

**Molekulare Charakterisierung eines mit der
Ringfleckigkeit der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) assoziierten
neuen Pflanzenvirus**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nicole Mielke
aus Hamburg

Hamburg 2004

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

auf Antrag von **Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach**

Weitere Gutachter der Dissertation:

Frau Prof. Dr. Carmen Büttner

Tag der Disputation: 02. Juli 2004-09-24

Hamburg, den 16. Juni 2004

Dekan: **Prof. Dr. Arno Frühwald**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abkürzungen für Viren und Bakterien	III
1. Einleitung	
1.1 Die Eberesche – eine ökologisch und ökonomisch wertvolle Baumart	1
1.2 Die Ringfleckigkeit der Eberesche	3
1.3 Zielsetzung	7
2. Material und Methoden	
2.1 Material	8
2.2.1 Pflanzenmaterial	8
2.2.2 Bakterienstämme	8
2.2.3 Chemikalien und Lösungen	8
2.2.4 Kits	9
2.2.5 Primer	9
2.2.6 Polyklonale Antikörper	9
2.2 Methoden	9
2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren	9
2.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA	9
2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA	13
2.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	14
2.2.2.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA	14
2.2.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	15
2.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion	15
2.2.4 Nukleinsäure-Fällung	16
2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen	16
2.2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Gesamt-RNA	16
2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	17
2.2.6 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) – Methoden	17
2.2.6.1 Erststrang-cDNA-Synthese	17
2.2.6.2 RACE zur Untersuchung auf das Vorhandensein eines ‘poly(A)-tails’	17
2.2.6.3 RACE – Methode 1	17
2.2.6.4 RACE – Methode 2	18
2.2.6.5 RACE – Methode 3 (SMART TM -RACE)	19

2.2.6.6	RACE - Methode 4	19
2.2.6.7	RNA-Degradation	19
2.2.6.8	Anbindung der 5'-Biotin-markierten Erststrang-cDNA an Streptavidin-Magnetpartikel	19
2.2.6.9	Poly(dN)-tailing	20
2.2.7	RT-PCR unter Verwendung von Primern, die Bereiche der komplementären Termini beinhalten	20
2.2.8	PCR-Ansatz und PCR-Programme	21
2.2.9	Primerdaten	22
2.2.10	Klonierung von PCR-Produkten	24
2.2.11	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	24
2.2.12	Überprüfung der rekombinanten Plasmide mit vektorspezifischen Primern	25
2.2.13	Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA	26
2.2.14	Sequenzierung der rekombinanten Plasmide	26
2.2.15	Computerauswertung (Sequenz- und Proteinanalysen)	26
2.2.16	Anreicherung von viralen Nucleocapsiden	27
2.2.17	Anreicherung von Viruspartikeln	28
2.2.18	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen – SDS-PAGE	29
2.2.18.1	Herstellung des Gels und Elektrophorese	29
2.2.18.2	Silber-Färbung	30
2.2.19	Western-Blot-Analysen	31
2.2.19.1	Spot-Blot zur Überprüfung des Antiserums gegen das putative G1	31
2.2.19.2	Immunodetektion	31
2.2.19.3	Herstellung von Proteinrohextrakten	32
2.2.19.4	Transfer von im SDS-Gel aufgetrennten Proteinen	32
2.2.20	Detektion von Glykoproteinen	33
3.	Ergebnisse	
3.1	Virusverdächtige Symptome an erkrankten Ebereschen	34
3.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Blättern und Rinde der Eberesche	35
3.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA unter Verwendung von Trizol [®] Reagent	35
3.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA nach Wang <i>et al.</i> (2000)	35
3.2.3	Isolierung von Gesamt-RNA nach Boom <i>et al.</i> (1990)	36
3.3	Etablierung eines RACE-Verfahrens	37
3.3.1	3'-RACE zur Untersuchung auf Vorhandensein eines 'poly(A)-tails'	38

	im Virusgenom	
3.3.2	RACE – Methode 1	39
3.3.3	RACE – Methode 2	42
3.3.4	SMART TM -RACE	44
3.3.5	RACE – Methode 4	45
3.4	RT-PCR unter Verwendung von Primern, die Bereiche der komplementären Termini beinhalten	49
3.4.1	RT-PCR unter Verwendung des Primers Termini11	49
3.4.2	Bestätigung des putativ viralen 3'-Endes des aus der RT-PCR mit dem Primer Termini11 hervorgegangenen Klon V107.6 durch RACE	50
3.4.3	Amplifikation und Bestimmung des 5'-Endes der zweiten putativ viralen RNA (RNA 2)	51
3.4.4	Bestätigung des 5'-Endes der zweiten putativ viralen RNA (RNA 2)	52
3.4.5	Amplifikation und Bestimmung des 5'-Endes der dritten putativ viralen RNA (Klon V107.1)	54
3.4.6	RT-PCR unter Verwendung der Primer T13 und T13(5')	55
3.5	Sequenzanalysen der RNAs 1-4	56
3.5.1	RNA 1	56
3.5.2	RNA 2	59
3.5.3	RNA 3	61
3.5.4	RNA 4	63
3.5.5	Vergleich der Terminussequenzen der vier RNAs	63
3.6	Anreicherung von Nucleocapsiden	64
3.6.1	Anreicherung von Nucleocapsiden nach Kellmann <i>et al.</i> (2001)	65
3.6.2	Anreicherung von Nucleocapsiden nach Roggero <i>et al.</i> (1998)	66
3.6.3	Protein-Analyse der angereicherten Nucleocapsid-Fraktion in einer SDS-PAGE	67
3.7	Isolierung von Viruspartikeln	67
3.7.1	RT-PCR mit diagnostischen Primern	68
3.7.2	SDS-PAGE	69
3.8	Serologischer Nachweis des putativ viralen Glykoproteins G1	69
3.8.1	Ermittlung des Peptid-Antigens	70
3.8.2	Spot-Blot-Analyse des G1-spezifischen Antikörpers	70
3.8.3	SDS-PAGE von Gesamtproteinextrakten	71

3.8.4	Western-Blot-Analyse	72
3.9	Detektion von Glykoproteinen in Gesamtproteinextrakten aus Ebereschen	74
3.10	Diagnostische RT-PCR	75
4.	Diskussion	
4.1	Experimentelle Strategien	76
4.1.1	Etablierung einer RACE	76
4.1.2	Komplementäre Terminussequenzen und RT-PCR-Analysen mit hieraus abgeleiteten Primern	79
4.2	Sequenz- und Proteinanalysen – ein neues Pflanzenvirus	81
4.2.1	Sequenzanalysen der vier identifizierten RNAs	81
4.2.2	Verwandtschaftsbeziehungen des Virus der Eberesche	90
4.2.3	Expressionsstrategie	92
4.2.4	Entwicklung eines Nachweisverfahrens – Diagnostische RT-PCR	94
4.2.5	Ausblick	96
5.	Zusammenfassung	97
6.	Literaturverzeichnis	99
7.	Anhang	
	Anhang I – RNA- und Proteinsequenzen	113
	Anhang II – Virusspezifische Klone	119
	Danksagung	120
	Lebenslauf	121
	Erklärung	122

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AA	Aminosäure
Abs.	Absorption
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cDNA	‘copy’ Deoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonsäure
DIECA	Diethyldithiocarbonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
DOP-PCR	‘Degenerate Oligonucleotide Primed’ Polymerase-Kettenreaktion
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
ELISA	‘Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay’
EM	Elektronenmikroskop(ie)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
f.c.	‘final concentration’, Endkonzentration
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
L.	Linné
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
N-Protein	Nucleocapsidprotein, Hüllprotein
NBT	Nitroblautetrazolium

NCBI	National Center of Biotechnology Information
NS-(Protein)	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
ORF	‘Open Reading Frame’, offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PTGS	Posttranskriptionelles ‘Gene-Silencing’
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RACE	‘Rapid Amplification of cDNA Ends’
RdRP	RNA-abhängige-RNA-Polymerase
RF	Replikative Form
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	‘Stem-Loop’
spec.	Spezies
SSP	Sequenzspezifischer Primer
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
T	Thymin
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyl-Transferase
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	‘Unit’, Enzymeinheit
v/v	Volumen/Volumen
vcRNA	‘virion copy’ Ribonukleinsäure
Vol.	Volumen
vRNA	‘virion’ Ribonukleinsäure
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

Abkürzungen für Viren und Bakterien

ACLSV	Apple Chlorotic Leafspot Virus
ApMV	Apple Mosaic Virus
BUNV	Bunyamwera Virus
CGRMV	Cherry Green Ring Mottle Virus
CLRV	Cherry Leaf Roll Virus
DOBV	Dobrava Virus
DUGV	Dugbe Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GBNV	Groundnut Bud Necrosis Virus
HTNV	Hantaan Virus
HPV	High Plains Virus
LACV	La Crosse Virus
MMuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
OROV	Oropouche Virus
PDV	Prune Dwarf Virus
PPSMV	Pigeon Pea Sterility Mosaic Virus
PPV	Plum Pox Virus
PUUV	Puumala Virus
RCSV	Rice Stripe Virus
RGSV	Rice Grassy Stunt Virus
RRSV	Raspberry Ringspot Virus
RVFV	Rift Valley Fever Virus
TMV	Tobacco Mosaic Virus
TNV	Tobacco Necrotic Virus
TORSV	Tomato Ringspot Virus
TOSV	Toscana Virus
TRSV	Tobacco Ringspot Virus
TSWV	Tomato Spotted Wilt Virus
UUKV	Uukuniemi Virus
WSMV	Watermelon Silver Mottle Virus

1. Einleitung

1.1 Die Eberesche – eine ökologisch und ökonomisch wertvolle Baumart

Die Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) gehört innerhalb der *Rosaceae* (Subfamilie *Maloideae*) zur Gattung *Sorbus*, die etwa 80-100 Arten sowie unzählige Hybriden umfasst.

Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich über weite Teile Europas sowie Westasien bis hin zum Ural. Da sie tiefe Temperaturen von bis zu -30°C gut vertragen kann, findet man sie nicht nur in gemäßigten Tiefland-Zonen, sondern auch in klimatisch ungünstigen Gebirgs- und Kammlagen (Eisenreich, 1956). Sie dringt von allen Laubgehölzen als einzige bis zur nördlichen Baumgrenze vor. Ein solch großes Verbreitungsgebiet bedingt zahlreiche Unterarten. Die häufigste Subspezies ist jedoch die gewöhnliche Eberesche *Sorbus aucuparia* ssp. *aucuparia*, in subalpinen und arktischen Gegenden ist hingegen *S. a.* ssp. *glabrata* vorherrschend.

Die Eberesche stellt keine besondere Anforderung an den Boden und kann aufgrund ihrer guten Streuzersetzung und somit humusbildenden Fähigkeit trockene, nährstoffarme oder feucht durchlässige Böden besiedeln (Eisenreich, 1956; Erlbeck, 1979; Namvar und Spethmann, 1983; de Cuveland, 1996). Die zusätzlichen Eigenschaften der schnellen und starken Durchwurzelung des Bodens sowie das zügige Jugendwachstum lassen ihr deshalb die Funktion einer Pionierbaumart zukommen (Eisenreich, 1956; Köstler *et al.*, 1968; Ebert, 1973; Erlbeck, 1979; Namvar und Spethmann, 1983).

Ihr Wuchs ist baumförmig mit einem oder mehreren Stämmen. Sie erreicht eine Höhe von bis zu 25 m und einen Stammdurchmesser von max. 60 cm. Das Durchschnittsalter dieser Baumart beträgt 50-70 Jahre, in Fällen, bei denen sie nicht im Mischwald von anderen Baumarten verdrängt werden, konnten jedoch auch schon Ebereschen von bis zu 150 Jahren gefunden werden (Aas und Holdenrieder, 1992). Die Blüte, die nach etwa 10 Jahren zum ersten Mal ansetzt, zeigt sich je nach Höhenlage zwischen Mai und Juni, die Fruchtreife erfolgt zwischen August und Oktober. Die orangeroten Beeren der Wildform, die von etwa 60 Vogelarten verzehrt werden und daher auch zu dem volkstümlichen Namen 'Vogelbeere' der Eberesche führte, weisen aufgrund des hohen Anteils an Parasorbinsäure einen bittersäuerlichen Geschmack auf. Die Substanz wirkt schleimhautreizend und daher minder toxisch.

Ökonomisch betrachtet spielt die Eberesche heute nur eine geringe Rolle. Ihre frühere Funktion in der Volksmedizin hat sie zumindest in Westeuropa vollständig verloren.

Aufgrund des hohen Gehalts an Parasorbinsäure dienten die rohen Früchte als Abführmittel. Des Weiteren wurden Extrakte und Tees der Pflanze gegen Gicht, Rheuma, Durchfallerkrankungen und Hämorrhoiden eingesetzt (Eisenreich, 1956; Hillebrand und Leder, 1995).

