die 18S rRNA, Polyubiquitin, Actin, Tubulin und der RPB7 die ersten verfügbaren Sequenzen möglicher konstitutiv exprimierter Gene darstellen. Es stellte sich allerdings heraus, dass keines der untersuchten Gene so stabil exprimiert wird, das es in allen Geweben der Eberesche innerhalb eines Jahres als Standard einzusetzen gewesen wäre. Vielmehr mussten für die verschiedenen Bäume und Gewebe stets unterschiedliche WirtsmRNAs zur Normalisierung der erhaltenen Daten bezüglich der viralen RNAs herangezogen werden.

Bisher gibt es leider recht wenige Veröffentlichungen, die sich mit der Etablierung von solchen internen Standards in Freilandpflanzen, besonders in Bäumen beschäftigen. Brunner *et al.* (2004) waren die Einzigen, die potentiell konstitutiv exprimierte Gene über mehrere Monate an einem Gehölz (Pappel, *Populus*, *Salicaceae*) untersucht haben. Allerdings wurden die Pappeln nicht ein Jahr lang jeweils einmal im Monat beprobt, wie es hier für die Eberesche unternommen wurde, sondern es wurden Blattknospen im März und April, Knospen und noch nicht entfaltete Blätter im April, Mai und Juni und terminale Blatt- und Blütenknospen im Oktober geerntet (Brunner *et al.*, 2004). Während der Wintermonate fand keine Beprobung statt. Übereinstimmend mit den Daten für die Eberesche, wurde auch in der Pappel erwartungsgemäß eine hohe Konzentration an 18S rRNA und eine sehr geringe Konzentration von Actin-spezifischer mRNA ermittelt. Die mRNA von Ubiquitin erwies sich sowohl für die Pappel, als auch für einige Gewebe in der Eberesche als geeigneter Standard. Zhang *et al.* (2008) verwendeten dieses Gen ebenfalls als internen Standard bei der Quantifizierung des *Rice stripe virus* (*Tenuivirus*) in Reis. Die Tubulin-mRNA-Mengen zeigten sich in der Pappel als gleich bleibend stabil, wohingegen diese mRNA nur in einem von fünf Fällen in der Eberesche eines der zwei ausgewählten Standards darstellte (Brunner *et al.*, 2004). Olbrich *et al.* (2008) hingegen befanden die mRNA von Actin sowohl in Freiland- als auch in Gewächshaus-Rotbuchen (*Fagus sylvatica* L.) als einen geeigneten Standard. Untersucht wurden hier Sprösslinge unter Ozon- oder Kohlendioxid-reicher Atmosphäre oder unter pathogeninduziertem Stress (*Phytophthora citricola*) sowie alte Bäume im Freiland.

Die Bestimmung guter Standards kann zum Beispiel unter Verwendung von frei verfügbaren Programmen wie BestKeeper (Gonzalez-Verdejo *et al.*, 2008) oder GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002; Czechowski *et al.*, 2005) erfolgen. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete GeNorm liefert die Namen der besten zwei Standards, gibt an, ob das Hinzufügen eines weiteren Standards sinnvoll wäre, berechnet Normalisierungsfaktoren (mit denen die C_t -Werte der mengenmäßig bis dahin unbekannten Nukleinsäuren verrechnet werden) und gibt einen M-Wert an. Dieser M-Wert ist ein Maß der Stabilität der Expressionsniveaus für die gewählten Standards und sollte möglichst klein sein. Für menschliche Gewebe konnten M-Werte $<0,15$ erhalten werden (Vandesompele *et al.*, 2002), wohingegen in Muskelgeweben vom Schwein deutlich höhere Werte zwischen 0,9 und 1,9 erhalten wurden (Erkens *et al.*, 2006), was für eine höhere Schwankung der Expression spricht. Remans *et al.* (2008) konnten recht niedrige M-Werte zwischen 0,3 und 0,4 für *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen die hohen Kadmium- und Kupferkonzentrationen ausgesetzt waren, erhalten. Czechowski *et al.* (2005) erhielten dagegen höhere M-Werte zwischen 0,5 und 1,8 für verschiedene Standards in *Arabidopsis thaliana*. Die M-Werte, die auf Expressionsniveaus der verschiedenen Gene in unterschiedlichen Geweben der Eberesche beruhen, lagen in einem Bereich zwischen 0,36 und 1,23 und sind somit durchaus vergleichbar. Die Verrechnung von C_t -Werten mit Normalisierungsfaktoren sollte in dieser Arbeit dazu genutzt werden, geringfügige Unterschiede in der Aktivität der Eberesche, die sich in unterschiedlichen Expressionsniveaus weitgehend konstitutiv exprimierter Gene (Standards) widerspiegeln, auszugleichen.

Die 18S rRNA diente in diesem Versuchsansatz als eine zusätzliche interne Kontrolle der Versuchsbedingungen, um möglicherweise durch die Prozedur bedingte Fehler wie zum Beispiel das Pipettieren überprüfen zu können, da sie einen definierten Anteil an der eingesetzten Gesamt-RNA hat. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Qualität der RNA, wie zuvor erwähnt, unterschiedliche RT-PCR-Effektivitäten in allen zwölf untersuchten Monaten bedingte. Für zwei der fünf Gewebe wurden von GeNorm zwei andere Standards als 18S rRNA als geeignet ausgewählt. Bei gleichbleibenden Versuchsbedingungen würde dies bedeuten, dass diese Gene über den Jahresverlauf gesehen, sehr stabil exprimiert werden. Dies heißt allerdings auch nicht, dass es nicht einige wenige Monate im Jahr gibt, in denen diese mRNAs relativ zur 18S rRNA gesehen variieren und somit in höheren oder niedrigeren Konzentrationen vorliegen können. Dieses bedingt dann natürlich einen stark abweichenden Normalisierungsfaktor, der in die Berechnungen von relativen vRNA-Mengen eingehen würde. Um dieses auszuschließen, scheint es für eine Quantifizierung, die für Versuchsorganismen gemacht werden sollen, die sehr variablen äußeren Bedingungen

unterliegen, ratsam, allein die 18S rRNA als internen Standard zu wählen oder aber einen externen Standard zu verwenden. Was solche „Ausreißer“-Normalisierungsfaktoren bewirken können, wird am Beispiel der Blätter bzw. Knospen des Baumes K1 deutlich. Die Verrechnung der erhaltenen C_t -Werte mit diesen Faktoren führt zu extrem hohen Mengen an vRNAs im März und eher niedrigen Mengen im Spätsommer und Herbst. Dies steht im Widerspruch zu den nicht normalisierten Werten. Der Vergleich der nicht normalisierten Werte für die Bäume K1 und B1 zeigt, dass für beide in etwa gleiche vgRNA-Mengen ermittelt wurden und dass diese in den Frühlings- und Sommermonaten etwas höher waren als im Winter, der eine gewisse Ruheperiode darstellt. Die extrem hohen Normalisierungsfaktoren der Blätter von K1 bedeuten ein niedriges Expressionsniveau der ausgewählten Standards. Diese wiederum sprechen für einen physiologisch schlechten Zustand und somit eine eingeschränkte Transkription in dem Gewebe. Trotzdem zeigen die nicht normalisierten Werte, viel vgRNAs in diesen Monaten. Dies könnte bedeuten, dass das Virus in der Lage ist einen festen Anteil der zellulären Transkriptionsmaschinerie zu nutzen und weitgehend unabhängig von Umständen, die die Transkription der hier gewählten Standardgene reguliert, repliziert. Im Gegensatz zu den extrem variablen Normalisierungsfaktoren für die Blätter, bzw. Knospen von K1, sind die Normalisierungsfaktoren für den Bast des gleichen Baumes interessanterweise recht ähnlich und verändern die C_t -Werte der vgRNA-Quantifizierung nicht besonders stark. Dies unterstreicht mindestens die Notwendigkeit der individuellen Etablierung guter Standards für jedes untersuchte Gewebe. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass gar kein Gen so konstitutiv exprimiert ist, dass es sich als Standard eignet. Die Tatsache, dass bei qRT-PCR-Experimenten an Freilandbäumen, keine internen Standards gefunden werden konnten, die für jedes Gewebe, jede untersuchte Pflanze und vor allem zu jeder Jahreszeit ein stabiles Expressionsniveau zeigen, könnte mehrere Gründe besitzen. Äußere Einflüsse wie Klima und Standort können auf den gesamten physiologischen Zustand der Bäume einwirken oder es wurden noch nicht die passenden Standards identifiziert. cDNA Bibliotheken, die auf Gesamt-RNAs der Eberesche aus allen zwölf untersuchten Monaten basierten, könnten für Microarray-Untersuchungen genutzt werden, um noch bessere Standards identifizieren zu können, doch hätte ein solches Vorgehen den Rahmen dieser Arbeit überschritten, bei der es um die Quantifizierung viraler RNAs in der Eberesche ging. Es zeigte sich also, dass Verfahren, welche unter recht stabilen Bedingungen, wie sie in Zellkulturen oder eventuell auch noch innerhalb gleichaltriger Pflanzen in Klimakammern vorherrschen, funktionieren, nur schwer auf eine Pflanze im Freiland in Norddeutschland im Jahresverlauf zu übertragen sind.

Standards können demnach, trotz recht geringer M-Werte, nicht stabil genug exprimiert sein. Einen wichtigen Einfluss auf den physiologischen Zustand der hier untersuchten Ebereschen, hat der Standort. Bezüglich der Bodenbeschaffenheit ist festzustellen, dass für den Baum B1 eine gute Nährstoff- und Wasserversorgung gewährleistet ist. Im Gegensatz dazu steht K1 auf sauren Böden in entfernter Nachbarschaft eines Moores. Einen weiteren Einfluss auf die Genexpression des Baumes B1 könnte der Rostpilzbefall haben. Auf dem gesamten Baum B1 zeigten sich deutliche mit Sporen gefüllte Kapseln. Der Baum K1 scheint frei von Rostpilzen. Der Gesamtzustand des älteren Baumes B1 war deutlich schlechter als der von K1, was sich zuletzt darin zeigte, dass B1 einem Sturm im Frühling 2008 zum Opfer fiel.

4.2.4 Quantifizierung der verschiedenen EMARAV-spezifischen RNAs in *Sorbus aucuparia* L.

Die nicht normalisierten Werte der viralen RNAs in Blättern und Knospen beider EMARAV-infizierter Bäume, sind auf ähnlichem Niveau und zeigen auch beide leicht erhöhte Mengen in den Frühlings- und Sommermonaten. Der Sommer stellt eine Photosynthese-aktive Phase des Jahres dar. Der Baum ist physiologisch sehr aktiv und sämtliche wirtsspezifischen Enzyme, die für die Virusreplikation notwendig sind, sind in großen Mengen in der Zelle vorhanden. In diesen Monaten gelang es auch Benthack *et al.* (2005) die größten Mengen doppelsträngiger RNAs zu isolieren, die die Replikationsintermediate darstellen und somit auf eine aktive Replikation von EMARAV schließen lassen. Die nicht normalisierten Werte der qRT-PCRs und der dsRNA-Isolation bestätigen die zu erwartende Replikation des Virus vorzugsweise in jungen Geweben.

Im Gegensatz zu den Blättern, bzw. Knospen, in denen im Frühling und Sommer die größten Mengen an vgRNAs gemessen worden, zeigt sich im Bast bereits im Februar 2006 ein deutlicher Anstieg. Die verhältnismäßig hohen Temperaturen in diesem Monat ließen eventuell die physiologische Aktivität der geschützten Bastzellen schon früher steigen, als dies in den exponierten Knospen der Fall war. Im Februar wurden in Hamburg Durchschnittstemperaturen von 1,2°C gemessen. Das war deutlich wärmer als im Januar mit -1,3°C und sogar wärmer als im März, mit 1°C im Monatsdurchschnitt. Bei Betrachtung der Tiefstwerte fällt auf, dass die Nächte am Anfang des Februars, also als das Probenmaterial von den Ebereschen geerntet wurde, nicht so kalt waren, wie im Anfang des Folgemonats März.

Das Genom des European mountain ash ringspot-associated virus ist zwar vollständig sequenziert (Mielke und Muehlbach, 2007) und es konnten erste Hinweise auf die Funktion der viralen Proteine erhalten werden, doch ist über die molekularen Vorgänge während der Replikation und Transkription wenig bekannt. In einem ersten Versuchsansatz konnte mit Hilfe der qRT-PCR gezeigt werden, dass für alle vier RNAs ein Vielfaches an (-)Strängen im Vergleich zu (+)Strängen vorliegt. Dies unterstützt die Annahme, dass EMARAV zu den ss(-)RNA-Viren gehört. Ein solches Verhältnis wurde auch für das verwandte *La Crosse virus* (LACV, *Orthobunyavirus*, *Bunyaviridae*) und das *Influenzavirus A* (FLUAV, *Influenzavirus A*, *Orthomyxoviridae*) gezeigt (Park *et al.*, 2003; Kempf *et al.*, 2006). Eine hohe Verwandtschaft zu den segmentierten ss(-)RNA-Viren wie den Bunyaviren und Tenuiviren wurde bereits auf Basis der RdRp-Homologien und der Organisation des putativen Glykoproteinprecursors P2 gezeigt (Mielke und Muehlbach, 2007). Die Lage der EMARAV-spezifischen Primerpaare für die RNA1, RNA3 und RNA4 wurden so gewählt, dass sie innerhalb der ORFs liegen und somit bei einer möglichen Verkürzung der mRNAs, die Verhältnisse von (+) zu (-) Strängen in der Zelle nicht verfälschen. Lediglich für die EMARAV-spezifische RNA2 ist kein Primerpaar in dem Bereich des ORF gefunden worden, das den Anforderungen der qRT-PCR gerecht wird. Das eingesetzte Primerpaar liegt 3'-stromabwärts des ORF und könnte demnach bei verkürzter mRNA außerhalb des detektierbaren Bereiches liegen. Für das BUNV und für das humanpathogene LACV (beide *Orthobunyavirus*, *Bunyaviridae*) (Patterson und Kolakofsky, 1984; Hacker *et al.*, 1990; Kempf *et al.*, 2006) ebenso wie für die RNAs von Influenzaviren (*Orthomyxoviridae*) (Goldman *et al.*, 1977; Plotch *et al.*, 1979; Hay *et al.*, 1980; Herz *et al.*, 1981) wurden bereits solche verkürzten mRNAs nachgewiesen. Für die S-RNA des LACV (*Orthobunyavirus*, *Bunyaviridae*) wurde gezeigt, dass im Rahmen der Replikation neben einem vollständigen S-vcRNA-Strang eine am 3'Ende verkürzte mRNA, die die ORFs für das Nucleocapsid(N)-Protein und das Nicht-Strukturprotein (NSs) trägt, transkribiert wird (Patterson und Kolakofsky, 1984). Kempf *et al.* (2006) quantifizierten das LACV in Zellkulturen und Moskitos mittels TaqMan-qRT-PCR. Untersucht wurde die M-vgRNA, M-vcRNA und die ebenfalls verkürzte M-mRNA. Es stellte sich heraus, dass mehr vgRNA, als mRNA und noch weniger vcRNA des LACV vorlag. Nach den bisherigen Untersuchungen liegen keinerlei Hinweise vor, dass im Rahmen des EMARAV-Replikationszyklus verkürzte mRNAs gebildet werden und das Verhältnis (-)RNA2 zu (+)RNA2 ist auf ähnlichem Niveau wie das der anderen RNAs. Des Weiteren lag zu fast jedem untersuchten Zeitpunkt und in jedem untersuchten Gewebe nicht nur die genomische vgRNA2 in größeren Mengen als die

anderen vgRNAs, sondern auch die vc(m)RNA2 in größeren Mengen als die vc(m)RNA1, 3 und 4 vor. Nach heutigem Wissensstand ist also davon auszugehen, dass EMARAV vcRNAs identisch mit den mRNAs sind. Auch in den RACE-Experimenten, die zu den vollständigen Sequenzen des EMARAV führten, wurden in keinem Fall unvollständige bzw. verkürzte virale RNA-Enden erhalten (Mielke, persönliche Mitteilung). Auffällig ist aber auch der sehr starke Überschuss von vgRNA1 im Vergleich zu vcRNA1. Erstere liegt in einem bis zu 30-fachen Überschuss vor. Eine Möglichkeit könnte eine höhere Affinität der RdRp zu dieser RNA sein. Über Promotoren von RNA-Viren ist nicht allzu viel bekannt, doch konnten für das *Uukuniemi virus* (UUKV, *Phlebovirus*, *Bunyaviridae*) exakte Positionen auf den 5'- und 3'-Ende der drei genomischen Minus-Strang-RNAs ermittelt werden, welche für die Replikation und die Transkription nötig sind. Ein Austausch verschiedener Nukleotide am 5'-Ende oder am 3'-Terminus führte dazu, dass keine Aktivität des verwendeten Reportergens Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) mehr nachweisbar war. Die hier benannten Nukleotide konnten auch nicht durch andere, ebenfalls komplementäre Nukleotide ausgetauscht werden, ohne die Promotoraktivität zu beeinträchtigen, was zeigt, dass nicht nur die Sekundärstruktur, sondern die Interaktion bestimmter Nukleotide mit der RdRp für Replikation und Transkription nötig ist (Flick *et al.*, 2002). Für das BUNV wurde ferner gezeigt, dass die komplementären, nichttranslatierten Regionen am 3'- und 5'-Ende aller drei viralen RNAs für die jeweilige RNA-Synthese nötig sind (Barr und Wertz, 2004). Und auch bei *in vitro* Analysen der Promotoraktivität der Enden des FLUAV erwiesen sich komplementäre Nukleotide an definierten Positionen am 3'-Ende der vcRNA mit den 5'-Termini als unverzichtbar für eine erfolgreiche Transkription. Welche komplementären Nukleotide sich an diesen Positionen befanden, war nicht entscheidend, hatte aber geringfügigen Einfluss auf die Stärke des Promotors (Pritlove *et al.*, 1995). Da die RNA1 von EMARAV die RdRp kodiert und diese im Vergleich zu Glyko- und N-proteinen in geringerer Menge benötigt wird, könnte eine geringe Menge an vc- bzw. mRNA1 für eine Regulation auf Promotorebene sprechen. Eine Analyse bezüglich der Promotoreffektivitäten der verschiedenen Bereiche müsste allerdings in ausgeweiteten Studien in einem heterologen System überprüft werden.

Bei der Betrachtung der Verhältnisse der viralen RNAs untereinander fällt auf, dass die Glykoprotein-kodierende vgRNA2 zu fast jeder Zeit in allen Geweben die größten Mengen aufwies. Obwohl hier keine Zusammensetzung der Viruspartikel untersucht wurden, sondern Gesamt-RNA-Isolationen, gibt es doch keinen offensichtlichen Grund, weshalb eine RNA in auffällig größeren Mengen vorliegen sollte als andere. Die vgRNAs dienen der Verbreitung in

Viruspartikel, in dem alle vgRNAs vorliegen müssen, damit es infektiös ist (Enami *et al.*, 1991; Gog *et al.*, 2007). Bei Untersuchungen zur Quantifizierung der RNAs des *Sin nombre virus* (SNV, *Hantavirus*, *Bunyaviridae*) fanden sich in Viruspartikelaufreinigungen gleichviele Kopien der drei genomischen RNA-Moleküle (Hutchinson *et al.*, 1996). Allerdings stellte sich heraus, dass die Anzahl der mRNA-Moleküle untereinander in Zellkulturen schwankt. Es fand sich sehr schnell sehr viel S-mRNA, die M-mRNA stellte die zweitgrößte Fraktion, wohingegen die größte der RNAs (L) die geringste Konzentration aufwies (Hutchinson *et al.*, 1996). Für FLUAV wurden allerdings auch Partikel mit mehr als den acht genomischen RNAs nachgewiesen (Enami *et al.*, 1991). Da für immer mehr segmentierte Viren ein genau vollständiger Satz aller genomischen RNAs in Viruspartikeln nachgewiesen wird, ist anzunehmen, dass die Encapsidierung zumindest bei diesen Viren gerichtet abläuft. Beim *Blue tongue virus* (BTV, *Orbivirus*, *Reoviridae*) scheint das NS2 Protein Bindungen mit verschiedenen, teilweise noch unbestimmten Abschnitten der viralen RNAs einzugehen und so zu einer Verpackung aller vRNAs beizutragen (Lymperopoulos *et al.*, 2006). Allerdings wurde für das ss(+)RNA-Virus *Cucumber mosaic virus* (*Cucumovirus*, *Bromoviridae*) in aufgereinigten Viruspartikeln aus *Nicotiana tabacum* gezeigt, dass die drei genomischen RNAs (RNA1 bis 3) und die subgenomische RNA4 nicht in gleichen Mengen in Partikeln vorliegen (Feng *et al.*, 2006). Während die vgRNA1 und die vgRNA2, die für Komponenten der RdRp kodieren, in gleich vielen Kopien vorlagen, wurden deutlich mehr vgRNA3, die den ORF für das Movementprotein trägt und noch mehr subgenomische vRNA4, welche das Hüllprotein kodiert, nachgewiesen. So scheint hier eine gewisse Abhängigkeit der vgRNA-Konzentration vom Bedarf an bestimmten Proteinen zu bestehen. Auch für das EMARAV-verwandte *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, *Tospovirus*, *Bunyaviridae*) wurden in Partikeln zusätzlich zu den viralen genomischen S-, M- und L-RNAs auch noch die komplementären vcRNAs M und S nachgewiesen, die Glykoproteine, das Nucleocapsidprotein, den Gene Silencing-Suppressor und das Movementprotein kodieren (Kormelink *et al.*, 1992).

Um den Promotoreffekt der nichtkodierenden Bereiche zu analysieren, nutzten Barr *et al.* (2003) die gesamten nichtkodierenden Bereiche der drei viralen RNAs eines anderen Bunyavirus, dem *Bunyamwera virus* (BUNV, *Orthobunyavirus*, *Bunyaviridae*), und ligierten diese mit virusfremder RNA, um den individuellen Einfluss dieser Bereiche auf die Replikation zu untersuchen. Es wurde nachgewiesen, dass mehr M-, als L-, als S-Replikate vorhanden waren. Demnach scheint hier die RdRp eine höhere Affinität zu der glykoproteinkodierenden M-RNA zu besitzen. Ein möglicher Grund für das Vorfinden

unerwartet hoher Konzentrationen der vgRNA2, die ebenfalls die Glykoproteine kodiert, könnte also in der Promotoraktivität am 5'-Ende liegen. Alle vier EMARAV-RNAs besitzen gewisse komplementäre Bereiche, die zur Ausbildung sogenannter Stem-Loop-Strukturen an ihren 5'-Enden führen (Mielke und Muehlbach, 2007). Diese komplementären Bereiche sind je nach RNA zwischen 19 und 23 bp lang. Während die ersten 13 bp konserviert sind, variieren die danach folgenden Bereiche leicht. Es ist daher vorstellbar, dass diese oder sogar ungepaarte Regionen der untranslatierten Bereiche einen Einfluss auf die RdRp-Affinität haben. Eine stärkere Promotoraktivität, die zu einer übermäßigen Replikation nur einer der vier vgRNAs führt, würde allerdings keinen deutlichen Vorteil für das Virus im Rahmen der Verbreitung bedeuten und könnte deshalb eventuell zufällig entstanden sein. Da auch die RdRp des EMARAV keine Korrekturlesefunktion besitzt, ist die Mutationsrate der vRNAs relativ hoch. Mutationen außerhalb der ORFs unterliegen einem geringeren Selektionsdruck, so dass es denkbar ist, dass sich ein zufällig effektiverer Promotor am 5'-Ende der vcRNA2 entwickelt und durchgesetzt hat. Promotorstudien könnten auch hier zur weiteren Aufklärung dieser Beobachtungen beitragen.