Als Kultursorte im Obstbau, die sehr viel weniger Parasorbinsäure, dafür aber mehr Zucker enthält, ist die Eberesche ebenfalls eher unbedeutend (Verstl, 1997). Zwar ist der Gehalt an Vitamin C, Vitamin P und Sorbit, ein Zuckeraustauschstoff, der für Diabetiker geeignet ist, recht hoch, und der Anbau bedarf keiner großen Pflege, aber die Nachfrage auf dem Markt ist gering. Vor dem ersten Weltkrieg jedoch spielte die 'Vogelbeere' bei der Volksernährung sowie als Vitamin C-Lieferant bei Skorbut eine Rolle, aber auch später wurde sie noch in der DDR als Ersatz für vitaminreiche Zitrusfrüchte kultiviert (Friedrich und Schuricht, 1985). Der Obstanbau dieser Baumart wird heute nur noch in osteuropäischen Ländern wie Polen, Bulgarien, Rußland und der Tschechei betrieben. Aus diesen Ländern werden auch die Früchte für den in Österreich traditionell hergestellten Vogelbeerschnaps importiert. Weitere kommerzielle Produkte sind Marmelade, Gelee und Saft (Verstl, 1997).

Das Holz der Eberesche wurde früher viel als Nutzholz in der Tischlerei und Drechslerei eingesetzt und ist heute wieder zunehmend in der Holzindustrie zu finden (Namvar und Spethmann, 1983). Aufgrund seiner Feinstrukturierung und gleichmäßigen Verkernung erreicht es ähnliche Festigkeitswerte wie wirtschaftlich wichtige Baumarten und eignet sich somit gut zur Verwendung in der Möbelindustrie und Tischlerei, als Furnierholz und zur Zellstofferzeugung (Hillebrand und Leder, 1995).

Eine große wirtschaftliche Bedeutung kommt der Eberesche jedoch als Pionier- und Vorwaldbaumart, insbesondere auch an Problemstandorten wie Frostlagen, Kahlschlägen, Bergstürzen, Moorrändern und immissionsbedingten Schadflächen zu (Eisenreich, 1956, Namvar und Spethmann, 1983; Greger, 1987). In ihrem Schutz können weniger stresstolerante und ökonomisch bedeutsame Baumarten wie Buche, Tanne und Eiche nachgezogen werden. Zudem schützt sie die wertvolleren Baumarten in Jungbeständen vor Wildverbiss.

Ein letzter wirtschaftlicher Nutzen kommt der Eberesche heute als dekorative Baumart in Parks, Gartenanlagen und Alleen zu.

1.2 Die Ringfleckigkeit der Eberesche

Bereits 1960 beschrieb Kegler eine Erkrankung der Eberesche, die sich in einer chlorotischen Scheckung der Blätter sowie chlorotischen Ringflecken äußert. In einer Erhebung von Büttner und Führling (1993) konnten im Hamburger Staatsforst an etwa 80 % aller bonitierten Ebereschen diese Symptome beobachtet werden. Aber auch in anderen Gebieten Deutschlands (Schmelzer, 1977; Ebrahim-Nesbath und Izadpanah, 1992; Polak und Zieglerova, 1996; Benthack, 2001) und weiten Teilen Europas ist diese Erkrankung zu finden (Cooper, 1979; Polak *et al.*, 1990). Neben den charakteristischen Blattsymptomen fällt eine zunehmende Degradation des Baumes über einen Zeitraum von mehreren Jahren auf, ganze Astpartien sterben nacheinander ab (Benthack, 2001).

1995 wurde von Führling und Büttner gezeigt, daß das putative Agens durch Pfropfung übertragbar ist. In Zusammenhang mit der charakteristischen Symptomatik war dies ein erstes Indiz dafür, daß es sich bei der Ringfleckigkeit der Eberesche um eine Virusinfektion handeln könnte. Das Vorkommen von Phytoplasmen, die ebenfalls auf diesem Weg übertragen werden, konnte in einer RT-PCR mit spezifischen Primern durch Benthack (1998) ausgeschlossen werden.

Insbesondere die chlorotischen Ringflecken auf den Blättern sprechen für ein Virus als Erreger. Viele Viren verschiedenster Familien verursachen auf ihren Wirtspflanzen solche charakteristischen Symptome. So können Ringflecken auch auf vielen heimischen virusinfizierten Kultur- und Wildgehölzen beobachtet werden. Als Erreger findet man hier z.B. das Tomato Ringspot Nepovirus (ToRSV), das Tobacco Ringspot Nepovirus (TRSV), das Raspberry Ringspot Nepovirus (RRSV), das Cherry Green Ring Mottle Virus (CGRMV, *Flexiviridae*), das Plum Pox Potyvirus (PPV), das Prune Dwarf Ilarvirus (PDV) oder auch das Apple Chlorotic Leafspot Trichovirus (ACLSV).

Sweet (1980) gelang es, verschiedene Viren aus Kern- und Steinobst durch Pfropfung auf Sämlinge von Wildgehölzen wie auch der Eberesche zu übertragen. Neben dem Apple Mosaic Ilarvirus (ApMV) inokulierte er auch unter anderem mit dem Apple Chlorotic Leafspot Trichovirus (ACLSV). Letzteres rief in *Sorbus aucuparia* L. chlorotische Ringflecken und Stauchungen hervor. Schimanski *et al.* (1987) konnte das ACLSV in natürlich erkrankten Ebereschen jedoch nicht nachweisen, und auch der Verdacht auf ApMV wurde im 'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay' (ELISA) ausgeräumt. Führling (1994) bestätigte dieses negative Ergebnis.

Weitere serologische Untersuchungen und Elektronenmikroskopie (EM) konnten bislang den Verdacht auf einen viralen Erreger nicht eindeutig bestätigen. Trotzdem wurden in den letzten Jahren einige Hinweise auf das Vorkommen eines Virus in symptomatischen Ebereschen erhalten.

So beobachteten Ebrahim-Nesbat und Izadpanah (1992) in Ultradünnschnitten sphärische Partikel der Größenordnung von etwa 80 nm, die dem des TSWV ähnlich waren. Im ELISA konnte zudem eine Reaktion mit einem Antiserum gegen TSWV detektiert werden. Eine Reproduktion der immunologischen Untersuchung durch Führling (1994) und Führling und Büttner (1998) bestätigen diese Beobachtungen. RT-PCR-Untersuchungen von Benthack (1998) mit gruppenspezifischen Primern zweifelten diese ersten Indizien auf TSWV als möglichen viralen Erreger der Ringfleckigkeit bei Ebereschen jedoch an.

Aufgrund der weiten Verbreitung des Tabakmosaikvirus (Tobacco Mosaic Tobamovirus, TMV) in der Waldvegetation untersuchten Führling und Büttner (1998) erkrankte Ebereschen im ELISA auf eine mögliche Infektion mit diesem Virus und konnten hierbei eine Reaktion mit dem Antiserum feststellen. Benthack (1998) konnte dieses Ergebnis jedoch in erneuten ELISA-Tests nicht eindeutig bestätigen, Mielke (1999) widerlegte mittels Northern-Blot-Hybridisierungen mit einer TMV-spezifischen dsRNA-Sonde eine Infektion der Eberesche mit diesem Virus endgültig.

Ein Nachweis des ebenfalls in Waldökosystemen häufig vorkommenden Cherry Leaf Roll Nepovirus (CLRV) konnte weder im ELISA noch durch RT-PCR-Analysen in erkrankten Ebereschen nachgewiesen werden (Führling, 1994; Polak und Zieglerova, 1996; Werner persönliche Mitteilung, 1997; Benthack *et al.*, 1998; Führling und Büttner, 1998). ELISA-Untersuchungen auf das Tobacco Necrotic Necrovirus (TNV) waren ebenfalls negativ (Führling und Büttner, 1998).

Da der Versuch der Identifizierung des Erregers der Ringfleckigkeit der Eberesche mit serologischen und elektronenmikroskopischen Techniken bis *dato* nicht gelungen war, wurden erste Schritte gemacht, die Natur des putativen Agens mittels molekularbiologischer Verfahren aufzuklären. Molekularbiologische Methoden bieten häufig die einzige Möglichkeit, einer Virusindikation nachzugehen (Dodds *et al.*, 1984; Valverde *et al.*, 1990; Jelkmann *et al.*, 1992; Keim-Konrad und Jelkmann, 1996). Der geringe Virustiter, die Instabilität der Partikel sowie ein hoher Gehalt an pflanzlichen Sekundärmetaboliten erschweren die Erfüllung der Koch'schen Postulate durch konventionelle Isolierungs- und Übertragungsverfahren oder machen sie sogar unmöglich (Dodds *et al.*, 1984; Maiß *et al.*, 1987; Rezaian *et al.*, 1991; Büttner *et al.*, 1996; Werner *et al.*, 1997).

So gelang es Benthack (2001) und Mielke (1999) nach ersten Hinweisen von Führling (1994) aus Blättern und Rinde symptomzeigender Pflanzen verschiedener Standorte in Deutschland dsRNA zu isolieren und somit ein weiteres Indiz für eine Virusinfektion zu erbringen. Da über 90 % aller Pflanzenviren ein einzelsträngiges RNA-Genom aufweisen und diese im Zuge der Replikation hochmolekulare doppelsträngige 'Replikative Formen' (RF) bilden, ist dies ein guter Hinweis auf die Anwesenheit eines viralen Erregers. Benthack (2001) und Mielke (1999) konnten nach Etablierung einer geeigneten modifizierten Methode zur Isolierung von dsRNA nach Morris und Dodds (1979) im wesentlichen vier dsRNA Moleküle der Größenordnung von 7 kb, 2,3 kb, 1,5 kb und 1,3 kb im nativen Agarosegel detektieren. Aus nichtsymptomatischen Ebereschen wurden hingegen keine nachweisbaren Konzentrationen an dsRNA isoliert.

Das Vorkommen mehrerer dsRNA-Moleküle kann hierbei verschiedene Ursachen haben. So diskutierte Benthack (2001) als eine Möglichkeit einen viralen Erreger mit einem multipartiten Genom. Aber auch das Vorkommen 'Replikativer Formen' (RF) subgenomischer RNAs, Satelliten-RNAs oder viraler 'Defekter RNAs' (D-RNAs) konnte nicht ausgeschlossen werden.

Die Amplifikation und Klonierung der dsRNAs über RT-DOP-PCR und 'TA-Cloning' führte durch überlappende Klone zu einer Sequenz von 3,737 nt (AY563040), die auf Aminosäureebene über einen Bereich von etwa 1,5 kb eine Homologie von bis zu 43 % zur RNA-abhängigen-RNA-Polymerase (RdRP) von verschiedenen Vertretern der *Bunyaviridae* und *Paramyxoviridae* aufzeigt (Benthack, 2001). Der Hinweis auf ein solches virales Protein erhärtete somit erste Vermutungen einer viralen Natur des Agens.

Die Übertragung des putativ viralen Erregers auf krautige Indikatorpflanzen wurde erstmals von Kadri (2002) mit Hilfe der 'Trockenmethode' gezeigt und von Ringel (2003) bestätigt. *Nicotiana rustica* erwies sich hierfür als am besten geeignet. Der Nachweis der putativ viralen RNA erfolgte durch RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer mit anschließender Southern-Blot-Hybridisierung. Jedoch schien der Virustiter auch nach mehreren Passagen noch sehr niedrig zu sein. Die Ausprägung von Symptomen auf den Testpflanzen war uneinheitlich, häufig konnten keine Veränderungen zwischen scheininokulierten Pflanzen und mit infiziertem Material abgeriebenen Pflanzen beobachtet werden. Vorherige Tests zur mechanischen Übertragung mit herkömmlichen Methoden (Benthack, 1998; Kadri, 2002) zeigten keinen Erfolg. Dies würde, sofern es sich bei dem Erreger der Ringfleckigkeit tatsächlich um ein Virus handelt, für die Instabilität der Partikel sprechen. Eine mechanische

Inokulation gelingt insbesondere bei Virusgruppen mit multipartiten Genomen, wie z.B. den *Tospoviren*, den *Phytoreoviren*, den *Bromoviren* oder auch den *Cucumoviren*, nur schwer.

Die Identifizierung des putativ viralen Erregers der Ringfleckigkeit der Eberesche ist aufgrund der ökologischen und zunehmend auch ökonomischen Bedeutung der Baumart von großem Interesse. Virusinfektionen beeinträchtigen die Vitalität und Prädisposition des Baumes (Nienhaus *et al.*, 1985). Sie setzen die Widerstandskraft gegenüber einwirkenden Stressfaktoren erheblich herab, können zu vollständiger Degeneration der Pflanze führen und große Schäden sowie Ertragsverluste in Beständen hervorrufen (Nienhaus *et al.*, 1985).