Bezüglich der Aufklärung des Überwinterungsgewebes von EMARAV ließen sich virale RNAs in den Wintermonaten sowohl in Blattknospen, als auch im Bast junger Zweige in ähnlichen Konzentrationen nachweisen. EMARAV scheint demnach in beiden Organen überdauern zu können. Pflanzenviren haben je nach Wirtspflanze (krautig oder Gehölz), Klimazone und gegebenenfalls Vektor verschiedene Strategien zur Überdauerung entwickelt. So dienen Samen oder Wurzeln häufig als Virusreservoir (Heathcote, 1967; Rist und Lorbeer, 1988). Für Viren, die einjährige Wirtspflanzen besitzen, wurde gezeigt, dass diese auch in mehrjährigen Pflanzen, die ihrem Vektor ebenfalls als Nahrungsquelle dienen, überwintern können (Kazinczi *et al.*, 2004). Das EMARAV-verwandte TSWV verfügt über ein ausreichend weites Wirtsspektrum, das auch Pflanzen beinhaltet, die während Kälteperioden ausreichend aktive Gewebe haben (Groves *et al.*, 2001). Und von TMV ist bekannt, dass es in am Boden liegenden Pflanzenteilen oder sogar frei im Boden überdauern kann (Matthews, 1992). Viren können jedoch während der Ruheperiode auch in ihren Vektoren überdauern, so wurden in England Indizien für die Überwinterung des *Bean leafroll virus* (BLRV, *Luteovirus*, *Luteoviridae*) in den Eiern des Vektors (*Acyrtosiphon pisum*, *Acyrtosiphon*, *Aphididae*) ausgemacht (Cockbain und Gibbs, 1973). Auch bezüglich der Überwinterungsstrategien mancher tier- und humanpathogener Viren wurden bereits zahlreiche Untersuchungen angestellt (Tabachnick, 1992; Goddard *et al.*, 2003; White *et al.*, 2005). Viren, die von Nagetieren übertragen werden, überdauern oft monatelang im

winterschlafhaltenden Tier (Mills, 2005). Für das LACV wurde bereits 1975 die Überdauerung des Virus in Eiern und Larven des Überträgers *Aedes triseriatus* nachgewiesen. Bluetongue Viren (*Orbivirus*, *Reoviridae*) befallen Schafe und Rinder und werden von dem Insekt *Culicoides sonorensis* übertragen (White *et al.*, 2005). Den Autoren gelang es mittels nested RT-PCR-Experimenten in 30% aller untersuchten Larven und Puppen virale RNA nachzuweisen.

Für die Routinediagnostik von EMARAV ist es von großer Bedeutung, ob zu jeder Jahreszeit zuverlässige Ergebnisse erzielt werden können. Dass sowohl größere Menge der vgRNAs in Bast und Knospen mittels qRT-PCR detektiert werden konnten bestätigt die von Mielke *et al.* (2008) durchgeführten Standard-RT-PCR Ergebnisse. Im Rahmen der Epidemiologie und um eine Verbreitung des Virus auch durch Baumschulen ausschließen zu können, ist ein zuverlässiger Nachweis unabdingbar.

Die q(RT-)PCR spielt in der Virologie vorwiegend im Rahmen der Diagnostik (Tier- und Humanpathologie, sowie Phytopathologie) eine Rolle. Aber auch zur weiteren Charakterisierung eines Virus kann diese Technologie wichtige neue Erkenntnisse liefern. Hier werden immer häufiger absolute Kopienzahlen pro Virion (Feng *et al.*, 2006) oder pro infizierter Zelle (in Zellkulturen) bestimmt (Kempf *et al.*, 2006). Es wurde aber auch die Anzahl an Enteroviren in kalifornischem Fluss- und Meerwasser mittels qRT-PCR bestimmt (Fuhrman *et al.*, 2005) und diente somit einer eher epidemiologischen Fragestellung. Zur absoluten Quantifizierung werden hier keine internen Standards, sondern Plasmide oder cRNAs bekannter Konzentrationen genutzt, deren Sequenzen möglichst denen der zu quantifizierenden Nukleinsäuren entsprechen und die durch mehrere Verdünnungsstufen die Erstellung einer Eichkurve ermöglicht. So wurden aufgrund der vielen verschiedenen zu analysierenden Nukleinsäuren nur eine einzige DNA, die des Tubulin-Plasmids zur Erstellung der Eichkurve und somit zur Kopienzahlbestimmung der EMARAV-RNAs genutzt.

Die in dieser Arbeit ermittelten Kopienzahlen für die viralen RNAs im Juni in Blättern, variierten um den Faktor 30. Es konnten $6,5 \times 10^4$ Kopien der vgRNA3 in 20 ng Gesamt-RNA ermittelt werden. Die Werte der vgRNA1 und der vgRNA4 entsprachen in etwa denen der vgRNA3, die vgRNA2 war, wie bereits erwähnt, mit 2×10^6 Kopien pro 20 ng in größeren Mengen vorhanden. Die vgRNA3 des *Rice stripe virus* (RSV, *Tenuivirus*) wurde von Zhang *et al.* (2008) in Reisblättern mittels TaqMan qRT-PCR in $1,3 \times 10^5$ Kopien nachgewiesen. Leider sind diese Kopienzahlen schwer zu vergleichen, da Zhang *et al.* diese auf 100 mg Frischgewicht beziehen. Eine besser vergleichbare Arbeit, stellt die Quantifizierung des *Citrus tristeza virus* (CTV, *Closterovirus*, *Closteroviridae*) in holzigen Zitruspflanzen dar. Es

wurden ebenfalls 20 ng Gesamt-RNA in qRT-PCRs eingesetzt und Sybr Green zur Detektion genutzt (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007). CTV besitzt ein unsegmentiertes, ss(+)-Strang RNA-Genom. Die Quantifizierung der genomischen RNA ergab 3-mal soviel RNA-Kopien in Rinde ($3,5 \times 10^5$) als in Blättern ($1,1 \times 10^5$). Die Kopienzahlen der vgRNA3 von EMARAV liegt mit $6,5 \times 10^4$ in Juniblättern um das 1,5-fache niedriger, die der vgRNA2 mit 2×10^6 Kopien ist dagegen ca. 18 mal so häufig in 20 ng Gesamt-RNA vertreten. Die Größenordnungen, in denen virale genomische RNAs vom CTV und vom EMARAV in Blättern ihrer Wirtsbäume vorkommen, sind also durchaus vergleichbar. Und auch die Tendenz des CTV, mehr vRNAs im Bast, als in Blättern zu akkumulieren, entspricht den erhaltenen Tendenzen für EMARAV in manchen Monaten. Der Virustiter in Gehölzen ist prinzipiell niedriger als in krautigen Pflanzen (Matthews, 1992).

4.2.5 Quantifizierung viraler RNA in Blattbereichen, die unterschiedliche Symptome zeigen

Die mit EMARAV assoziierten Symptome auf Blättern der Eberesche umfassen chlorotische Ringflecken und Scheckungen. Erstere scheinen zwar häufiger aufzutreten, doch werden immer wieder Blätter beobachtet, deren Fiederblättchen neben Ringflecken auch Scheckungen zeigen. Die hier dargestellten qRT-PCR Ergebnisse zeigen deutlich, dass diese Symptome nicht auf unterschiedliche Viruskonzentrationen zurückzuführen sind. In Blattarealen mit Ringflecken und in solchen mit Scheckungen ist gleich viel virale RNA zu detektieren.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine Mischinfektion mit einem zweiten Virus sein. Eine veränderte Symptomatik bei Mischinfektionen wurde bereits für das *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV, *Potyvirus*, *Potyviridae*) und *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV, *Crinivirus*, *Closteroviridae*) nachgewiesen, die nur gemeinsam Wachstumsverminderung, Blattdeformationen, Chlorosen und Mosaike auf Kartoffeln verursachen (Karyeija *et al.*, 2000). Ebenso verstärkt die gemeinsame Infektion von *Abutilon mosaic virus* (AbMV, *Begomovirus*, *Geminiviridae*) und entweder *Tobacco mosaic virus* oder *Tomato mosaic virus* (beide *Tobamovirus*) die Nekrosen und Stauchungen (Pohl und Wege, 2007). Auch das *Sugarcane mosaic virus* und das *Sorghum mosaic virus* (beide *Potyvirus*, *Potyviridae*) treten in Mischinfektionen mit verstärkten Symptomen in Zuckerrohrpflanzen in China auf (Xu *et al.*, 2008). In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Büttner konnte das *Cherry leaf roll virus* (CLRV, *Nepovirus*, *Comoviridae*) in Ebereschen nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung). Auch wenn in früheren Untersuchungen dieses Virus nicht in symptomtragenden Bäumen detektiert wurde, ist eine Koinfektion mit diesen beiden Viren

nicht auszuschließen (Führling und Büttner, 1998). Des Weiteren fand Kadri (2002) in Tropfpräparaten aus symptomatischen Ebereschblattexttrakten oft fragmentierte stäbchenförmige Viruspartikel, die Ähnlichkeiten mit Furo- und Tobamoviren aufwiesen. Nach heutigem Wissensstand scheint es eher unwahrscheinlich, dass es sich bei diesen Partikeln um EMARAV handelt, weil Partikel der nah verwandten Bunyaviren sphärisch oder pleomorph und membranumhüllt sind. Dass es sich hierbei um Nucleocapside von EMARAV handelt ist ebenfalls auszuschließen, da die Nucleocapside der Tenuiviren, die keine Hülle besitzen, sich als filamentöse, flexible, zirkuläre oder in sich gedrehte Strukturen zeigen (Falk und Tsai, 1998). Des Weiteren wurden bunyavirusähnliche, membranumhüllte Partikel bereits sowohl in Ultradünnschnitten (Ebrahim-Nesbat und Izadpanah, 1992) als auch in jüngsten Virusaufreinigungen beobachtet (Ludenberg, 2008).

Zwar konnte noch keine Mischinfektion von EMARAV mit einem anderen Virus nachgewiesen werden, doch wurde für das verwandte High Plains virus (nicht klassifiziert), welches eine Homologie auf Ebene des Nucleocapsidproteins zu EMARAV aufweist, eine Mischinfektion mit dem *Wheat streak mosaic virus* (*Tritimovirus*, *Potiviridae*) nachgewiesen (Mahmood *et al.*, 1997). Doppelt infizierte Pflanzen zeigten auch hier ein deutlich verstärktes Krankheitsbild (Mahmood *et al.*, 1997). Beiden Viren dient die Milbe *Aceria tosichella* (*Acarina*, *Eriophyidae*) als Vektor (Kozlowski, 2003; Thomas und Hein, 2003). Der Vektor von EMARAV ist noch nicht bekannt. Allerdings wurden sowohl das Nucleocapsidprotein (P3), als auch die viralen RNAs in der Milbe *Phytoptus pyri* nachgewiesen (nicht publiziert). Dieses belegt zunächst, dass *Phytoptus pyri* EMARAV aus infizierten Blättern aufgenommen hat, eine tatsächliche Übertragung muss allerdings noch überprüft werden. Außerdem ist nicht bekannt, ob diese Milbe andere Viren überträgt. Somit liefert bis dato auch der potentielle Überträger keinen Hinweis auf Mischinfektionen.

Da Symptome immer von Wirt und Virus bestimmt werden, könnten physiologische Zustände des Wirtes auch für eine unterschiedliche Symptomausprägung verantwortlich sein. Grundsätzlich ist bekannt, dass diese auch von klimatischen Bedingungen abhängig ist (Drews *et al.*, 2004). Wu *et al.* (2008) und Chellappan *et al.* (2005) konnten einen Einfluss der Temperatur, bei der die Versuchspflanzen *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* und Cassava (*Manihot esculenta*) kultiviert wurden, auf das Gene silencing belegen. Die Kultivierung bei 30°C statt 25°C sorgte für deutlich schwächere Symptome.

Interessanterweise konnte die qRT-PCR an EMARAV-infizierten Bäumen auch zeigen, dass in Blattbereichen ohne Symptome eine deutlich niedrigere Kopienzahl der vgRNA2 im Vergleich zu symptomtragenden Blattarealen vorliegt. Dies unterstützt nachdrücklich die

Hypothese, dass die Ausbildung dieser Symptome tatsächlich mit EMARAV assoziiert ist. Zudem zeigen sie eine heterogene Verbreitung des Virus. Dies überrascht nicht, da eine solche Verbreitung in Gehölzen schon für verschiedenste Viren, wie das *Tomato ringspot virus* (ToRSV, *Nepovirus*, *Comoviridae*) in Äpfelbäumen und für das *Citrus tristeza virus* (CTV, *Closterovirus*, *Closteroviridae*) in Citrusbäumen gezeigt wurde (Bitterlin, 1984; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007).

Letztendlich ist jedoch zu erwähnen, dass es immer noch ungeklärt ist, ob EMARAV die Ringflecken und Scheckungen auf der Eberesche auch tatsächlich bedingt, da die Koch'schen Postulate bislang nicht erfüllt wurden. Doch findet sich immer wieder eine Assoziation des Virus mit den Symptomen und schließlich wurden noch nie virale Nukleinsäuren oder Proteine in symptomlosen Ebereschen nachgewiesen (Mielke und Muehlbach, 2007).

Die verschiedenen erhaltenen Ergebnisse dieser Arbeit haben dazu beigetragen, neue Erkenntnisse über EMARAV und somit gegebenenfalls auch über weitere nicht klassifizierte Verwandte, wie das *Pigeon pea sterility mosaic virus* (PPSMV), das High Plains virus (HPV) und auch ein mit Fig mosaic assoziiertes Virus zu erhalten.

5 Zusammenfassung

Das European mountain ash ringspot-associated virus (EMARAV) ist ein neuartiges, bislang noch nicht klassifiziertes RNA-Virus, das eine gewisse Verwandtschaft zur Familie der *Bunyaviridae*, die sowohl phytopathogene als auch tier- und humanpathogene Vertreter beinhaltet, zeigt. Der einzige derzeit bekannte Wirt von EMARAV ist die in Europa beheimatete Eberesche *Sorbus aucuparia* L.. Diese zeigt assoziiert mit der Virusinfektion, eine chlorotische Scheckung der Blätter sowie charakteristische chlorotische Ringflecken. Das Genom von EMARAV besteht aus vier einzelsträngigen RNAs von negativer (-)Orientierung, die jeweils ein einziges virales Protein kodieren. Die längste RNA, RNA1 (7040 nt), trägt das Gen für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp). Die kleineren RNAs kodieren einen putativen Glykoproteinprecursor (RNA2, 2335 nt), das Nucleocapsid(N)-Protein (RNA3, 1560 nt) sowie ein 27 kDa Protein P4 mit bislang unbekannter Funktion (RNA 4, 1348 nt).

Um Erkenntnisse über den Replikationsverlauf des Virus sowie die Lokalisation in seinem Wirt *S. aucuparia* L. zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Nachweisverfahren, die *in situ*-RT-PCR und die quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR), eingesetzt. Beide hoch sensitiven Techniken wurden bislang noch nicht für Untersuchungen an dieser Baumart, die reich an inhibitorischen Sekundärstoffen ist, eingesetzt und mussten daher zunächst aufwendig etabliert werden. In den *in situ*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass EMARAV bzw. seine genomischen (vg)RNAs anscheinend keinerlei Zellspezifität besitzen, so wurden Amplifikate in den verschiedensten Zelltypen von Blättern und Blattstielen nachgewiesen und unterstützen somit vorangegangene Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung. Zudem konnte eine Lokalisierung der vgRNA in Phloemzellen nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung der verschiedenen vRNAs wurde die qRT-PCR eingesetzt. Da hierbei für viele Fragestellungen ein interner Standard, d. h. ein konstitutiv exprimiertes Gen, eingesetzt wird, wurden für die Eberesche zunächst Genabschnitte verschiedenster potentieller Standardgene (Actin, Tubulin, eine Untereinheit der RNA-Polymerase II, 18S rDNA, Ubiquitin) kloniert und zur Ableitung geeigneter Primerpaare sequenziert. Eine Untersuchung der Expression dieser Gene über den gesamten Jahresverlauf an drei im Freiland stehenden Ebereschen ergab für keines dieser Gene ein vollkommen stabiles Expressionsniveau. Darüber hinaus mussten für fast jedes Gewebe und jeden untersuchten Baum verschiedene Standards gewählt werden.

Die Untersuchung der viralen RNAs ergab, dass die vgRNA-Konzentrationen in Blättern bzw. Knospen ein relativ gleich hohes Niveau während des Jahres zeigten. Lediglich im Frühling und Sommer ist ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Im Bast zeigten sich hingegen stärkere Schwankungen der RNA-Mengen, wobei sich keinerlei jahreszeitliche Tendenz erkennen ließ. So waren sowohl im Winter als auch im Sommer höhere als auch manchmal geringere Mengen an vgRNA nachzuweisen. Ferner war für die Wintermonate, der Ruhephase des Baumes, kein großer Unterschied bezüglich der Konzentrationen im Bast und in den ruhenden Blattknospen zu sehen, demnach scheint das Virus in beiden Gewebe zu überdauern. Auffällig ist jedoch, dass innerhalb der verschiedenen RNAs stets die RNA2 in den höchsten Mengen vorlag. Dies galt nicht nur für die vgRNA2 sondern auch für die glykoprotein-kodierende copy(vc)RNA2, was eine höhere Affinität der RdRp zu diesen RNA-Enden vermuten lässt. Der Vergleich der Konzentrationen von (-)vgRNA zu (+)vcRNA zeigte für alle EMARAV-RNAs einen bis zu 30-fachen Überschuss der genomischen RNA und ähnelt somit anderen (-)RNA-Viren. Die Frage inwieweit die unterschiedlichen Blattsymptome Scheckung und Ringflecken auf verschiedene EMARAV-Konzentrationen zurückzuführen sind, konnte ebenfalls mit Hilfe der qRT-PCR geklärt werden. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, d.h. in Blattbereichen verschiedener Symptomatik wurden stets gleiche Mengen an vRNA detektiert. Hingegen zeigten Blätter ohne Symptome infizierter Ebereschen eine deutlich geringere vRNA-Konzentration, was die Hypothese der Assoziation von EMARAV mit der Symptomausprägung unterstützt.

6 Abkürzungsverzeichnis

6.1 Allgemeine Abkürzungen

µm	Mikrometer
µM	Mikromol
Abs.	Absorption
B1	EMARAV-infizierter Versuchsbaum im Botanischen Garten
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaar
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C _t	threshold Cyle (Zyklus an dem der Schwellenwert überschritten wird)
Dapi	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAS-ELISA	double antibody sandwich-ELISA
DEPC	Diethylpyrocarbonsäure
Dig	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immuno-sorbent assay
EM	Elektronenmikroskop(ie)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
f.c.	final concentration (Endkonzentration)
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FP	Forward Primer
ggf.	gegebenenfalls
GPS	Global positioning system
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPV	<i>Human papillomavirus</i>
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierungen
K1	EMARAV-infizierter Versuchsbaum im Forst Klövensteen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
min	Minute
mM	Millimol
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
NBT	Nitroblautetrazolium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
N-Protein	Nucleocapsidprotein, Hüllprotein
NSs	Nicht-Strukturprotein
nt	Nukleotid
ORF	Open Reading Frame, offener Leserahmen

ori	origin of replication
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PTGS	Posttranskriptionelles Gene-Silencing
PVP	Polyvinylpyrrolidon
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
RdRp	RNA-abhängige (depending)-RNA Polymerase (polymerase)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Reverse Primer
RPB7	Untereinheit 7 der RNA-Polymerase II
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-	Reverse Transkriptase-
S	Svedberg
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SF	symptomfreier Versuchsbaum
spec.	Spezies
ssp.	Subspezies
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
T _m	Schmelz (melting)-Temperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	(Unit) Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehung pro Minute
v.a.	vor allem
v/v	Volumen/Volumen
vcRNA	virale copy Ribonukleinsäure
vgRNA	virale genomische Ribonukleinsäure
Vol.	Volumen
vRNA	virale Ribonukleinsäure
w/v	Gewicht (weight)/Volumen
z.B.	zum Beispiel

6.2 Abkürzungen für Viren, Viroide und Bakterien

AbMV	<i>Abutilon mosaic virus</i>
BUNV	<i>Bunyamwera virus</i>
CLRV	<i>Cherry leaf roll virus</i>
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMARAV	European mountain ash ringspot-associated virus
FLUAV	<i>Influenzavirus A</i>
HPV	High Plains virus
LACV	<i>La Crosse virus</i>
MMuLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
PPSMV	<i>Pigeon pea sterility mosaic virus</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>
PSTVd	<i>Potato spindle tuber viroid</i>
RSV	<i>Rice stripe virus</i>
RVFV	<i>Rift Valley fever virus</i>
SPCSV	<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i>
SPFMV	<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>
SPMSV	<i>Sweet potato mild speckling virus</i>
SYNV	<i>Sonchus yellow net virus</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
ToRSV	<i>Tomato ringspot virus</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
UUKV	<i>Uukuniemi virus</i>

7 Literatur

- Ahn, K. K., Kim, K. S., Gergerich, R. C. und Jensen, S. G. (1998). "High plains disease of corn and wheat: ultrastructural and serological aspects." J Submicrosc Cytol Pathol 30(4): 563-571.
- Barr, J. N., Elliott, R. M., Dunn, E. F. und Wertz, G. W. (2003). "Segment-specific terminal sequences of Bunyamwera bunyavirus regulate genome replication." Virology 311(2): 326-38.
- Barr, J. N. und Wertz, G. W. (2004). "Bunyamwera bunyavirus RNA synthesis requires cooperation of 3'- and 5'-terminal sequences." J Virol 78(3): 1129-38.
- Benthack, W. (2001). "Klonierung und partielle Charakterisierung des unbekannten Erregers der Ringfleckigkeit der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) anhand doppelsträngiger RNA." Dissertation, Universität Hamburg, 153 Seiten
- Benthack, W., Mielke, N., Buttner, C. und Muhlbach, H. P. (2005). "Double-stranded RNA pattern and partial sequence data indicate plant virus infection associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.)." Arch Virol 150(1): 37-52.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res 7(6): 1513-23.
- Bitterlin, M. W. (1984). "Irregular Distribution of Tomato Ringspot Virus in Apple Trees." Plant disease 68: 567-571.
- Bolten, R., Egger, D., Gosert, R., Schaub, G., Landmann, L. und Bienz, K. (1998). "Intracellular localization of poliovirus plus- and minus-strand RNA visualized by strand-specific fluorescent In situ hybridization." J Virol 72(11): 8578-85.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. und van der Noordaa, J. (1990). "Rapid and simple method for purification of nucleic acids." J Clin Microbiol 28(3): 495-503.
- Boonham, N., Perez, L. G., Mendez, M. S., Peralta, E. L., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I. und Mumford, R. A. (2004). "Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of potato spindle tuber viroid." J Virol Methods 116(2): 139-46.
- Brunner, A. M., Yakovlev, I. A. und Strauss, S. H. (2004). "Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies." BMC Plant Biol 4: 14.
- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol 25(2): 169-93.
- Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." J Mol Endocrinol 29(1): 23-39.