Vereinzelte infizierte Gehölze, von denen aus sich das Virus unkontrolliert ausbreiten kann, stellen somit langfristig im Forst, im öffentlichen Grün oder in Baumschulen ein bedrohliches Infektionspotential dar (Nienhaus und Castello, 1989). Gerade virusinfizierte Ebereschen sind eine besondere Gefahr für Kulturgehölze, da sie eine hohe natürliche Verbreitung aufweisen (Eisenreich, 1956; Aas und Holdenrieder, 1992). Des Weiteren spielt hier das Vordringen von Kulturpflanzen in natürliche Biotope eine nicht unwesentliche Rolle. Die bislang in der Natur nicht gegebene Nähe der unterschiedlichen Pflanzenarten ermöglicht dem Virus die Eroberung neuer Wirte. Sollten die virusinfizierten Ebereschen ein Infektionspotential für andere Baumarten wie die Eiche und Obstgehölze darstellen, ergibt sich für *Sorbus aucuparia* L. somit ein bedeutender ökologischer Stellenwert mit ökonomischen Auswirkungen.

Neben der Kenntnis über den Erreger ist zudem die Information über dessen Verbreitung von äußerst wichtigem Interesse. Büttner und Führling (1993) beschreiben eine hohe Infektionsrate bei Ebereschensämlingen in Forstbaumschulen. Da die Symptome jedoch häufig erst nach einigen Jahren sichtbar werden, stellen sie nach ihrer Auspflanzung eine große Gefahr für den Baumbestand dar. Zudem besteht das Risiko, dass bereits in der Baumschule eine Übertragung auf wirtschaftlich wichtige Baum- und Kulturarten stattfindet. Sollte sich demnach die Vermutung auf ein Virus als Erreger der Ringfleckigkeit bei *S. aucuparia* L. bestätigen, so ist eine schnelle Detektion durch die Entwicklung eines spezifischen Diagnoseverfahrens und die Bekämpfung des Übertragungsweges durch phytosanitäre Maßnahmen für den Erhalt von gesunden Baumbeständen unerlässlich.

Der ökologische und ökonomische Stellenwert der Eberesche sowie die aufgezeigten Hinweise auf die mögliche virale Natur des Erregers der Ringfleckigkeit geben Anlass dazu, der Ursache der Erkrankung weiter verstärkt nachzugehen und die Identität des putativen Agens endgültig aufzuklären.

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, auf der Basis erster Hinweise von Benthack (2001) auf ein virales RdRP-Gen in Zusammenhang mit der Ringfleckigkeit der Eberesche, die virale Natur des putativen Agens mit Hilfe molekularbiologischer Techniken endgültig zu bestätigen.

Ausgehend von der durch Benthack (2001) erhaltenen ersten Sequenzinformation sollte zunächst ein RACE-Verfahren etabliert werden, das zum Erhalt der kompletten Sequenz dieser putativ viralen RNA, die möglicherweise den ORF für das RdRP-Gen trägt, führt. Des Weiteren sollte dem Verdacht auf ein multipartites Virusgenom durch die Identifizierung weiterer genomischer RNAs nachgegangen werden. Das dsRNA-Muster, geprägt durch im wesentlichen vier Banden der Größen von etwa 7 kb, 2,3 kb, 1,5 kb und 1,3 kb, die Homologie zu der Familie *Bunyaviridae* mit einem tripartiten ss(-)RNA-Genom sowie die erheblichen Schwierigkeiten der mechanischen Übertragung des Erregers würden für diese Theorie sprechen.

Die anschließenden Genomanalysen und eingehende Verwandtschaftsstudien mittels geeigneter Software, auf Basis der erhaltenen Sequenzinformationen, sollten schließlich zur Identifizierung des Virus führen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Das verwendete Blatt- und Rindenmaterial erkrankter und symptomfreier Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) stammte ausschließlich von zwei Freilandstandorten in Hamburg:

- Revierförsterei Klövensteen
- Botanischer Garten, Klein Flottbek

Der Zeitraum der Ernte in den Jahren 2002 und 2003 lag jeweils zwischen Anfang Mai und Mitte Juli. Die Einteilung der Bäume in erkrankt und symptomlos erfolgte nach visueller Bonitur. Die typischen Krankheitssymptome sind chlorotische Ringflecken und/oder eine chlorotische Scheckung der Blätter.

Die krautigen Kontrollpflanzen *Abutilon spec.* und *Euphorbia pulcherrima*, deren Blattmaterial zur Herstellung von Proteinrohextrakten für Western-Blot-Analysen verwendet wurde, stammten aus dem Fachhandel.

Das Material wurde frisch eingesetzt oder bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

2.1.2 Bakterienstämme

Bei sämtlichen Klonierungen von PCR-Produkten wurden für die Transformation chemisch kompetente Zellen des *Escherichia coli* Stammes DH 5 α verwendet.

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

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 (Taufkirchen) 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 oder durch Filtration (0,45 μm Porendurchmesser) sterilisiert. Für die Arbeiten mit Ribonukleinsäure wurden die Lösungen, Puffer sowie das Wasser vor dem Autoklavieren mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und mindestens vier Stunden gerührt. Sofern das Autoklavieren einer Chemikalie nicht möglich war, wurden die hiermit hergestellten Lösungen und Puffer mit DEPC-behandeltem und autoklaviertem Wasser angesetzt.

2.1.4 Kits

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden folgende Kits verwendet:

TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen, Karlsruhe)

pGEM[®] T Easy Vector System (Promega, Mannheim)

Für die Detektion von Glycoproteinen wurde das 'Dig Glycan Detection Kit' der Firma Roche (Mannheim) eingesetzt.

2.1.5 Primer

Die Ableitung von sequenzspezifischen Primern (SSP) wurde mit Hilfe des Programms Lasergene, Primer Select 5.05 (DNASar Inc., Madison, USA) vorgenommen. Eine Liste der verwendeten Primer befindet sich unter 2.2.9.

Sowohl die unmarkierten als auch die 5'-Biotin-markierten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) bezogen und bei –20°C gelagert.

2.1.6 Polyklonale Antikörper

Der verwendete polyklonale Peptid-Antikörper wurde gegen einen Bereich von 15 Aminosäuren (CHE PKI RDT FTH DRE) des putativen Glykoproteins G1 von der Firma SeqLab (Göttingen) hergestellt. Die Auswahl des Peptids wurde unter Einsatz des Softwareprogrammes Lasergene, Protean (DNASar) getroffen.

Zur dreimonatigen Immunisierung wurden Kaninchen verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Es wurden drei verschiedene Methoden zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Ebereschblättern und –rinde durchgeführt. Hierfür wurde sowohl frisches als auch bei –70°C gelagertes Material verwendet.

Isolierung von Gesamt-RNA unter Verwendung von TRIzol[®] Reagent

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Ebereschgewebe mit TRIzol[®] (Invitrogen) wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Methode folgt dem von Chomczynski und Sacchi (1987) entwickelten Prinzip.

Isolierung von Gesamt-RNA nach Wang *et al.* (2000)

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Ebereschengewebe in Anlehnung an Wang *et al.* (2000) wurde geringfügig modifiziert durchgeführt.

Ca. 4 g Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerkleinern

⇓

5 Vol. Extraktionspuffer (0,2 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-HCl pH 8,5, 0,3 M LiCl, 0,01 M Ethylendiaminetetraacetat (EDTA), 1,5 % Lithiumdodecylsulfat, 1 % Natriumdesoxycholat, 1 % Tergitol NP-40, autoklavieren; direkt vor Gebrauch Zugabe von: 0,001 M Aurintricarboxylsäure, 0,01 M Dithiothreitol, 0,005 M Thioharnstoff, 2 % Polyvinylpyrrolidon (PVP)-40) auf Eis hinzugeben und mind. für 2 h bei -70°C inkubieren

⇓

bei 37°C auftauen lassen und 20 min bei 5.000 rpm bei 4°C zentrifugieren (Minifuge GL, Heraeus Christ)

⇓

Überstand mit 1/30 Vol. 3,3 M Natriumacetat und 10 % Ethanol versetzen, 10 min auf Eis inkubieren

⇓

20 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Minifuge GL, Heraeus Christ)

⇓

Überstand mit 1/9 Vol. 3,3 M Natriumacetat und 33 % Isopropanol versetzen, 2 h bei -20°C inkubieren

⇓

30 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Minifuge GL, Heraeus Christ)

⇓

Sediment in 3 ml ddH₂O resuspendieren, 30 min auf Eis inkubieren

⇓

30 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Minifuge GL, Heraeus Christ)

⇓

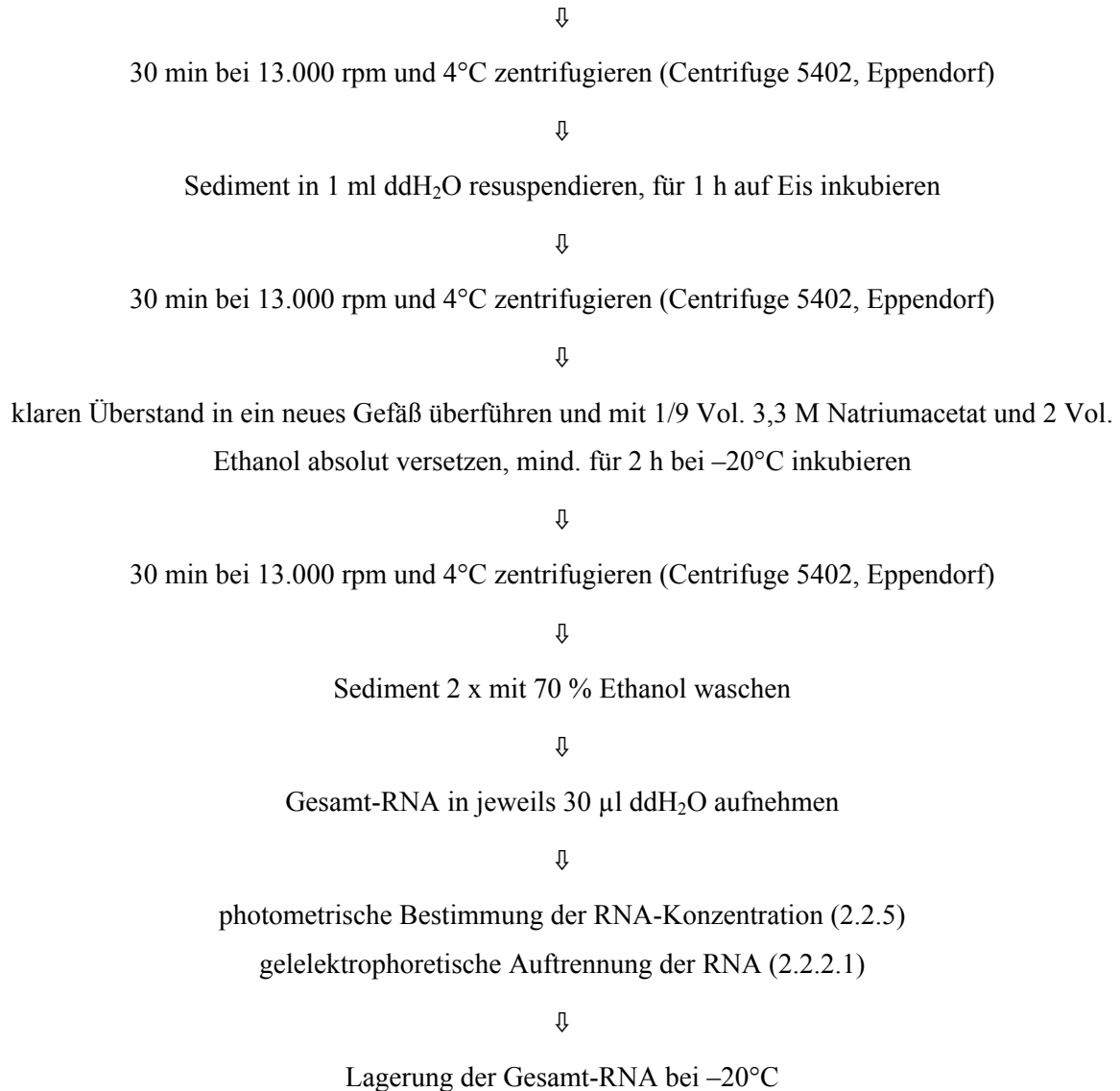
Überstand mit 1/4 Vol. 10 M LiCl versetzen, über Nacht bei -20°C inkubieren

⇓

30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Centrifuge 5402, Eppendorf)

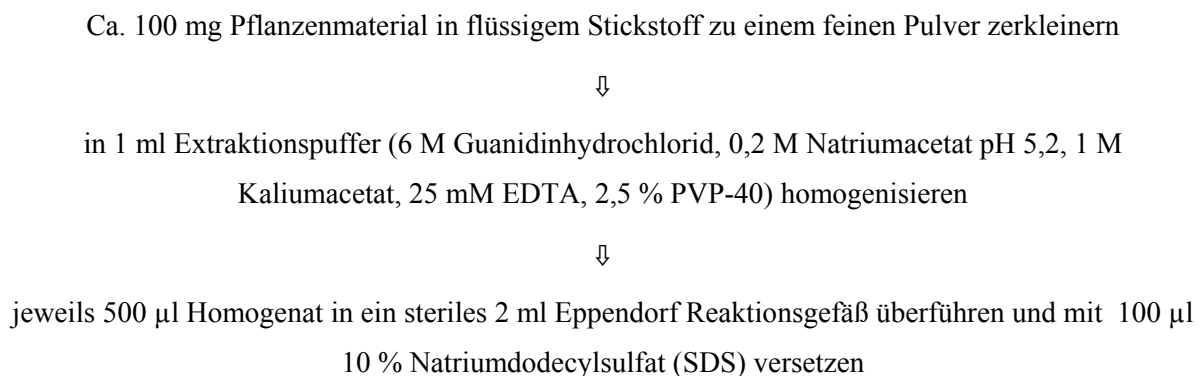
⇓

Sediment in 1,5 ml ddH₂O resuspendieren und mit 1,5 Vol. 5 M Kaliumacetat versetzen, 3 h auf Eis inkubieren



Isolierung von Gesamt-RNA in Anlehnung an Boom *et al.* (1990)

Die Methode zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Ebereschengewebe nach Boom *et al.* (1990) wurde geringfügig modifiziert.