- Bustin, S. A., Gyselman, V. G., Williams, N. S. und Dorudi, S. (1999).** "Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients." Br J Cancer 79(11-12): 1813-20.
- Carette, J. E., Guhl, K., Wellink, J. und Van Kammen, A. (2002).** "Coalescence of the sites of cowpea mosaic virus RNA replication into a cytopathic structure." J Virol 76(12): 6235-43.
- Chare, E. R., Gould, E. A. und Holmes, E. C. (2003).** "Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses." J Gen Virol 84(Pt 10): 2691-703.
- Chellappan, P., Vanitharani, R., Ogbe, F. und Fauquet, C. M. (2005).** "Effect of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants." Plant Physiol 138(4): 1828-41.
- Chen, D., Barros, M., Spencer, E. und Patton, J. T. (2001).** "Features of the 3'-consensus sequence of rotavirus mRNAs critical to minus strand synthesis." Virology 282(2): 221-9.
- Chiang, C., Chen, G. W. und Shih, S. R. (2008).** "Mutations at Alternative 5' Splice Sites of M1 mRNA Negatively Affect Influenza A Viral Viability and Growth Rate." J Virol, accepted, PMID: 18768984.
- Cillo, F., Roberts, I. M. und Palukaitis, P. (2002).** "In situ localization and tissue distribution of the replication-associated proteins of Cucumber mosaic virus in tobacco and cucumber." J Virol 76(21): 10654-64.
- Cockbain, A. J. und Gibbs, A. J. (1973).** "Host range and overwintering sources of bean leaf roll and pea enation mosaic viruses in England." Ann Appl Biol 73(1): 177-87.
- Cooper, J. I. (1979).** "Virus diseases of trees and shrubs." 74 Seiten, Springer, Cambridge.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K. und Scheible, W. R. (2005).** "Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis." Plant Physiol 139(1): 5-17.
- Delord, B., Poveda, J. D., Astier-Gin, T., Gerbaud, S., Wattiaux, J. P. und Fleury, H. J. (1990).** "Quantitative in situ hybridization using strand specific RNA probes: expression of the bunyavirus Germiston S segment in mosquito cells." Mol Cell Probes 4(4): 247-59.
- Dillon, G. P., Illes, J. C., Isaacs, H. V. und Wilson, R. A. (2007).** "Patterns of gene expression in schistosomes: localization by whole mount in situ hybridization." Parasitology 134(Pt 11): 1589-97.
- Ding, X. S., Flasiński, S. und Nelson, R. S. (1999).** "Infection of barley by brome mosaic virus is restricted predominantly to cells in and associated with veins through a temperature-dependent mechanism." Mol Plant-Microbe Interact 12: 615-623.
- Drews, G., Adam, G. und Heinze, C. (2004).** "Molekulare Pflanzenvirologie." 261 Seiten, Springer, Berlin.

- Ebrahim-Nesbat, F. und Izadpanah, K. (1992).** "Viruslike particles associated with ringfleck mosaic of mountain ash and a mosaic disease of raspberry in the Bavarian Forest." Eur J For Pathol 22: 1-20.
- Elliott, R. M. (1997).** "Emerging viruses: the Bunyaviridae." Mol Med 3(9): 572-7.
- Enami, M., Sharma, G., Benham, C. und Palese, P. (1991).** "An influenza virus containing nine different RNA segments." Virology 185(1): 291-8.
- Erkens, T., Van Poucke, M., Vandesompele, J., Goossens, K., Van Zeveren, A. und Peelman, L. J. (2006).** "Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with PPARGC1A." BMC Biotechnol 6: 41.
- Espinoza, A. M., Hernandez, M., Pereira, R., Falk, B. und Medina, V. (1992).** "In situ immunogold labeling analysis of the rice hoja blanca virus nucleoprotein and major noncapsid protein." Virology 191(2): 619-27.
- Fanigliulo, A., Pacella, R., Comes, S. und Crescenzi, A. (2007).** "Three years survey of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus reservoir weed hosts in southern Italy." Commun Agric Appl Biol Sci 72(4): 1023-8.
- Feng, J. L., Chen, S. N., Tang, X. S., Ding, X. F., Du, Z. Y. und Chen, J. S. (2006).** "Quantitative determination of cucumber mosaic virus genome RNAs in virions by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 38(10): 669-76.
- Flick, R., Elgh, F. und Pettersson, R. F. (2002).** "Mutational analysis of the Uukuniemi virus (Bunyaviridae family) promoter reveals two elements of functional importance." J Virol 76(21): 10849-60.
- Führling, M. und Büttner, C. (1995).** "Transmission experiments of viruses to woody seedlings (*Quercus robur* L. and *Sorbus aucuparia* L.) by grafting and mechanical inoculation." Eur J For Pathol 25: 129-135.
- Führling, M. und Büttner, C. (1998).** "Studien zum Auftreten der Ringfleckigkeit und Scheckungen der Blätter von Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.)." Forstw Cbl 117: 327-338.
- Fuhrman, J. A., Liang, X. und Noble, R. T. (2005).** "Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR." Appl Environ Microbiol 71(8): 4523-30.
- Garaigorta, U. und Ortin, J. (2007).** "Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA." Nucleic Acids Res 35(14): 4573-82.
- Garcia, S., Crance, J. M., Billecocq, A., Peinnequin, A., Jouan, A., Bouloy, M. und Garin, D. (2001).** "Quantitative real-time PCR detection of Rift Valley fever virus and its application to evaluation of antiviral compounds." J Clin Microbiol 39(12): 4456-61.

- Goddard, L. B., Roth, A. E., Reisen, W. K. und Scott, T. W. (2003).** "Vertical transmission of West Nile Virus by three California *Culex* (Diptera: Culicidae) species." J Med Entomol 40(6): 743-6.
- Gog, J. R., Afonso Edos, S., Dalton, R. M., Leclercq, I., Tiley, L., Elton, D., von Kirchbach, J. C., Naffakh, N., Escriou, N. und Digard, P. (2007).** "Codon conservation in the influenza A virus genome defines RNA packaging signals." Nucleic Acids Res 35(6): 1897-907.
- Goldman, N., Presser, I. und Sreevalsan, T. (1977).** "California encephalitis virus: some biological and biochemical properties." Virology 76(1): 352-64.
- Goncalves, S., Cairney, J., Maroco, J., Oliveira, M. M. und Miguel, C. (2005).** "Evaluation of control transcripts in real-time RT-PCR expression analysis during maritime pine embryogenesis." Planta 222(3): 556-63.
- Gonzalez-Verdejo, C. I., Die, J. V., Nadal, S., Jimenez-Marin, A., Moreno, M. T. und Roman, B. (2008).** "Selection of housekeeping genes for normalization by real-time RT-PCR: analysis of Or-MYB1 gene expression in *Orobancha ramosa* development." Anal Biochem 379(2): 176-81.
- Gosalvez-Bernal, B., Genoves, A., Navarro, J. A., Pallas, V. und Sanchez-Pina, M. A. (2008).** "Distribution and pathway for phloem-dependent movement of Melon necrotic spot virus in melon plants." Mol Plant Pathol 9(4): 447-61.
- Grafstrom, R. C., Fornace, A., Jr. und Harris, C. C. (1984).** "Repair of DNA damage caused by formaldehyde in human cells." Cancer Res 44(10): 4323-7.
- Groves, R. L., Walgenbach, J. F., Moyer, J. W. und Kennedy, G. G. (2001).** "Overwintering of *Frankliniella fusca* (Thysanoptera: Thripidae) on Winter Annual Weeds Infected with Tomato spotted wilt virus and Patterns of Virus Movement Between Susceptible Weed Hosts." Epidemiology 91(9): 891-899.
- Grunewald, W., Karimi, M., Wiczorek, K., Cappelle, E. V., Wischnitzki, E., Grundler, F., Inze, D., Beeckman, T. und Gheysen, G. (2008).** "A role for AtWRKY23 in feeding site establishment of plant-parasitic nematode." Plant Physiol 148: 358-368.
- Hacker, D., Rochat, S. und Kolakofsky, D. (1990).** "Anti-mRNAs in La Crosse bunyavirus-infected cells." J Virol 64(10): 5051-7.
- Han, Y., Wang, X., Dang, Y. und Zheng, Y. H. (2008).** "APOBEC3G and APOBEC3F require an endogenous cofactor to block HIV-1 replication." PLoS Pathog 4(7): e1000095.
- Hay, A. J., Skehel, J. J. und McCauley, J. (1980).** "Structure and synthesis of influenza virus complementary RNAs." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 288(1029): 341-8.
- Heathcote, G. D. (1967).** "The Overwintering of Aphids and Viruses on Sugar Beet Seed Crops in England, 1963-1966." Plant Pathology 16(3): 126-130.
- Herz, C., Stavnezer, E., Krug, R. und Gurney, T., Jr. (1981).** "Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells." Cell 26(3 Pt 1): 391-400.

- Hofmann, J., Wieczorek, K., Blochl, A. und Grundler, F. M. (2007).** "Sucrose supply to nematode-induced syncytia depends on the apoplasmic and symplasmic pathways." J Exp Bot 58(7): 1591-601.
- Hutchinson, K. L., Peters, C. J. und Nichol, S. T. (1996).** "Sin Nombre virus mRNA synthesis." Virology 224(1): 139-49.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990).** "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene 96(1): 23-8.
- Jackson, A. O. (1987).** "The rhabdoviruses. Biology, structure, and replication of plant rhabdoviruses." 427-508, Plenum Press, New York.
- Jacquot, G., Le Rouzic, E., David, A., Mazzolini, J., Bouchet, J., Bouaziz, S., Niedergang, F., Pancino, G. und Benichou, S. (2007).** "Localization of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope: impact on Vpr functions and virus replication in macrophages." Retrovirology 4: 84.
- Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A. K. und Khurana, J. P. (2006).** "Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR." Biochem Biophys Res Commun 345(2): 646-51.
- Jin, M., Li, C., Shi, Y., Ryabov, E., Huang, J., Wu, Z., Fan, Z. und Hong, Y. (2008).** "A single amino acid change in a geminiviral Rep protein differentiates between triggering a plant defence response and initiating viral DNA replication." J Gen Virol 89(Pt 10): 2636-41.
- Johansen, B. (1997).** "In situ PCR on plant material with sub-cellular resolution." Ann. Bot. 80: 697-670.
- Johansen, W. und Wilson, R. C. (2008).** "Viral suppressor proteins show varying abilities and effectiveness to suppress transgene-induced post-transcriptional gene silencing of endogenous Chalcone synthase in transgenic Arabidopsis." Plant Cell Rep 27(5): 911-21.
- Kadri, A. (2002).** "Untersuchungen zur experimentellen Übertragung, Partikelisolierung und weiterer Charakterisierung des Erregers der Ringfleckigkeit der Eberesche (Sorbus aucuparia L.)." Diplomarbeit, Universität Hamburg, 99 Seiten
- Karyeija, R. F., Kreuze, J. F., Gibson, R. W. und Valkonen, J. P. (2000).** "Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants." Virology 269(1): 26-36.
- Kashiwagi, T., Hara, K., Kohara, M., Iwahashi, J., Hamada, N., Honda-Yoshino, H. und Toyoda, T. (2002).** "Promoter/origin structure of the complementary strand of hepatitis C virus genome." J Biol Chem 277(32): 28700-5.
- Kazinczi, G., Horvath, J., Takacs, A. P., Gaborjanyi, R. und Beres, I. (2004).** "Experimental and natural weed host-virus relations." Commun Agric Appl Biol Sci 69(3): 53-60.
- Kegler, H. (1960).** "Das Ringfleckmosaik der Eberesche (Sorbus aucuparia L.)." Phytopathologische Zeitschrift 37: 214-216.