10 min bei 70°C inkubieren, zwischendurch mischen



5 min auf Eis abkühlen



Homogenat 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Centrifuge 5402, Eppendorf)



jeweils 300 µl aus dem nukleinsäurehaltigen Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen und mit 300 µl Natriumiodid-Lsg. (6 M Natriumiodid, 0,15 M Natriumsulfit), 150 µl Ethanol absolut und 25 µl Silica-Lsg. (1 g/ml, pH 2,0; 2 x in ddH₂O aufschwemmen und für 4 h sedimentieren lassen) versetzen; 10 min bei Raumtemperatur inkubieren, zwischendurch vorsichtig mischen



10 min bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Centrifuge 5402, Eppendorf)



Sediment zweimal mit 500 µl Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50 % Ethanol) waschen



Sediment in 200 µl H₂O resuspendieren und 4 min bei 70°C erhitzen



5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Centrifuge 5402, Eppendorf)



nukleinsäurehaltigen Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen und mit Phenol/Chloroform extrahieren (2.2.3)



Fällung der RNA aus der wässrigen Phase (2.2.4)



Gesamt-RNA in jeweils 30 µl ddH₂O aufnehmen



photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration (2.2.5)

gelelektrophoretische Auftrennung der RNA (2.2.2.1)



Lagerung der Gesamt-RNA bei -20°C

2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Anzucht des *E. coli* Stammes DH 5α

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden die Klone zunächst für den Erhalt einer Reinkultur aus den Glycerol Stammkulturen auf Luria Bertani (LB)III-Ampicillin (150 µg/ml)-Festagar-Platten als Verdünnungsausstrich mit einer sterilen Impföse übertragen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelkolonien dieser Platten oder von den 'Masterplates' (2.2.12) wurden dann in einen Erlenmeyerkolben mit 10ml LBIII-Ampicillin (150 µg/ml)-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37°C im Thermoschrank unter Schütteln (150 rpm) kultiviert.

Der LB-Agar sowie das LB-Flüssigmedium wurden als Fertigmedien von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde als Minipräparation in Anlehnung an Birnboim und Doly (1979) durchgeführt.

1,5 ml einer Übernachtskultur für 15 sec bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Centrifuge 5402, Eppendorf)

⇓

Überstand verwerfen (zur Entsorgung mit ca. 2 Vol. einer 1 %igen Helix[®]I-Lsg.(B. Braun, Melsungen) versetzen, über Nacht inkubieren) und das Sediment in 250 µl TELT-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 0,4 mM Triton X-100) resuspendieren

⇓

Zugabe von 25 µl einer frischen 1 %igen Lysozym-Lsg., 5 min auf Eis inkubieren

⇓

2 min auf 95°C erhitzen, für 5 min auf Eis stellen

⇓

10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Centrifuge 5402, Eppendorf)

⇓

schleimiges Sediment entfernen (zur Entsorgung mit einer 1 %igen Helix[®]I-Lsg. versetzen, über Nacht inkubieren)

⇓

nukleinsäurehaltigen Überstand mit Phenol/Chloroform extrahieren (2.2.3)

⇓

wässrige Phase mit 1 Vol. Isopropanol (-20°C) versetzen



20 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Centrifuge 5402, Eppendorf)



Sediment zweimal mit 70 % Ethanol waschen und im 'Speed Vac. Concentrator' (Savant) trocknen



Plasmid-DNA in 10 µl H₂O aufnehmen



zur qualitativen und quantitativen Bestimmung 1 µl Plasmid-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisieren (2.2.13) und gelelektrophoretisch auftrennen (2.2.2.2)



Lagerung der Plasmid-DNA bei -20°C

2.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA (2.2.1.1) sowie die aufgereinigte vRNA (2.2.16) 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 (200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,0) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf etwa 65°C erfolgte die Zugabe von 0,9 ml 37 %igem Formaldehyd. Das im Träger ausgehärtete Gel wurde anschließend für mindestens 15 min in dem Laufpuffer (1 x MOPS, 0,74 % Formaldehyd) äquilibriert.

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 4 µl Probe mit 1 µl 5 x Probenpuffer (s. u.) versetzt, 15 min bei 65°C denaturiert und schließlich bis zum Auftragen auf Eis gehalten.

Die Elektrophorese in der Mini-Gelkammer (Biometra) erfolgte bei 50 V konstanter Spannung.

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

Der verwendete 5 x Probenpuffer setzte sich wie folgt zusammen:

10 ml Ansatz:

16 µl	gesättigte Bromphenolblau-Lösung
80 µl	500 mM EDTA
100 µl	10 mg/ml Ethidiumbromid
720 µl	37 % Formaldehyd
2 ml	100 % Glycerol
3084 µl	Formamid
4 ml	10 x MOPS

2.2.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA wurde in einem nativen 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Für ein Minigel (8,0 x 6,5 cm) wurde 0,5 g Agarose in 50 ml 1 x TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurde die Agarose-Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (f.c.) versetzt und nach kurzem Abkühlen in die Gelträger gegossen. Die Proben wurden vor dem Auftrag im Verhältnis 5:1 mit dem sechsfach konzentrierten Probenpuffer III (0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin, 6 x TBE, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) versetzt.

Als Längenstandards dienten die DNA Molecular Weight Marker 3 und 15 sowie der pUC Mix Marker (alle von MBI). Als Laufpuffer wurde ein 1 x TBE-Puffer, versetzt mit 0,5 µl/ml Ethidiumbromid, verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte in der Mini-Gelkammer (Biometra) bei 80-90 V konstanter Spannung.

Das Gel wurde unter UV-Durchlicht mit einer Video-Dokumentationsanlage (GelVue UV Transilluminator, Syngene) analysiert.

2.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion

Durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion werden Nukleinsäuren von Proteinen und Lipiden gereinigt. Die Extraktion wurde in Anlehnung an Sambrook *et al.* (2001) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde hierbei zunächst mit 1 Vol. Phenol/Chloroform versetzt und kräftig durchmischt. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation (8 min, 13.000 rpm; Centrifuge 5402, Eppendorf) 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 (2.2.4).

2.2.4 Nukleinsäure-Fällung

Die Nukleinsäuren wurden mit eiskaltem Alkohol unter Verwendung hoher Salzkonzentrationen präzipitiert.

Gesamt-RNA wurde mit 1/10 Vol. 4 M LiCl und 2,5 Vol. Ethanol absolut (-20°C) 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 über Nacht bei -20°C. DNA wurde alternativ auch für 2 h bei -70°C präzipitiert.

Im Anschluss an die Fällung wurde die Nukleinsäure für 40 min bei 13.000 rpm und 4°C sedimentiert (Centrifuge 5402, Eppendorf). Das Sediment wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und im 'Speed Vac. Concentrator' (Savant) für etwa 2 min getrocknet.

Die Nukleinsäure wurde in ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen

2.2.5.1 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 folgt:

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

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

2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Absorption von Proteinen wurde bei 280 nm gemessen. Die Konzentration errechnet sich aufgrund dessen wie folgt:

$$\text{Proteinkonzentration (mg/ml)} = 1,55 \times \text{Abs.}_{\lambda 280} - 0,76 \times \text{Abs.}_{\lambda 260}$$

2.2.6 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) - Methoden

Zur Amplifizierung von cDNA-Enden wurde ausgehend von einer bekannten Sequenz, ein RACE-Verfahren etabliert.

Allen Verfahren ging zunächst eine Erststrang-cDNA-Synthese mit einem unmarkierten oder 5'-Biotin-markierten sequenzspezifischen Primer (SSP) voraus.

2.2.6.1 Erststrang-cDNA-Synthese

Für die Erststrangsynthese wurden zunächst 2-5 µg qualitativ hochwertige Gesamt-RNA (2.2.1.1) mit 20 pmol eines unmarkierten oder 5'-Biotin-markierten Primers 5 min bei 70°C denaturiert.

Nach sofortigem Abkühlen auf Eis für 4 min wurden folgende Agenzien zugegeben:

- 4 µl 5 x Reverse Transkriptase (RT)-Puffer
- 20 U RNase Inhibitor
- 1,5 µl 10 mM dNTP-Mix
- 200 U MMuLV-RT
- ad 20 µl ddH₂O

Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 42°C.

2.2.6.2 RACE zur Untersuchung auf das Vorhandensein eines 'poly(A)-tails'

Für die Feststellung, ob die virale RNA polyadenyliert ist, wurde zunächst die Gesamt-RNA unter Verwendung des Primers Myb-Linker-Oligo(dT) revers transkribiert. 5 µl des so erhaltenen Erststranges wurden anschließend in eine RT-PCR mit dem Erststrangprimer und dem SSP 970FP eingesetzt (Programm: RACE 56, 2.2.8).

2.2.6.3 RACE – Methode 1

Die Gesamt-RNA wurde zunächst mit 10 U DNase I (RNase frei) für 10 min bei 37°C behandelt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch fünfminütiges Inkubieren bei 70°C.

Die Reverse Transkription wurde anschließend mit einem unmarkierten SSP durchgeführt (2.2.6.1) und die RNA in dem DNA/RNA-Hybrid mit Hilfe von RNase A oder NaOH degradiert (2.2.6.7). Die Erststrang-cDNA wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.3) und Fällung (2.2.4) aufgereinigt und konzentriert und anschließend unter Verwendung einer Terminalen Desoxyribonucleotidyl-Transferase (TdT) einem 'poly(dA)-tailing' unterzogen (2.2.6.9). 5 µl der so polyadenylierten cDNA wurden zunächst in eine PCR-Reaktion zusammen mit einem SSP und dem Linker-poly(dT)-Primer eingesetzt (Programm: RACE 40, 2.2.8). 2 µl dieses PCR-Ansatzes wurden anschließend in eine zweite PCR unter Verwendung des SSP und des Linker-Primers überführt (Programm je nach Primerkombination: RACE 54 / RACE 52, 2.2.8).

Um für die unterschiedlichen Enzymreaktionen auf Fällungsschritte verzichten zu können, wurde die Erststrangsynthese alternativ in einem weiteren Versuch mit einem 5'-Biotin-markierten SSP durchgeführt und die cDNA vor dem Verdau der RNA (2.2.6.7) an Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel gebunden (2.2.6.8).

2.2.6.4 RACE – Methode 2

Auch bei dieser Methode wurde zunächst eine Reverse Transkription mit einem 5'-Biotin-markierten SSP durchgeführt. Nach Degradation der RNA (2.2.6.7) in dem an Magnetpartikel gebundenen DNA/RNA-Hybrid (2.2.6.8) wurde an den Erststrang ein phosphorylierter Primer unter Verwendung einer einzelstrangspezifischen RNA-Ligase angeheftet.

Primer-Phosphorylierung:	20 pmol	Primer
	20 nmol	Adenosintriphosphat (ATP)
	2 µl	10 x Puffer A
	10 U	T4 Polynukleotid-Kinase
	ad 20 µl ddH ₂ O	

Inkubation für 30 min bei 37°C.

Primer-Ligation:	5 pmol phosphorylierter Primer
	2 µl 10 x Puffer
	2 µl 10 mM ATP
	0,2 µl 1 mg/ml 'Bovine Serum Albumin' (BSA)
	20 U T4 RNA Ligase
	ad 20 µl ddH ₂ O

Inkubation für 24-48 h bei Raumtemperatur.

5 µl des modifizierten Erststranges wurden anschließend in eine RT-PCR eingesetzt (Programm je nach Primerkombination: RACE 54 / RACE 52, 2.2.8). Als Primer dienten ein SSP sowie das komplementäre Oligonukleotid des zur Ligation verwendeten Primers.

2.2.6.5 RACE – Methode 3 (SMARTTM-RACE)

Bei einer weiteren 5'-RACE wurde das 'SMARTTM-RACE cDNA Amplification Kit' der Firma Clontech verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Als SSP wurden die Primer 450RP und 261RP eingesetzt (2.2.9).

2.2.6.6 RACE – Methode 4

In Anlehnung an König (1997) wurde die RACE-Methode 1 modifiziert.

Wie auch bei dem ersten RACE-Verfahren erfolgte die Reverse Transkription mit einem 5'-Biotin-markierten Primer. Statt der im Anschluss folgenden Polyadenylierung der an die Magnetpartikel gebundenen Erststrang-cDNA wurde diese jedoch einem 'poly(dC)-tailing' unterzogen (2.2.6.9).

Zudem wurde statt zwei PCR-Reaktionen lediglich ein Ansatz unter Verwendung eines SSP sowie eines poly(dG)-Linker-Primers oder des (dG)Terminus-Primers (2.2.9) durchgeführt (Programm je nach Primerkombination: RACE 54 / RACE 52, 2.2.8).

2.2.6.7 RNA-Degradation

Um die RNA des DNA/RNA-Hybrids nach der Reversen Transkription zu entfernen wurde der Erststrang entweder mit 1 µl RNase A (0,2 µg/µl) für 30 min bei 37°C inkubiert oder mit 0,5 M NaOH (f.c.) für 10 min behandelt. Die anschließende Neutralisation erfolgte bei letzterem Verfahren mit einer äquimolaren Menge an HCl.

2.2.6.8 Anbindung der 5'-Biotin-markierten Erststrang-cDNA an Streptavidin-Magnetpartikel

30 µl der Streptavidin-beschichteten Magnetpartikel (10 mg/ml, Roche) wurden zunächst dreimal mit TEN₁₀₀-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) gewaschen und in 40 µl TEN₁₀₀ resuspendiert. Anschließend wurde der komplette 20 µl Erststrang-cDNA-Reaktionsansatz zu den Partikeln gegeben und für 1 h unter langsamen Rotieren inkubiert. Im Anschluß wurden die Partikel vorsichtig dreimal mit TEN₁₀₀₀ (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) gewaschen und in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen.

Die Separation der Partikel erfolgte unter Verwendung eines 'Magnetpartikel-Konzentrators' (DynaL MPC®-E-1, Dynal).

2.2.6.9 Poly(dN)-tailing

Um die Erststrang-cDNA mit Ketten von dATP oder dCTP zu verlängern, wurde die Terminale Desoxyribonucleotidyl-Transferase (TdT) verwendet.

Die Reaktion erfolgte in einem 20 µl Ansatz.

x	µl	Erststrang-cDNA
4	µl	5 x Reaktionspuffer (enthält CoCl ₂)
0,8	µl	100 mM dNTP
20	U	TdT
ad	20 µl	ddH ₂ O

Inkubation für 30 min bei 37°C.

Die Reaktion wurde gegebenenfalls durch zehnminütiges Erhitzen bei 70°C beendet.

2.2.7 RT-PCR unter Verwendung von Primern, die Bereiche der komplementären Termini beinhalten

Nach dem die homologen Terminussequenzen der RNA 1 aufgeklärt waren (3.3.5), wurden verschiedene Primer abgeleitet, die an ihrem 3'-Ende Teile dieser Sequenz beinhalten.

Bei Einsatz dieser Primer für die Reverse Transkription wurde das Protokoll aus 2.2.6.1 geringfügig modifiziert.

Nach Zugabe sämtlicher Agenzien wurde der Ansatz bei nachstehenden Temperaturen inkubiert:

10 min	Raumtemperatur
30 min	37°C
30 min	42°C

5µl der Erststrang-cDNA wurden dann in eine RT-PCR eingesetzt. Die ersten fünf Zyklen erfolgten unter Verwendung einer geringeren Annealing-Temperatur, so dass sich der 11-13 nt kurze homologe Sequenzabschnitt anlagern konnte. Die anschließenden 30 Zyklen beinhalteten die höhere primerspezifische Schmelztemperatur TM.

Es wurden die RT-PCR Programme TERMINI L und TERM 13 (2.2.8) verwendet.

Wurde die mit den 'Terminus-Primern' synthetisierte Erststrang-cDNA in eine PCR unter Verwendung eines zusätzlichen SSP eingesetzt, so wurden je nach Primerkombination die Programme RACE 54 oder RACE 52 (2.2.18) durchlaufen.

2.2.8 PCR-Ansatz und PCR-Programme

Für die PCR-Reaktionen wurde, sofern nicht anders vermerkt, standardmäßig folgender Ansatz verwendet:

5 µl	Erststrang cDNA oder Bakterienmaterial einer einzelnen Kolonie
10 pmol	'Forward'-Primer
10 pmol	'Reverse'-Primer
1 µl	10 mM dNTP Mix
5 µl	10 x PCR-Puffer
2,5 U	Taq-Polymerase
ad 50 µl ddH ₂ O	

In nachstehender Tabelle (Tab. 2.1) sind sämtliche verwendeten PCR-Programme aufgeführt. Alle Programme starten mit einem Denaturierungsschritt von 3 min. Nach der PCR wurden die Produkte bei 4°C gelagert oder gegebenenfalls bei –20°C eingefroren.

Tab. 2.1: Daten der verwendeten PCR-Programme

Programm	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen	Final Elongation
A54EX3	94°C, 1 min	54°C, 1 min	72°C, 3 min	30	72°C, 5 min
BIG DYE	96°C, 20 sec	50°C, 20 sec	60°C, 4 min	25	60°C, 4 min
GR5060E2 (diagn. PCR)	94°C, 1 min	50-60°C, 1 min	72°C, 2 min	30	72°C, 5 min
M 13	94°C, 1 min	55°C, 1 min	72°C, 3 min	30	72°C, 5 min
RACE 40	94°C, 1 min	40°C, 1 min	72°C, 5 min	35	72°C, 7 min
RACE 52	94°C, 1 min	52°C, 1 min	72°C, 5 min	35	72°C, 7 min
RACE 54	94°C, 1 min	54°C, 1 min	72°C, 5 min	35	72°C, 7 min
RACE 56	94°C, 1 min	56°C, 1 min	72°C, 5 min	35	72°C, 7 min
TERM 13	94°C, 1 min	38°C, 1 min	72°C, 6 min	5	
	94°C, 1 min	50°C, 1 min	72°C, 6 min	30	72°C, 10 min
TerminiL	94°C, 1 min	35°C, 1 min	72°C, 6 min	5	
	94°C, 1 min	54°C, 1 min	72°C, 6 min	35	72°C, 10 min

2.2.9 Primerdaten

Für die durchgeführten PCR- und RT-PCR Analysen wurden nachstehende Primer verwendet (Abb. 2.1, Tab. 2.2).

Sofern diese virussequenzspezifisch sind, ist deren Lage in Abb. 2.1 auf der jeweiligen RNA dargestellt. Die 5'-Biotin-Markierung ist in der Tabelle 2.2 nicht berücksichtigt, da sie keinen Einfluß auf die Tm des Primers nimmt.

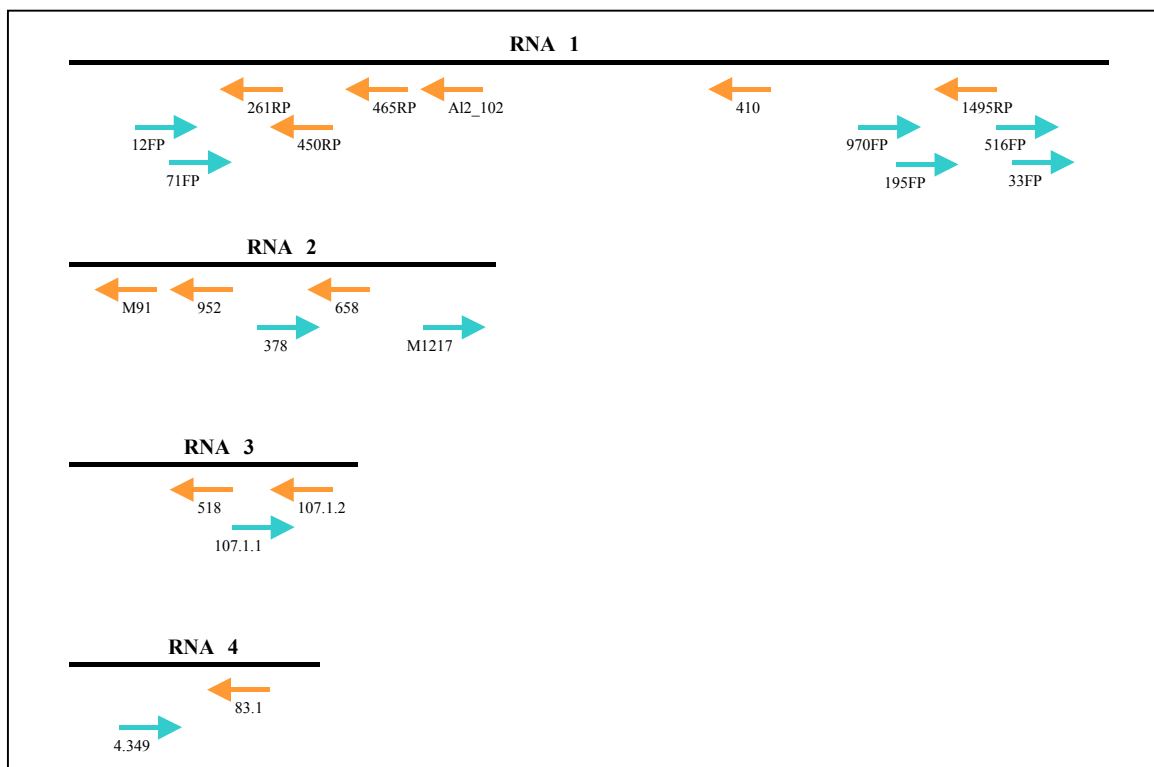


Abb.: Lage der verwendeten Primer auf den vier identifizierten kodierenden RNAs 1-4. Die türkismarkierten Primer sind homolog zu der RNA, die orange-markierten komplementär.

Tab. 2.2: Spezifische Daten der verwendeten Primer

	Sequenz [5' > 3']	Tm [°C]	Lage auf der RNA
4.349	TCA AAC TGC TCA CAA GGT AAT CAT	57,6	RNA 4, 349-372
12FP	ATA AGA AAG TTG TGG GTG TT	51,1	RNA 1, 566-587
33FP	TTG GTT GCT ATC TGT GCT CT	55,3	RNA 1, 6.645-6.664
71FP	CCT TTA CAC GCT ACA ATC TGA	55,9	RNA 1, 758-778
83.1	GGA ATT CAC AAC ATA AGC ACA AA	55,3	RNA 4, 1.005-1.027
107.1.1	GTC ATT AAT TGC TTT GAG ATG T	52,8	RNA 3, 1.200-1.221

107.1.2	GCT TAC TAT TCG GAA TTT ATG TA	53,5	RNA 3, 1.381-1.403
195FP	GAT TAT GCC CCA CAG TTG AG	57,3	RNA 1, 6.099-6.118
261RP	TGT TAG GTC ATC AGT GGA AT	53,2	RNA 1, 949-968
378	ATT AGA GAC ACA TTC ACA CAT	52,0	RNA 2, 1.280-1.301
410	CAT CGT CTA TAA CAT CTT CA	51,1	RNA 1, 4.394-4.013
450RP	TTA TGG TTT TTG TTA TTG GTA T	49,1	RNA 1, 1.137-1.158
465RP	GCT TGT TCT TGT TTA TTT TAC	50,1	RNA 1, 1.845-1.865
516FP	AAG CCA GTA TTG TGA CGA AGT	55,9	RNA 1, 6.612-6.633
518	CAC AAA GGG AAA TCA AAT AAA TCA	54,2	RNA 3, 1.124-1.147
658	AAT CAA TGT GTG GCA ACT GT	53,2	RNA 2, 1.560-1.579
952	GAA GAA GCA GCT AAA TCC ATC AT	57,1	RNA 2, 933-955
970FP	AAA CTA ATG CCA ACA ATG AAG	52,0	RNA 1, 5.643-5.663
1495RP	GTT CTT CCA TAC TCA TTC AC	53,2	RNA 1, 6.168-6.187
Al2_102	CTC CTT ATT TCA TCA GTG TTG	54,0	RNA 1, 2.675-2.695
(dG) Terminus	GGG GXG GGX GGG GAG TAG TG X = Inosin	65,5	
Linker- poly(dT)- Primer	GCG CGA ACA GAA AAC GGA AAT ACA (T) ₁₇ V - Wobbles	65,2	
Linker- Primer	GCG CGA ACA GAA AAC GGA AAT ACA	61,0	
M13 FP	GTA AAA CGA CGG CCA G	50,4	
M13 RP	CAG GAA ACA GCT ATG AC	50,4	
M 13RP - Linker	GTC ATA GCT GTT TCC TG	50,4	
M91	GAA ATC CAT CTG AAA CAA AGT CT	55,3	RNA 2, 727-249
M1217	TGC TGG CAT GAT TCG TAA AAC	55,9	RNA 2, 2.191-2.211
Myb- Linker	GGT GGC TCG TAT TTC TTC TTT A	56,5	
Myb	TAA AGA AGA AAT ACG AGC CAC C	56,5	
Myb- Linker- Oligo(dT)	GGT GGC TCG TAT TTC TTC TTT A (T) ₁₇ V - Wobbles	63,0	

Poly(dG)- Linker	GGT GGC TCG TAT TTC TTC TTT AGG GXX GGG XXG GGX XG X = Inosin	72,7	
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	53,2	
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	53,2	
Termini 11	CCG CAT CCA GTA GTG TTC T	56,7	RNA 1-4
Termini 11(5')	CCG CAT CCA GTA GTG AAC T	56,7	RNA 1-4
T13	ATC CAG TAG TGT TCT CC	50,4	RNA 1-4
T13(5')	ATC CAG TAG TGA ACT CC	50,4	RNA 1-4

2.2.10 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte über ein TA-Cloning.