- Kempf, B. J., Blair, C. D. und Beaty, B. J. (2006).** "Quantitative analysis of La Crosse virus transcription and replication in cell cultures and mosquitoes." Am J Trop Med Hyg 74(2): 224-32.
- Kim, B. R., Nam, H. Y., Kim, S. U., Kim, S. I. und Chang, Y. J. (2003).** "Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice." Biotechnol Lett 25(21): 1869-72.
- Klode, M. (2007).** "Funktionsanalyse zweier Proteine des neuartigen European mountain ash ringspot-associated virus (EMARAV)." Diplomarbeit, Universität Hamburg, 143 Seiten
- Koltai, H. und Bird, D. M. (2000).** "High throughput cellular localization of specific plant mRNAs by liquid-phase in situ reverse transcription-polymerase chain reaction of tissue sections." Plant Physiol 123(4): 1203-12.
- Komminoth, P., Long, A. A., Ray, R. und Wolfe, H. J. (1992).** "In situ polymerase chain reaction detection of viral DNA, single-copy genes, and gene rearrangements in cell suspensions and cytopins." Diagn Mol Pathol 1(2): 85-97.
- Kormelink, R., de Haan, P., Peters, D. und Goldbach, R. (1992).** "Viral RNA synthesis in tomato spotted wilt virus-infected *Nicotiana rustica* plants." J Gen Virol 73 (Pt 3): 687-93.
- Kozłowski, J. (2003).** "The occurrence of *Aceria tosichella* Keifer (Acari, Eriophyidae) as a vector of wheat streak mosaic virus in Poland." J Appl Entomology 124(5-6): 209-211.
- Kulkarni, N. K., Lava Kumar, P., Muniyappa, V., Teifion Jones, A. und R., R. D. V. (2002).** "Transmission of Pigeon pea sterility mosaic virus by the eriophyid mite, *Aceria cajani* (Acari: Arthropoda)." Plant disease 86(12): 1297-1302.
- Lava Kumar, P., Teifion Jones, A. und Reddy, D. V. R. (2002).** "A Novel Mite-Transmitted Virus with a Divided RNA Genome Closely Associated with Pigeonpea Sterility Mosaic Disease." Virology 93(1): 71-81.
- Levy, M., Edelbaum, O. und Sela, I. (2004).** "Tobacco mosaic virus regulates the expression of its own resistance gene N." Plant Physiol 135(4): 2392-7.
- Long, A. A., Komminoth, P., Lee, E. und Wolfe, H. J. (1993).** "Comparison of indirect and direct in-situ polymerase chain reaction in cell preparations and tissue sections. Detection of viral DNA, gene rearrangements and chromosomal translocations." Histochemistry 99(2): 151-62.
- Louie, R., Seifers, D. L. und Bradfute, O. E. (2006).** "Isolation, transmission and purification of the High Plains virus " J Virol Methods 135(2): 214-222.
- Ludenberg, I. (2008).** "Molekulare und zellbiologische Untersuchungen zum Glykoprotein p2 und der Morphologie des European mountain ash ringspot-associated virus (EMARAV)." Diplomarbeit, Universität Hamburg, 128 Seiten

- Lymperopoulos, K., Noad, R., Tosi, S., Nethisinghe, S., Brierley, I. und Roy, P. (2006).** "Specific binding of Bluetongue virus NS2 to different viral plus-strand RNAs." Virology 353(1): 17-26.
- Mahmood, T., Hein, G. L. und Jensen, S. G. (1997).** "Mixed Infection of Hard Red Winter Wheat with High Plains Virus and Wheat Streak Mosaic Virus from Wheat Curl Mites in Nebraska." Plant disease 82: 311-315.
- Matthews, R. E. F. (1992).** "Fundamentals of plant virology." 403 Seiten, San Diego, Californien.
- Mielke, N. (1999).** "Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren aus Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) mit virusähnlichen Krankheitssymptomen." Diplomarbeit, Universität Hamburg, 82 Seiten
- Mielke, N. (2004).** "Molekulare Charakterisierung eines mit der Ringfleckigkeit der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) assoziierten neuen Pflanzenvirus." Universität Hamburg, 112 Seiten
- Mielke, N. und Muehlbach, H. P. (2007).** "A novel, multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.)." J Gen Virol 88(Pt 4): 1337-46.
- Mielke, N., Weber, M., Kahn, S. und Muehlbach, H. P. (2008).** "Detection of European mountain ash ringspot-associated virus (EMARAV) in *Sorbus aucuparia* L. by a specific antiserum and reverse transkription-PCR." Forest Path, in press.
- Mills, J. N. (2005).** "Regulation of rodent-borne viruses in the natural host: implications for human disease." Arch Virol Suppl (19): 45-57.
- Modrow, S., Dietrich, F. und Truyen, U. (2003).** "Molekulare Virology." Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.
- Moniz de Sa, M. und Drouin, G. (1996).** "Phylogeny and substitution rates of angiosperm actin genes." Mol Biol Evol 13(9): 1198-212.
- Mouillesseaux, K. P., Klimpel, K. R. und Dhar, A. K. (2003).** "Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicon size in SYBR Green real-time RT-PCR." J Virol Methods 111(2): 121-7.
- Muehlbach, H. P., Weber, U., Gomez, G., Pallas, V., Duran-Vila, N. und Hadidi, A. (2003).** "Molecular Hybridization. In: A. Hadidi, R. Flores, J.W. Radles, J.S. Semancik (eds) Viroids." pp. 103-114, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Munoz, M., Bolanos, I., Arrieta-Espinoza, G. und Espinoza, A. M. (2004).** "Expression of the rice hoja blanca virus (RHBV) non-structural protein 3 (NS3) in *Escherichia coli* and its in situ localization in RHBV-infected rice tissues." Rev Biol Trop 52(3): 765-75.
- Newbury, H. J. und Possingham, J. V. (1977).** "Factors Affecting the Extraction of Intact Ribonucleic Acid from Plant Tissues Containing Interfering Phenolic Compounds." Plant Physiol 60(4): 543-547.

- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L. und Evers, D. (2005). "Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress." J Exp Bot 56(421): 2907-14.
- Nolan, T., Hands, R. E. und Bustin, S. A. (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." Nat Protoc 1(3): 1559-82.
- Nuovo, G. J., Gallery, F. und MacConnell, P. (1992). "Detection of amplified HPV 6 and 11 DNA in vulvar lesions by hot start PCR in situ hybridization." Mod Pathol 5(4): 444-8.
- Nygaard, A. B., Jorgensen, C. B., Cirera, S. und Fredholm, M. (2007). "Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR." BMC Mol Biol 8: 67.
- Oakley, R. V., Wang, Y. S., Ramakrishna, W., Harding, S. A. und Tsai, C. J. (2007). "Differential expansion and expression of alpha- and beta-tubulin gene families in Populus." Plant Physiol 145(3): 961-73.
- Olbrich, M., Gerstner, E., Welzl, G., Fleischmann, F., Osswald, W., Bahnweg, G. und Ernst, D. (2008). "Quantification of mRNAs and housekeeping gene selection for quantitative real-time RT-PCR normalization in European beech (*Fagus sylvatica* L.) during abiotic and biotic stress." Z Naturforsch [C] 63(7-8): 574-82.
- Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M. und Cambra, M. (2005). "Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids." J Virol Methods 128(1-2): 151-5.
- Orlando, C., Pinzani, P. und Pazzagli, M. (1998). "Developments in quantitative PCR." Clin Chem Lab Med 36(5): 255-69.
- Overby, A. K., Pettersson, R. F., Grunewald, K. und Huiskonen, J. T. (2008). "Insights into bunyavirus architecture from electron cryotomography of Uukuniemi virus." Proc Natl Acad Sci U S A 105(7): 2375-9.
- Papin, J. F., Vahrson, W. und Dittmer, D. P. (2004). "SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile Virus circumvents false-negative results due to strain variability." J Clin Microbiol 42(4): 1511-8.
- Park, C. J., Bae, S. H., Lee, M. K., Varani, G. und Choi, B. S. (2003). "Solution structure of the influenza A virus cRNA promoter: implications for differential recognition of viral promoter structures by RNA-dependent RNA polymerase." Nucleic Acids Res 31(11): 2824-32.
- Patterson, J. L. und Kolakofsky, D. (1984). "Characterization of La Crosse virus small-genome transcripts." J Virol 49(3): 680-5.
- Peleg, G., Malter, D. und Wolf, S. (2007). "Viral infection enables phloem loading of GFP and long-distance trafficking of the protein." Plant J 51(2): 165-72.
- Peters, G. (1964). "Die spektrochemische Bestimmung von Phenylcumarangruppen im Lignin." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 203(4): 303-304.

- Peters, I. R., Helps, C. R., Hall, E. J. und Day, M. J. (2004).** "Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design." J Immunol Methods 286(1-2): 203-17.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. und Dempfle, L. (2002).** "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res 30(9): e36.
- Plotch, S. J., Bouloy, M. und Krug, R. M. (1979).** "Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 76(4): 1618-22.
- Pohl, D. und Wege, C. (2007).** "Synergistic pathogenicity of a phloem-limited begomovirus and tobamoviruses, despite negative interference." J Gen Virol 88(Pt 3): 1034-40.
- Polak, Z., Prochazkova, Z. und Braniaova, H. (1990).** "Recent findings of viruses in forest trees on territory of the Czech Republic." Arch. Phytopath. 26: 389-393.
- Polak, Z. und Zieglerova, J. (1996).** "Towards ringspots and variegation in mountain ash leaves." Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz 103: 432-435.
- Prasetya, B. und Roffael, E. (1991).** "Neuartige Charakterisierung von natürlichen Polyphenolen hinsichtlich ihrer Vernetzbarkeit." Holz als Roh- und Werkstoff 49(12): 481-484.
- Pritlove, D. C., Fodor, E., Seong, B. L. und Brownlee, G. G. (1995).** "In vitro transcription and polymerase binding studies of the termini of influenza A virus cRNA: evidence for a cRNA panhandle." J Gen Virol 76 (Pt 9): 2205-13.
- Proeseler, G. (1969).** "Transmission of the fig mosaic virus by the eriophyid mite *Aceria ficus* Cotte." Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg 123(3): 288-92.
- Puchtler, H. und Meloan, S. N. (1985).** "On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions." Histochemistry 82(3): 201-4.
- Remans, T., Smeets, K., Opdenakker, K., Mathijssen, D., Vangronsveld, J. und Cuypers, A. (2008).** "Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations." Planta 227(6): 1343-9.
- Rezaian, M. A. und Krake, L. R. (1987).** "Nucleic acid extraction and virus detection in grapevine." J Virol Methods 17(3-4): 277-85.
- Ringel, A. (2003).** "Entwicklung eines Verfahrens zur Isolierung von Nukleinsäuren des viralen Erregers der Ringfleckigkeit der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.)." Diplomarbeit, Universität Hamburg, 91 Seiten
- Rist, D. L. und Lorbeer, J. W. (1988).** "Occurrence and Overwintering of Cucumber Mosaic Virus and Broad Bean Wilt Virus in Weeds Growing Near Commercial Lettuce Fields in New York." Ecology and Epidemiology 79(1): 65-69.
- Roche, O. (2002).** "DIG Application Manual for Nonradioactive in situ Hybridization." 242 Seiten,