Die Durchführung erfolgte weitgehend nach Herstellerangaben unter Verwendung folgender Kits:

TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen, Karlsruhe)

pGEM[®] T Easy Vector System (Promega, Mannheim)

Für die Ligation wurde jedoch nur 0,5 µl Vektor anstatt 1,0 µl eingesetzt.

Für die Transformation wurden 100 µl chemisch kompetente Zellen des *E. coli* Stammes DH 5α verwendet (2.2.11). Die Anzucht der transformierten Bakterien erfolgte nach der 'TOPO TA Cloning[®]'- Anleitung auf Agar-Platten, die mit jeweils 40 µl einer 40 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal)-Stammlsg. und 40 µl 100 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) beschichtet waren.

2.2.11 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte in Anlehnung an Inoue *et al.* (1990). Es wurde der *E. coli* Stamm DH 5α verwendet.

Bakterien aus einer Dauerkultur (50 % Glycerol, Lagerung bei –70°C) auf LBIII-Agar bei 37°C anziehen



10-12 große Kolonien in 250 ml SOC (0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) in einem 2 l Kolben bei 200-250 rpm und 37°C bis zu einer Dichte von etwa $\text{Abs}_{\lambda 600} = 0,75$ wachsen lassen.



10 min auf Eis inkubieren



10 min bei 4°C und 4.700 rpm zentrifugieren (Centrikon H-401, Kontron)



Sediment in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM Hepes pH 6,7, 55 mM MnCl₂, 250 mM KCl) resuspendieren



10 min auf Eis inkubieren



10 min bei 4°C und 4.700 rpm zentrifugieren (Centrikon H-401, Kontron)



Sediment vorsichtig in 20 ml TB resuspendieren



Unter leichtem Rühren 7 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (f.c.) hinzufügen



10 min auf Eis inkubieren



aliquotieren à 100 µl und bei -70°C lagern

2.2.12 Überprüfung der rekombinanten Plasmide mit vektorspezifischen Primern

In einer PCR mit vektorspezifischen M13-Primern (2.2.9) wurden die Klone auf die Größe ihres Inserts hin überprüft. Hierfür wurden die einzelnen Kolonien nach Überimpfen auf eine 'Masterplate' (LBIII-Ampicillin (150 µg/ml)-Agar) direkt in einen 25 µl PCR-Ansatz überführt (2.2.8). Es wurde das PCR-Programm M13 verwendet (2.2.8).

Für den Vektor pCR 4 TOPO wurden anstelle der M13-Primer Oligonucleotide verwendet, die sich spezifisch an die Bindungsstellen der T3- und der T7-RNA-Polymerase anlagern können (T3, T7, 2.2.9). Die PCR wurde nach dem Programm A54 EX3 durchgeführt (2.2.8).

10 µl des Reaktionsansatzes wurden im nativen Agarosegel aufgetrennt (2.2.2.2).

2.2.13 Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA

Zur Größenermittlung und Mengenabschätzung der isolierten Plasmid-DNA (2.2.1.2) wurde diese mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert und anschließend in einem 1 %igen Agarosegel analysiert.

1 µl der Plasmid-Lösung wurde in einem 20 µl-Ansatz mit 2 µl 10 x Reaktionspuffer und 10 U Restriktionsenzym bei dem vom Hersteller angegebenen Temperaturoptimum 1 h lang inkubiert. 10 µl des Ansatzes wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.2.2).

Zur Linearisierung der rekombinanten Vektoren pCR 2.1 TOPO, pCR 4 TOPO und pGEM T-Easy wurden standardmäßig die Enzyme HindIII, NotI bzw. PstI verwendet.

2.2.14 Sequenzierung der rekombinanten Plasmide

Die Sequenzreaktion wurde im Mastercycler Gradient (Eppendorf) unter Verwendung des 'Big Dye-Terminator-Kits' (Applied Biosystems) durchgeführt.

In einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurden standardmäßig ca. 500 ng Plasmid-DNA, 2 µl Big Dye, 6 µl 2,5 x Puffer (PE Biosystem) sowie 15 pmol Primer (vektorspezifische M13-Primer) eingesetzt. Die Sequenzreaktion wurde im Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf) unter Verwendung des Programms BIG DYE (2.2.8) durchgeführt.

Im Anschluss wurden die Ansätze bei Raumtemperatur mit 45 µl Ethanol absolut bei 13.000 rpm für 20 min sedimentiert (Centrifuge 5402, Eppendorf) und im 'Speed Vac. Concentrator' (Savant) 2 min getrocknet.

Der Gellauf sowie die Auswertung erfolgte im Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurologie der Universität Hamburg unter Verwendung des ABI-Sequenator 377 (Applied Biosystems).

2.2.15 Computerauswertung (Sequenz- und Proteinanalysen)

Sämtliche Datenbankrecherchen wurden unter Verwendung der Datenbank BLAST des NCBI vorgenommen.

Für Sequenzanalysen (Editing, Homologieabgleich, Translation) sowie Primerselektion und Proteinanalysen wurde die Software Lasergene, DNASTar, verwendet.

Die Identifizierung von Transmembranhelices, putativen Prozessierungs- und Glycosylierungsstellen sowie von Signalpeptiden in Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe der Programme TMHMM v.2.0, SignalP v.1.1, iPSORT Prediction, TargetP und NetNGlyc v.1.0 (alle über www.expasy.org).

2.2.16 Anreicherung von viralen Nucleocapsiden

Aufgrund der ersten Sequenzhinweise konnte eine Verwandtschaft des Virus der Eberesche mit den Tospoviren, *Bunyaviridae*, aufgezeigt werden. Zur Anreicherung von Nucleocapsiden bzw. viraler RNA wurde daher eine Aufarbeitungsmethode verwendet, die 1998 von Roggero *et al.* speziell zur Isolierung von Viren dieses Genus entwickelt wurde.

20 g Blattmaterial in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerkleinern



Pulver in 140 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 20 mM Na₂SO₃, 10 mM Diethyldithiocarbonsäure (DIECA), 2 % PVP-40) unter Verwendung eines Ultra Turrax (Janke und Kunkel, IKA-Werk) auf Eis homogenisieren



10 min bei 3.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Minifuge GL, Heraeus Christ)



Überstand mit 2 % Triton X-100 versetzen und 30 min auf Eis rühren



30 min bei 40.000 rpm und 4°C ultrazentrifugieren (L7-55 Ultrazentrifuge, Beckmann)



Sediment in 40 ml Viruspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,9, 5 mM EDTA, 20 mM Na₂SO₃, 10 mM DIECA, 1,5 % Triton X-100) aufnehmen und 30 min auf Eis rühren



10 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Centrikon H-401, Kontron)



jeweils 10 ml Überstand auf 4 ml einer 30 %igen Sucrose-Lsg. geben



90 min 28.000 rpm und 4°C ultrazentrifugieren (L7-55 Ultrazentrifuge, Beckmann)



nucleocapsidhaltiges Sediment in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,9, 1 mM EDTA) aufnehmen



5 min 10.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Centrifuge 5402, Eppendorf)



Überstand bei -20°C lagern

Zur Trennung von Nukleinsäure (vRNA) und Nucleocapsidprotein wurde der Überstand zunächst mit 1 % SDS (f.c.) versetzt und anschließend mit Phenol/Chloroform (2.2.3) extrahiert. Die vRNA wurde dann aus der wässrigen Phase über Nacht bei -20°C gefällt (2.2.4), in 30 μl ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert. Zur qualitativen Überprüfung wurde die vRNA in einem 1,5 %igen denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.2.1).

2.2.17 Anreicherung von Viruspartikeln

Neben der Isolierung von Nucleocapsiden, wurde eine Anreicherung von Viruspartikeln aus Ebereschblättern nach einem Protokoll für Tospoviren (Kikkert *et al.*, 1997) durchgeführt.

100 g Blattmaterial in 300 ml kaltem Extraktionspuffer (10 mM Na₂SO₃, 50 mM Na₂HPO₄, 50mM NaH₂PO₄, pH 7,0) mit einem Waring Blender mit fünf bis zehn kurzen Impulsen bei hoher Stufe zerkleinern



Homogenat durch Gaze filtrieren



15 min bei 9.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Centrikon H-401, Kontron)



Sediment in 100 ml 10 mM Na₂SO₃ vorsichtig resuspendieren und für 30 min im Eisbad rühren



15 min bei 9.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Centrikon H-401, Kontron)



Überstand abnehmen und für 30 min bei 38.000 rpm und 4°C ultrazentrifugieren (L7-55 Ultrazentrifuge, Beckmann) zentrifugieren



Sediment in 5 ml 10 mM Na₂SO₃ aufnehmen und jeweils 2,5 ml auf einen 10 – 40 % Sucrose-Gradienten schichten; 45 min bei 25.000 rpm und 4°C ultrazentrifugieren (L7-55 Ultrazentrifuge, Beckmann)



lichtbrechende Zone vorsichtig abnehmen, 1:1 in 10 mM Na₂SO₃ verdünnen und für 1 h bei 38.000 rpm und 4°C sedimentieren (L7-55 Ultrazentrifuge, Beckmann)



Sediment in 150 µl ddH₂O aufnehmen und bei 4°C lagern

Die Proteine der Fraktion wurden in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) (2.2.18) analysiert. Die hierin enthaltene vRNA wurde mittels RT-PCR mit diagnostischen Primern (3.10) überprüft.

2.2.18 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen - SDS-PAGE

2.2.18.1 Herstellung des Gels und Elektrophorese

Die angereicherten Nucleocapside bzw. deren Proteine wurden in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gel aufgetrennt.

Für ein Minigel (8 x 5 cm, 1,5 mm dick) wurde zunächst ein 15 %iges Trenngel gegossen:

5,0 ml	30 % PAA (37,5:1)
2,5 ml	Trenngelpuffer (1,5 M Tris, 8 mM EDTA, 0,4 % SDS, pH 8,8)
2,4 ml	ddH ₂ O
10 µl	Temed
100 µl	10 % Ammoniumpersulfat (APS)

Dieses wurde mit Isopropanol vorsichtig überschichtet um eine ebene Oberkante zu erhalten.

Nach Polymerisation des Gels (ca. 20 min) wurde das Isopropanol abgenommen, die Gelkante mit H₂O gespült und die Wasserreste vorsichtig mit einem weichen, staubfreien Tuch entfernt.

Anschließend wurde ein 4,5 %iges Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt.

0,75 ml	30 % PAA (37,5:1)
0,5 ml	Sammelgelpuffer (625 mM Tris, 20 mM EDTA, 1 % SDS, pH 6,8)
3,75 ml	ddH ₂ O
5 µl	Temed
50 µl	10 % APS

Nach Polymerisation des Gels wurde dieses in die mit Laufpuffer (3 g Tris, 14 g Glycin, 1 g SDS ad 1.000 ml ddH₂O, mehrfach verwendbar) gefüllte Kammer eingesetzt, der Kamm vorsichtig entfernt und die Taschen von Gelresten gereinigt.

Die Proben wurden dann mit 2 x Probenpuffer (Lämmli; 20% Sammelgelpuffer, 20 % β-Mercaptoethanol, 25 % Sucrose-Bromphenolblau (60 % Sucrose, 0,5 % Bromphenolblau, 2 % SDS)) versetzt und zur Denaturierung für 5 min auf 95°C erhitzt.

Das Sammeln der Proben erfolgte bei 10 mA, der Probenlauf bei Erreichen des Trenngels bei 15 mA.

Die Proteine der in der Viruspartikel-Anreicherung erhaltenen lichtbrechenden Fraktion wurden in einem 12 %igen SDS-PAA-Gel analysiert. Die Auftrennung von Proteinen des Pflanzenrohextraktes erfolgte in Gelen mit einem Gradienten von 8-16 % oder 10-12 %. Der Gradient wurde unter Verwendung eines Gradientenmischers (Hölzel, München) hergestellt.

2.2.18.2 Silber-Färbung

Die SDS-PAA-Gele wurden, sofern sie nicht der Western Blot Analyse dienten, einer hochsensitiven Silber-Färbung unterzogen. Das Protokoll basiert auf dem Verfahren von Heukeshoven und Dernick (1988).

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln durchgeführt.

Fixierung über Nacht in 30 % Ethanol, 10 % Eisessig

⇓

für 10 min in Inkubationslösung (30 % Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,2 % Glutaraldehyd-Lsg., 13 mM Natriumthiosulfat) überführen

⇓

4 x 3 min in ddH₂O waschen

⇓

10 min in Färbelsg. (6 mM AgNO₃, 0,06 % Formaldehyd) inkubieren.

⇓

kurz in Entwickler (250 mM Na₂CO₃, 0,03 % Formaldehyd) schwenken

⇓

Zugabe von frischem Entwickler bis die Banden sichtbar werden, bei Bildung von einem Silberschleier den Entwickler erneut wechseln

⇓

Reaktion mit 50 mM EDTA, 500 mM Natriumacetat, pH 7,4 über Nacht stoppen

⇓

Dokumentation des Gels unter Durchlicht in einer Videodokumentationsanlage (GelVue UV Transilluminator, Syngene) oder mit der Digitalkamera (Olympus C 4000)

Eine eventuelle Hintergrundfärbung wurde mit dem Entfärber 'Farmers Reducer' (0,2 % Natriumthiosulfat, 0,01 % Kaliumhexacyanoferrat (III)) abgeschwächt und die Reaktion

anschließend mit viel Leitungswasser gestoppt. Bei Bedarf wurde das Gel erneut mit der Silberfärbelsg. behandelt.

2.2.19 Western-Blot-Analysen

Für die Western-Blot-Analysen wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (2.2.18.1) im Elektroblob-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond-C extra, Amersham) transferiert.

2.2.19.1 Spot-Blot zur Überprüfung des Antiserums gegen das putative G1

Um die Spezifität sowie die Konzentration des polyklonalen Antikörper gegen das vermutliche Glycoprotein G1 zu überprüfen, wurde eine Verdünnungsreihe folgender Mengen des synthetisierten Peptids auf eine Nitrocellulosemembran aufgegeben:

10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 10 pg

Im Anschluss wurde die Membran detektiert (2.2.19.2).

2.2.19.2 Immunodetektion

Die Detektion erfolgte nach einem colorimetrischen Verfahren unter Verwendung eines sek. Antikörpers, konjugiert mit einer alkalischen Phosphatase (Anti-Rabbit-AP, Promega) sowie dem Substrat Nitroblautetrazolium (NBT)/5-Brom-4-chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP).

Membran 2 x 5 min in 1 x TBST-Puffer (0,05 M Tris-HCl pH 8,0, 0,15 M NaCl, 0,1 % Tween)

waschen

⇓

1 h in 5 % Blocking-Lösung (5 % w/v Magermilchpulver in 1 x TBST) inkubieren

⇓

1 h mit primärem Antikörper (verdünnt 1/2.000 – 1/4.000 in Blocking-Lösung) inkubieren

⇓

3 x 10 min in 1 x TBST waschen

⇓

1 h mit sekundärem Antikörper (verdünnt 1/7.500 in Blocking-Lösung) inkubieren

⇓

3 x 10 min in 1 x TBST waschen



Membran mit 2.5 µl/cm² Färbelösung behandeln: 1 ml alkal. Phosphatase-Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 9,0, 0,15 M NaCl, 1 mM MgCl₂) + 6.6 µl NBT (50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid) + 3,3 µl BCIP (50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid)

Nach Erzielen der gewünschten Farbtintensität wurde die Membran mit reichlich Wasser gespült und in Folie eingeschweißt bei 4°C aufbewahrt.

2.2.19.3 Herstellung von Proteinrohextrakten

Für die Western-Blot-Analysen wurden zunächst Gesamtproteinextrakte aus Blatt- und Rindengewebe von Ebereschen sowie aus Blättern krautiger Pflanzen (*Abutilon spec.*, *Euphorbia pulcherrima*) hergestellt.

Zur Extraktion wurde ein Puffer eingesetzt, der zur Isolierung von Tospoviruspartikeln aus krautigen Wirtspflanzen verwendet wird (Kikkert *et al.*, 1997). Aufgrund des hohen Gehalts an polyphenolischen Verbindungen in Ebereschen wurde dem Puffer 1 % PVP (w/v) zugesetzt.

Extraktionspuffer: 50 mM Na₂HPO₄
 50 mM NaH₂PO₄
 10 mM Na₂SO₃
 1 % (w/v) PVP pH 7,0, Lagerung bei 4°C

Ca. 2 g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerkleinert und in 4 ml Extraktionspuffer / g Frischgewicht homogenisiert. Nach der Zentrifugation bei 5.000 rpm für 10 min bei 4°C (Minifuge GL, Heraeus Christ) wurde der Überstand abgenommen und bis zur SDS-PAGE (2.2.18) bei –20°C gelagert.

2.2.19.4 Transfer von im SDS-Gel aufgetrennten Proteinen

Der Transfer der aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Elektrobplot in einer 'BIORAD MINI 2D'-Apparatur (Biorad) nach Anleitung des Herstellers.

Vor dem Zusammenbau des Blots wurde das Gel für 1 h und die Membran für 15 min in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % v/v Methanol, pH 8,3) äquilibriert. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4°C und 40 mA.

2.2.20 Detektion von Glykoproteinen

Die Detektion von Glykoproteinen erfolgte unter Verwendung des 'Dig Glycan Detection Kits' (Roche). Der Pflanzenrohextrakt wurde hierfür zunächst in einer SDS-PAGE mit einem Gradienten von 8-16 % PAA aufgetrennt (2.2.18.1) und die Proteine anschließend mittels Elektroblob auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (2.2.19.4).

Die Detektion der glykosylierten Proteine erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3. Ergebnisse

3.1 Virusverdächtige Symptome an erkrankten Ebereschen

Als charakteristische Krankheitssymptome wurden an Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) eine chlorotische Scheckung der Blätter sowie chlorotische Ringflecken beobachtet (Abb. 3.1). Die unterschiedlichen Blattsymptome traten meist in unregelmäßiger Verteilung auf, oft zeigten weite Bereiche des Baumes keine erkennbaren Veränderungen. Die Scheckungen und Ringflecken wurden z. T. unabhängig voneinander, aber auch zusammen an einem Baum oder sogar an einer Blattfieder gefunden.

Häufig konnte eine Degradation des erkrankten Baumes über einen Zeitraum von mehreren Jahren beobachtet werden. In diesem Zusammenhang wurde auch eine erhöhte Anfälligkeit der erkrankten Pflanzen gegenüber anderen phytopathogenen Organismen festgestellt. So ist eine Infektion mit Rostpilzen oder der Befall mit Gallmilben weit verbreitet (Abb. 3.2).

Blüten und Früchte zeigten hingegen keine erkennbaren Krankheitssymptome.



Abb 3.1: Blattsymptome erkrankter Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.). A: Chlorotische Scheckung; B: Chlorotische Ringflecken



Abb 3.2: Gallmilbenbefall an Ebereschen. Gallenbildung auf der Unterseite (links) eines Fiederblattes.

3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Blättern und Rinde der Eberesche

Voraussetzung für die Klonierung von cDNA-Enden und full-length cDNA ist die Verwendung von qualitativ hochwertiger, reiner und nicht degradierter Gesamt-RNA.

Da die Eberesche eine sehr hohe Konzentration an Polysacchariden und phenolischen Verbindungen aufweist, wurde zunächst nach einer für diese Pflanze geeigneten Methode zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Blatt- und Rindengewebe gesucht.

3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA unter Verwendung von TRIzol® Reagent

Bei der Aufarbeitung von etwa 100 mg Blatt- oder Rindenmaterial konnte unter Verwendung von TRIzol® Reagent (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers keine Gesamt-RNA aus Ebereschen isoliert werden.

3.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA nach Wang *et al.* (2000)

Die Methode nach Wang *et al.* (2000) wurde für die Gesamt-RNA Isolierung aus holzigen Zweigen und Nadeln von Fichten etabliert.

Für die Aufarbeitung wurde jeweils etwa 4 g pflanzliches Gewebe verwendet.

Mit dem Verfahren konnte durchschnittlich 16-25 µg Gesamt-RNA / g Frischgewicht aus Ebereschengewebe gewonnen werden.

Das Verhältnis $Abs_{\lambda 260}/Abs_{\lambda 280}$ zur Bestimmung der Reinheit von 1,637 bis 1,720 wich deutlich von dem Optimalwert von 2,000 ab.

Die Analyse im 1,5 %igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel war nicht zufriedenstellend, die Banden der ribosomalen RNA waren diffus (Abb. 3.3).

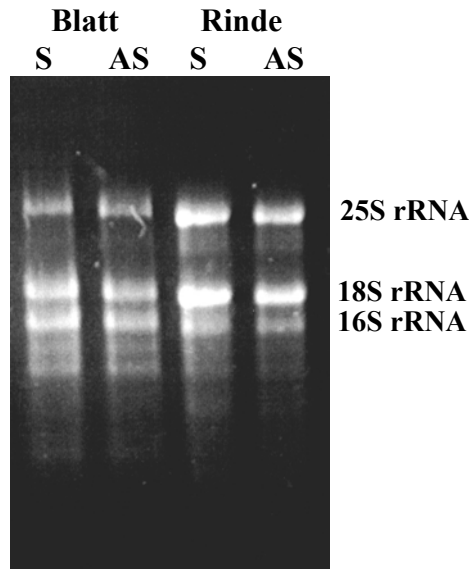


Abb. 3.3: Elektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA aus Blättern und Rinde von Ebereschen in einem 1,5 %igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel. Die Aufarbeitung wurde in Anlehnung an Wang *et al.* (2000) durchgeführt. S: Ebereschen mit Symptomen, AS: Ebereschen ohne erkennbare Symptome. Die pro Spur aufgetragene Menge entspricht 1/5 der aus etwa 100 mg Gewebe isolierten Gesamt-RNA.

3.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA modifiziert nach Boom *et al.* (1990)

Die Isolierung von Nukleinsäuren mit Silica-Partikeln ist ein gängiges Verfahren und eignet sich sowohl für die DNA- als auch für Gesamt-RNA-Extraktion.

Die ursprüngliche Methode von Boom *et al.* (1990), die der Isolierung von Nukleinsäuren aus tierischen Seren und Urin diente, wurde jedoch durch Zusatz von 2,5 % PVP zu dem Extraktionspuffer modifiziert. Zudem wurde das Verfahren durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion ergänzt.

Für die Aufarbeitung wurden jeweils ca. 100 mg Pflanzenmaterial eingesetzt.

Pro g Frischgewicht konnten im Durchschnitt 200-400 µg Gesamt-RNA aus Blättern und Rinde von Ebereschen isoliert werden. Dies entsprach in etwa der zehnfachen Menge, die mit dem Verfahren von Wang *et al.* (2000) erhalten wurde (3.2.2).

Das Verhältnis $\text{Abs}_{\lambda 260} / \text{Abs}_{\lambda 280}$ von 1,716 – 2,103 wies zudem auf eine höhere Reinheit der Proben hin (Optimum: 2,000).

Die Auftrennung in einem 1,5 %igen denaturierenden Agarosegel zeigte deutlich distinkte Banden ribosomaler RNA (Abb. 3.4).

Die Methode wurde anschließend für sämtliche RT-PCR-Analysen, insbesondere aber auch für die Etablierung einer geeigneten RACE-Verfahren (3.3), die als Ausgangsmaterial möglichst reine, nichtdenaturierte Gesamt-RNA voraussetzt, verwendet.

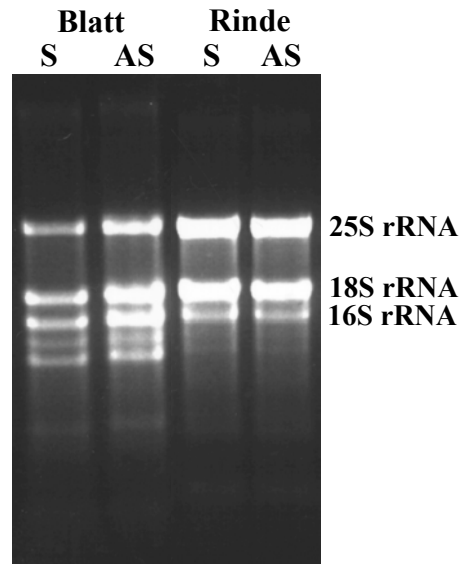


Abb. 3.4: Elektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA aus Blättern und Rinde von Ebereschen in einem 1,5 %igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel. Die Aufarbeitung wurde in Anlehnung an Boom *et al.* (1990) durchgeführt. S: Ebereschen mit Symptomen, AS: Ebereschen ohne erkennbare Symptome. Die pro Spur aufgetragene Menge entspricht etwa 1/8 der aus ca. 100 mg Gewebe isolierten Gesamt-RNA.