- Rouet, F. und Rouzioux, C. (2007).** "The measurement of HIV-1 viral load in resource-limited settings: how and where?" Clin Lab 53(3-4): 135-48.
- Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J. und Ambros, S. (2007).** "A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of Citrus tristeza virus in different plant tissues." J Virol Methods 145(2): 96-105.
- Sallstrom, J. F., Zehbe, I., Alemi, M. und Wilander, E. (1993).** "Pitfalls of in situ polymerase chain reaction (PCR) using direct incorporation of labelled nucleotides." Anticancer Res 13(4): 1153.
- Sambrook, J. und Russel, D. W. (2001).** "Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3rd edn." Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Saponari, M., Manjunath, K. und Yokomi, R. K. (2008).** "Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan)." J Virol Methods 147(1): 43-53.
- Saunders, G. und Parkes, H. (1999).** "Analytical Molecular Biology." 200, Royal Society of Chemistry, London.
- Schlatermund, N. (2004).** "Molekularbiologische und mikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation des viralen Erregers der Ringfleckigkeit der Eberesche (Sorbus aucuparia L.)." Diplomarbeit, Universität Hamburg, 107 Seiten
- Schmelzer, K. (1977).** "Zier-, Forst- und Wildgehölze in: Pflanzliche Virologie ", 176-405, Akademie Verlag Berlin.
- Schneider, U. (2005).** "Novel insights into the regulation of the viral polymerase complex of neurotropic Borna disease virus." Virus Res 111(2): 148-60.
- Scholthof, H. B. (2005).** "Plant virus transport: motions of functional equivalence." Trends Plant Sci 10(8): 376-82.
- Schroder, J., Stenger, H. und Wernicke, W. (2001).** "Alpha-tubulin genes are differentially expressed during leaf cell development in barley (Hordeum vulgare L.)." Plant Mol Biol 45(6): 723-30.
- Sharifi, M., Massumi, H., Heydarnejad, J., Hosseini Pour, A., Shaabani, M. und Rahimian, H. (2008).** "Analysis of the biological and molecular variability of Watermelon mosaic virus isolates from Iran." Virus Genes 37(3): 304-313.
- Shi, X., Kohl, A., Li, P. und Elliott, R. M. (2007).** "Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis." J Virol 81(18): 10151-60.
- Silva, C., Tereso, S., Nolasco, G. und Oliveira, M. M. (2003).** "Cellular Location of Prune dwarf virus in Almond Sections by In Situ Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction." Phytopathology 93(3): 278-285.
- Singh, R. P., Nie, X., Singh, M., Coffin, R. und Duplessis, P. (2002).** "Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR." J Virol Methods 99(1-2): 123-31.

- Sinisterra, X. H., McKenzie, C. L., Hunter, W. B., Powell, C. A. und Shatters, R. G., Jr. (2005).** "Differential transcriptional activity of plant-pathogenic begomoviruses in their whitefly vector (*Bemisia tabaci*, Gennadius: Hemiptera Aleyrodidae)." J Gen Virol 86(Pt 5): 1525-32.
- Skaf, J. S., Schultz, M. H., Hirata, H. und de Zoeten, G. A. (2000).** "Mutational evidence that the VPg is involved in the replication and not the movement of Pea enation mosaic virus-1." J Gen Virol 81(Pt 4): 1103-9.
- Skare, J. M., Wijkamp, I., Denham, I., Rezende, J. A. M., Kitajima, E. W., Park, J. W., Desvoyes, B., Rush, C. M., Michels, G., Scholthof, K. B. G. und Scholthof, H. B. (2006).** "A new eriophyid mite-borne membrane-enveloped virus-like complex isolated from plants." Virology 347(2): 343-353.
- Snippe, M., Borst, J. W., Goldbach, R. und Kormelink, R. (2005).** "The use of fluorescence microscopy to visualise homotypic interactions of tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein in living cells." J Virol Methods 125(1): 15-22.
- Snippe, M., Smeenk, L., Goldbach, R. und Kormelink, R. (2007).** "The cytoplasmic domain of tomato spotted wilt virus Gn glycoprotein is required for Golgi localisation and interaction with Gc." Virology 363(2): 272-9.
- Stocker, M., Garcia-Mas, J., Arus, P., Messegue, R. und Puigdomenech, P. (1993).** "A highly conserved alpha-tubulin sequence from *Prunus amygdalus*." Plant Mol Biol 22(5): 913-6.
- Storms, M. M., Kormelink, R., Peters, D., Van Lent, J. W. und Goldbach, R. W. (1995).** "The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells." Virology 214(2): 485-93.
- Sturzenbaum, S. R. und Kille, P. (2001).** "Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 130(3): 281-9.
- Tabachnick, W. J. (1992).** "Microgeographic and temporal genetic variation in populations of the bluetongue virus vector *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae)." J Med Entomol 29(3): 384-94.
- Taliansky, M., Torrance, L. und Kalinina, N. O. (2008).** "Role of plant virus movement proteins." Methods Mol Biol 451: 33-54.
- Teo, I. A. und Shaunak, S. (1995).** "Polymerase chain reaction in situ: an appraisal of an emerging technique." Histochem J 27(9): 647-59.
- Thangavelu, M., Belostotsky, D., Bevan, M. W., Flavell, R. B., Rogers, H. J. und Lonsdale, D. M. (1993).** "Partial characterization of the *Nicotiana tabacum* actin gene family: evidence for pollen-specific expression of one of the gene family members." Mol Gen Genet 240(2): 290-5.
- Thiemann, M. A. (2008).** "Analyse zur möglichen PTGS-Suppressoraktivität des Proteins p4 des European mountain ash ringspot-associated virus (EMARAV)." Diplomarbeit, Universität Hamburg, 124 Seiten

- Thoma, J. (2007).** "Untersuchungen zur Übertragbarkeit des European mountain ash ringspot-associated virus (EMARAV) durch Gallmilben." Staatsexamensarbeit, Universität Hamburg, 79 Seiten
- Thomas, J. A. und Hein, G. L. (2003).** "Influence of volunteer wheat plant condition on movement of the wheat curl mite, *Aceria tosichella*, in winter wheat." Exp Appl Acarol 31(3-4): 253-68.
- Vaheri, A., Vapalahti, O. und Plyusnin, A. (2008).** "How to diagnose hantavirus infections and detect them in rodents and insectivores." Rev Med Virol 18(4): 277-88.
- van Bel, A. J., Ehlers, K. und Knoblauch, M. (2002).** "Sieve elements caught in the act." Trends Plant Sci 7(3): 126-32.
- van Raemdonck, D., Pesquet, E., Cloquet, S., Beeckman, H., Boerjan, W., Goffner, D., El Jaziri, M. und Baucher, M. (2005).** "Molecular changes associated with the setting up of secondary growth in aspen." J Exp Bot 56(418): 2211-27.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. und Speleman, F. (2002).** "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol 3(7): RESEARCH0034.
- Varga, A. und James, D. (2005).** "Detection and differentiation of Plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing." J Virol Methods 123(2): 213-20.
- Varga, A. und James, D. (2006).** "Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of Plum pox virus strains C, EA, and W: effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation." J Virol Methods 132(1-2): 146-53.
- Volkov, R. A., Panchuk, II und Schoffl, F. (2003).** "Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR." J Exp Bot 54(391): 2343-9.
- Wagner, J. D., Choi, T. J. und Jackson, A. O. (1996).** "Extraction of nuclei from sonchus yellow net rhabdovirus-infected plants yields a polymerase that synthesizes viral mRNAs and polyadenylated plus-strand leader RNA." J Virol 70(1): 468-77.
- Wang, H. L., Gilbertson, R. L. und Lucas, W. J. (1996).** "Spatial and temporal distribution of bean dwarf mosaic geminivirus in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana*." Phytopathology 86: 1204-1214.
- Wang, R. Y. und Nagy, P. D. (2008).** "Tomato bushy stunt virus co-opts the RNA-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis." Cell Host Microbe 3(3): 178-87.
- White, D. M., Wilson, W. C., Blair, C. D. und Beaty, B. J. (2005).** "Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects." J Gen Virol 86(2): 453-62.

- Wieczorek, K., Golecki, B., Gerdes, L., Heinen, P., Szakasits, D., Durachko, D. M., Cosgrove, D. J., Kreil, D. P., Puzio, P. S., Bohlmann, H. und Grundler, F. M. (2006).** "Expansins are involved in the formation of nematode-induced syncytia in roots of *Arabidopsis thaliana*." Plant J 48(1): 98-112.
- Wu, X. L., Hou, W. C., Wang, M. M., Zhu, X. P., Li, F., Zhang, J. D., Li, X. Z. und Guo, X. Q. (2008).** "RNA silencing-mediated resistance is related to biotic / abiotic stresses and cellular RdRp expression in transgenic tobacco plants." BMB Rep 41(5): 376-81.
- Xu, D. L., Park, J. W., Mirkov, T. E. und Zhou, G. H. (2008).** "Viruses causing mosaic disease in sugarcane and their genetic diversity in southern China." Arch Virol 153(6): 1031-9.
- Xu, M. und Miller, M. S. (2004).** "Determination of murine fetal Cyp1a1 and 1b1 expression by real-time fluorescence reverse transcription-polymerase chain reaction." Toxicol Appl Pharmacol 201(3): 295-302.
- Zhang, X., Wang, X. und Zhou, G. (2008).** "A one-step real time RT-PCR assay for quantifying rice stripe virus in rice and in the small brown planthopper (*Laodelphax striatellus* Fallén)." J Virol Methods 151(2): 181-7.

8 Anhang

8.1 Nukleinsäuresequenzen potentieller Standards der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.)

Abschnitt der mRNA-spezifischen Sequenz der RPB7, einer Untereinheit der RNA-Polymerase II:

CATAGTGCTGGAGCGGAATATGCAGCTCCATCCTCGCCACTTTGGCCGCAATCTC
CGTGAAAATCTCGTTTCCAAGCTCATGAAAGATGTCGAGGGCACTTGCAGTGGCC
AACATGGATTTGTGGTTGCAATTACGGGCATAGAAAACATTGGGAAAGGGATGA
TTCGTGACGGGACAGGCTTCGTCTCATTCCCCATGAAGTACCAGTGTGTTGTTTTT
AGACCATTCAAAGGAGAGATCTTAGAAGCTGTTGTTACCATGGTAAACAAGATG
GGATTCTTTGCTGAGGCTGGTCCTGTTCAAATCTTCGTGTCCAACCATTTGATTCC
330 bp

Abschnitt der mRNA-spezifischen Sequenz des Actin:

CTCCCTCATGCCATCCTTCGTTTGGACTTAGCAGGTCGTGATCTTACAGATGCTCT
CATGAAAATCTTGACTGAACGTGGTTACTCTTTCACCACTACTGCTGAGCGGGAA
ATTGTGAGGGACATGAAGGAGAAGTTAGCCTATATTGCTCTTGACTATGAACAAG
AGCTAGAGACATCAAAGACCAGCTCGTCTGTGGAGAAGAGTTATGAGCTACCTG
ATGGACAGGTAATCACTATCGGAGCTGAGAGATTCCGGTGCCCTGAAGTCCTCTT
CCAGCCATCCATGATTGGAATGGAAGCTGCTGG
308 bp

Abschnitt der mRNA-spezifischen Sequenz des α -Tubulin:

CTCTGGTCTCGGGTCTCTTCTTTTGGAGCGTCTCTCTGTTGACTATGGAAAGAAGT
CAAAGCTTGGTTTCACTGTGTATCCATCTCCACAGGTTTCTACATCTGTGGTTGAG
CCCTACAACAGTGTCTCTCAACCCACTCCCTCCTGGAACACACCGATGTTGCAG
TTCTCCTTGACAACGAGGCTATCTATGATATCTGCAGGCGCTCTCTTGACATTGAG
CGACCCACCTACACCAACCTCAACCGCCTTGTGTCTCAGGTCATTTCTCTTTGAC
TGCTTCTCTGAGGTTTGATGGTGCCCTTAATGTGGACGTGACTGAATTCCAGACCA
ACTTGGTCCCATAACCCAGAATCCACTTTATGCTTTCCTCATATGCACCAGTCATC
TCTGCGGAGAAGGCGTACCATGAACAACCTCTCTGTGGCTGAAATCACCAACAGTG
CCTTCGAGCCCTCATCCATGATGGCAAAGTGTGACCCCCGCCACGGCAAATATAT
GGCCTGCTGTCTGATGTACCGTGGTGACGTTGTACCCAAGGATGTGAATGCTGCT
GTTGCCACCATCAAGACCAAGCGCACCATTCAGTTCGTGGACTGGTGCCCTACTG
GATTCAAGTGCGGCATCAAATACCAGCCACCTACTGTTGTCCCAGGAGGCGACCT
TGCCAAGGTGCAGAGGGCTGTGTGCATGATCTCTAACTCGACCAGTGTGCTGAG
GTGTTCTCTAGAATTGACCACAAGTTTGATCTCATGTATGCCAAGCGTGCCT
773 bp

Abschnitt der mRNA-spezifischen Sequenz des Poly-Ubiquitin:

TACAACATCCAGAAGGAGTCCACTCTCCATTTGGTGTTGCGTCTCCGTGGTGGCA
TGCAGATTTTCGTCAAGACCCTGACAGGAAAGACCATCACCTGGAGGTCGAGA
GTTTCGGACACCATTTGACAATGTCAAGGCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCC
CACCAGACCAGCAGAGGCTTATCTTTGCTGGAAAGCAGCTTGAGGACGGCCGCA
CCCTTGCCGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACTCTCCATTTGGTGCTTCGTCTC
CGTGTTGGCATGCAGATTTTGTAAAGACCCTGACTGGCAAGACCATCACTCTGG
AGGTTGAGAGCTCGGACACCATCGACAATGTAAAGGCCAAGATCCAGGACAAGG
AGGGGATCCCACCGGACCAGCAGAGGCTGATCTTTGCTGG
422 bp

Abschnitt der 18S rRNA:

CTAGCTATGCGGAGGTCATCCTCCGCGGCCAGCTTCTTAGAGGGACTATGGCCGC
TTAGGCCAAGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTG
GGCCGCACGCGCGCTACACTGATGTATTCAACGAGTCTATAGCCTTGGCCGACAG
GCCCCGGTAATCTTTGAAATTTTCATCGTGATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTG
GTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCACGCGTTGACTACCT
CCCTGCCCTTTGTACACACCAGCTAAATAACCCAC
311 bp

8.2 Karten verwendeter Klonierungsvektoren

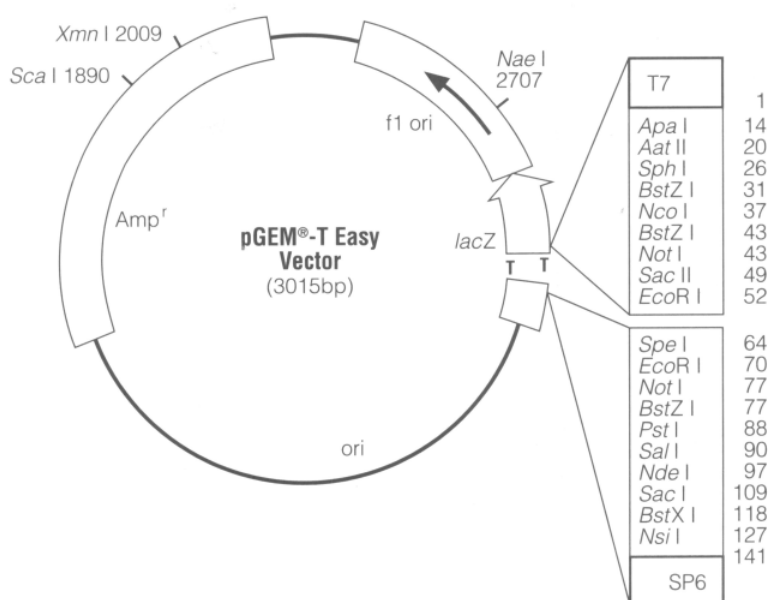


Abbildung 34: Karte des Klonierungsvektors pGEM®-T.Easy von Promega (Mannheim)

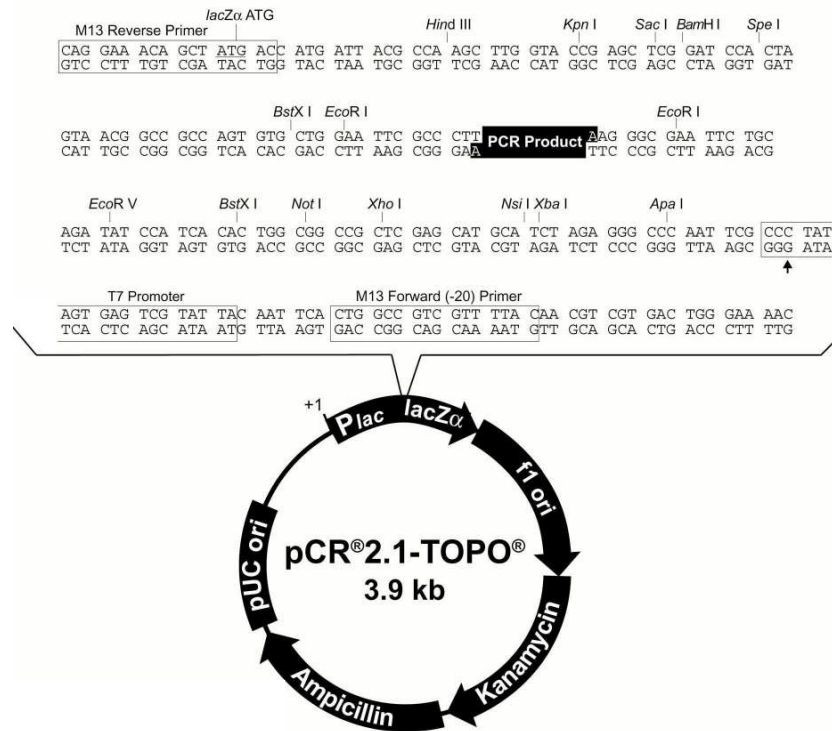


Abbildung 35: Karte des Klonierungsvektors pCR® 2.1-TOPO von Invitrogen (Karlsruhe)

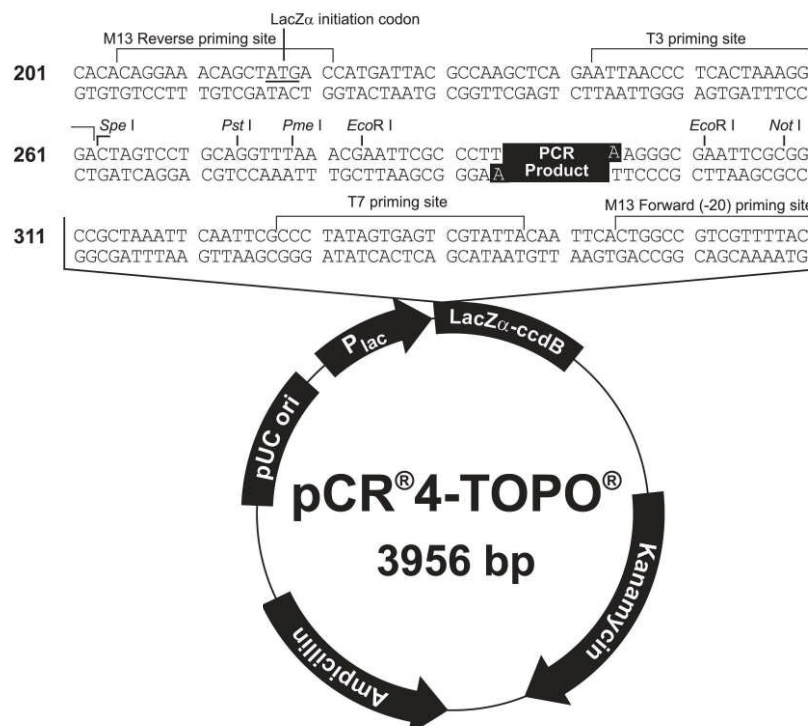


Abbildung 36: Karte des Klonierungsvektors pCR® 4-TOPO von Invitrogen (Karlsruhe)

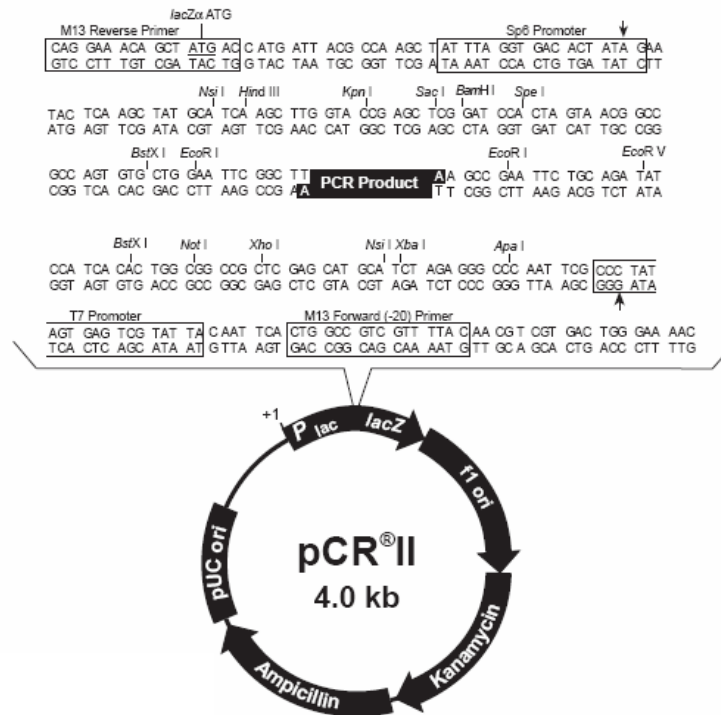


Abbildung 37: Karte des Klonierungsvektors pCR® II von Invitrogen (Karlsruhe)

Danksagung

Ich kann es selbst kaum glauben, aber wenn Sie dies hier lesen, habe ich meine Dissertation abgegeben. Ich, Nanette Schlattermund, die ich am 1. April 1979 auf diese Welt kam, habe es tatsächlich geschafft gesund und am Leben zu bleiben. Nein, das ist in meinen Augen keine Selbstverständlichkeit. Aber diese Zeilen verfasse ich nicht ursächlich, weil ich noch lebe, sondern um mich bei vielen, besonderen, liebenswerten und eigenen Menschen, die meinen Weg in den letzten Jahren, und somit auch diese Arbeit beeinflusst haben, zu bedanken.

Für meine Existenz, das scheinbar unendliche Vertrauen und die finanzielle Unterstützung möchte ich mich aufrichtig bei meiner Mutter und meinem Papa bedanken.

Ein weiteres Dankeschön geht an meine Freunde und meine Geschwister, die viel Interesse an meiner Arbeit und noch mehr Geduld mit mir hatten.

Für einen regen Austausch bezüglich qRT-PCR und IS-RT-PCR, sowie der schnellen, fachkundigen Hilfe möchte ich mich außerdem bei Heike Pospisil, Antje Wollherr, Kryzsof Wieczorek, Florian Grundler, Stephanie Meyer, Stefan Scholten und Tobias Schenk bedanken.

Konstruktive wissenschaftliche Gespräche und das angenehme Miteinander geben mir reichlich Anlass mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern beider Genetik-Arbeitsgruppen zu bedanken. Besonders herauszuheben sind dabei Heidrun und Dagmar, die das Laborleben stets bereichert haben, sowie Nicole und Hans-Peter ohne die diese Arbeit ganz sicher nie entstanden wäre.

Ich wünsche Herrn Mühlbach, Herrn Scholten, Frau Pratje und Frau Lüthje viel Vergnügen bei der Begutachtung meiner Dissertation beziehungsweise meiner Disputation und bedanke mich für die investierte Zeit und Mühe. Und meinen Fragestellern, Nicole Mielke, Stephanie Meyer, Cornelia Heinze, Christina Timmermann, Dirk Becker, Frank Maier, René Lorbiecke und nicht zuletzt auch mir selbst wünsche ich einen interessanten Austausch.