3.3 Etablierung eines RACE-Verfahrens

Um cDNA-Enden oder full-length-cDNAs zu amplifizieren eignet sich die Methode der RACE. Grundsätzliche Voraussetzung ist hierbei die Kenntnis über einen zumindest kurzen Abschnitt der Sequenz, um sequenzspezifische Primer (SSP) ableiten zu können.

So wurden von der 3,7 kb langen putativ viralen Ausgangssequenz (AY563040) von Benthack (2001), die auf Aminosäureebene Homologien zur RNA-abhängigen-RNA-Polymerase (RdRP) verschiedener Viren der Familie *Bunyaviridae* gezeigt hat, sowohl in 3'- als auch in 5'-Richtung Primer synthetisiert (Abb. 3.5). Als Template für die RACE-Analysen wurde Gesamt-RNA aus Ebereschenblattgewebe verwendet.

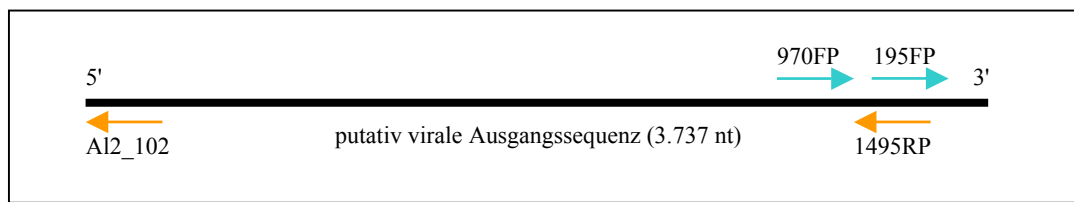


Abb. 3.5: Übersicht über die Lage der für die 3'-RACE sowie die 5'-RACE-Analysen nach den Methoden 1 und 2 verwendeten Primer auf der putativ viralen Ausgangssequenz von 3,7kb.

3.3.1 3'-RACE zur Untersuchung auf Vorhandensein eines 'poly(A)-tails' im Virusgenom

Um zu überprüfen, ob die putativ virale RNA bzw. ihre Transkripte wie bei den Phytorhabdoviren, die wie die *Bunyaviridae* ein ss(-)RNA-Genom besitzen, polyadenyliert ist, wurde zunächst eine Erststrangsynthese unter Verwendung des Myb-Linker-Oligo(dT)-Primers durchgeführt. In der anschließenden RT-PCR wurde dieser Primer in Kombination mit dem SSP 970FP eingesetzt.

Die RACE ergab keine spezifischen Amplifikationsprodukte (Abb. 3.6, Spur S). Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigte lediglich einen heterogenen Schmier, eine distinkte Bande war nicht zu erkennen. Auch die Positivkontrolle K2, bei der der mit dem Oligo(dT)-Primer synthetisierte Erststrang in die PCR unter Verwendung der spezifischen Primerkombination 970FP/1495RP eingesetzt wurde, ergab kein Produkt, was darauf schließen lässt, dass mit dem Myb-Linker-Oligo(dT)-Primer kein spezifischer cDNA-Erststrang synthetisiert wurde. Die zweite Kontrolle K1, bei der hingegen der SSP 1495RP als Erststrangprimer eingesetzt wurde, zeigte jedoch in der PCR unter Verwendung der gleichen Primerkombination eindeutig das Vorhandensein virusspezifischer RNA in der Probe.

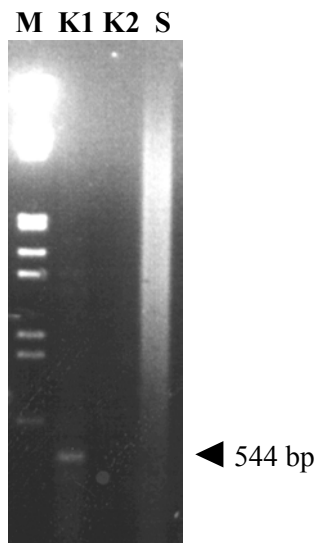


Abb. 3.6: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der 3'-RACE zur Überprüfung der putativ viralen Ausgangssequenz auf Polyadenylierung erhaltenen Produkte. Die Reverse Transkription wurde mit Gesamt-RNA aus symptomzeigenden Ebereschen (S) unter Verwendung des Primers Myb-Linker-Oligo(dT) durchgeführt. In der anschließenden RT-PCR wurde dieser durch den SSP 970FP ergänzt. **M:** Molecular Weight Marker 3 (MBI), **K1:** Primerkombination 970FP/1495RP mit dem Erststrangprimer 1495RP, **K2:** Primerkombination 970FP/1495RP mit dem Erststrangprimer Myb-Linker-Oligo(dT).

3.3.2 RACE – Methode 1

Ausgehend von DNase behandelte Gesamt-RNA wurde zunächst eine Reverse Transkription unter Verwendung der in unterschiedlicher Orientierung bindenden sequenzspezifischen Primer (SSP) 970FP und 1495RP durchgeführt. Die neusynthetisierte Erststrang-cDNA wurde anschließend mit RNase A behandelt und polyadenyliert. In den darauffolgenden zwei RT-PCR-Reaktionen (RT-PCR 1 mit dem Erststrangprimer und dem Linker-poly(dT)-Primer, RT-PCR 2 mit den 'nested'-SSP 195FP und Al2_102 und dem Linker Primer) konnte jedoch kein spezifisches Produkt amplifiziert werden (Abb. 3.8, Spuren 1-4), die gelelektrophoretische Auftrennung zeigt in allen Proben einen deutlichen hochmolekularen Schmier. Die Positivkontrolle wies hingegen die erwartete Bande von 544 bp auf (Abb. 3.8, Spur K+).

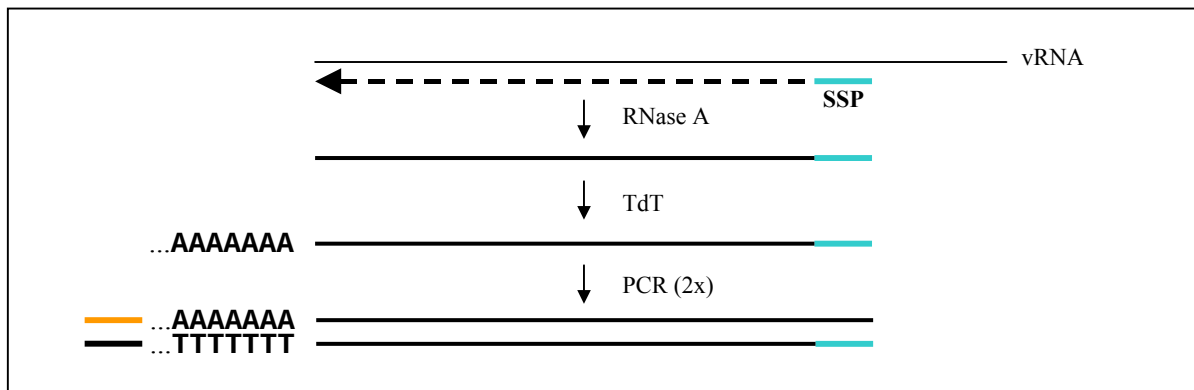


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der RACE nach Methode 1.

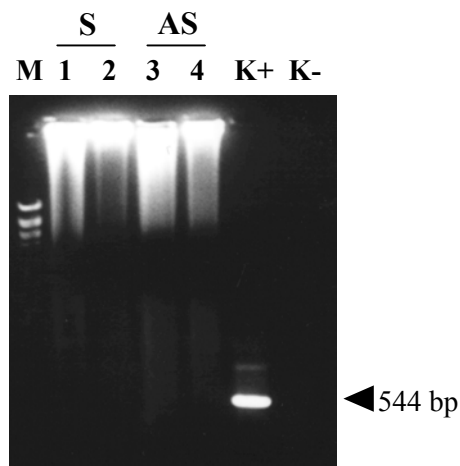


Abb. 3.8: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der RACE nach Methode 1 zur Amplifikation der Enden der putativ viralen RNA erhaltenen Produkte. Für die RACE wurde Gesamt-RNA aus Blättern symptomatischer (S) und asymptomatischer Ebereschen (AS) verwendet und mit den SSP 970FP und 1495RP revers transkribiert. M: DNA Molecular Weight Marker 15 (MBI), Spuren 1 und 3: Erststrangprimer 970RP, Spuren 2 und 4: Erststrangprimer 1495RP, K+: symptomatische Eberesche, Erststrangprimer 970FP, PCR-Primerkombination 970FP/1495RP, K-: Wasserkontrolle.

Um eine effektivere und gezieltere Polyadenylierung zu erreichen, wurde die Methode 1 modifiziert. Die Reverse Transkription wurde daher mit den 5'-Biotin-markierten spezifischen Primern 970FP Bio und 1495RP Bio durchgeführt. Eine anschließende Anbindung an Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel (Roche) erlaubte die Entfernung unspezifischer, nicht revers transkribierter RNA sowie einen unkomplizierten Austausch der Pufferbedingungen für die folgende Polyadenylierung. Die nachstehende Abbildung 3.9 zeigt eine schematische Darstellung der modifizierten RACE nach Methode 1.

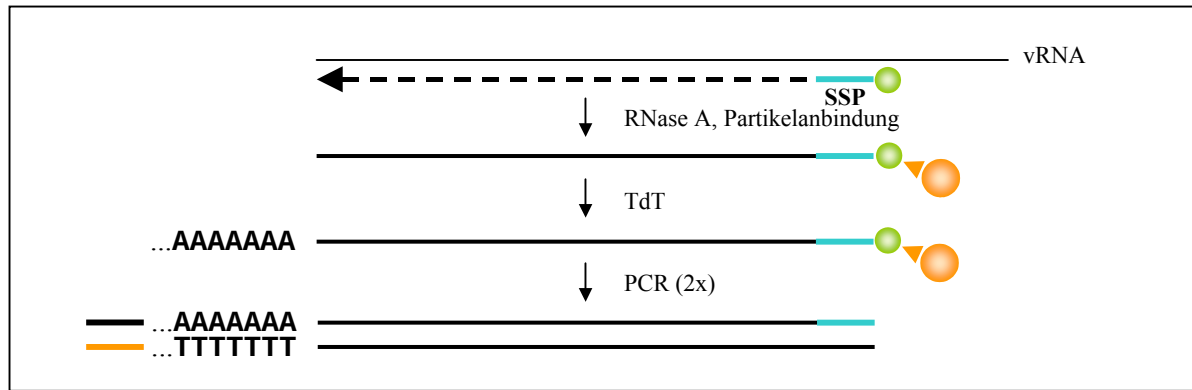


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der modifizierten RACE nach Methode 1.

Aber auch hier konnte nach den zwei RT-PCR-Reaktionen kein distinktes Amplifikationsprodukt erhalten werden, die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zeigte erneut einen heterogenen Schmier (Abb. 3.10, Spuren 1 und 2).

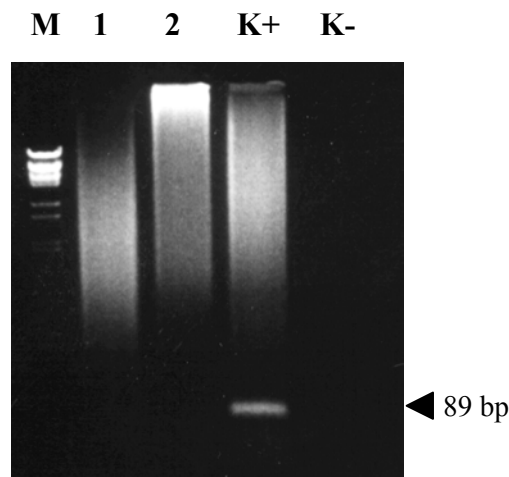


Abb. 3.10: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der modifizierten RACE nach Methode 1 zur Amplifikation der Enden der putativ viralen RNA erhaltenen Produkte. Für die RACE wurde Gesamt-RNA aus Blättern symptomatischer Eberesche verwendet. **M:** DNA Molecular Weight Marker 3 (MBI), **Spur 1:** Erststrangprimer 970FP Bio, **Spur 2:** Erststrangprimer 1495RP Bio, **K+:** Erststrangprimer 970FP, PCR-Primerkombination 195FP/1495RP, **K-:** Wasserkontrolle.

Die Probe, bei dem der Erststrangprimer 970FP Bio verwendet wurde (Abb. 3.10, Spur 1), wurde in den Vektor pCR 2.1 TOPO kloniert. Die Sequenzierung verschiedener Klone führte u.a. zu einem 962 nt langen Insert (V54 970.3), das durch die Überlappung von 224 nt mit der 3,7 kb langen Ausgangssequenz diese auf eine vorläufige Gesamtlänge von 4.204 nt vergrößerte (Abb. 3.11). 271 nt des anderen cDNA-Endes wurden jedoch als Teilsequenz der ribosomalen 16S rRNA identifiziert (Abb. 3.12).

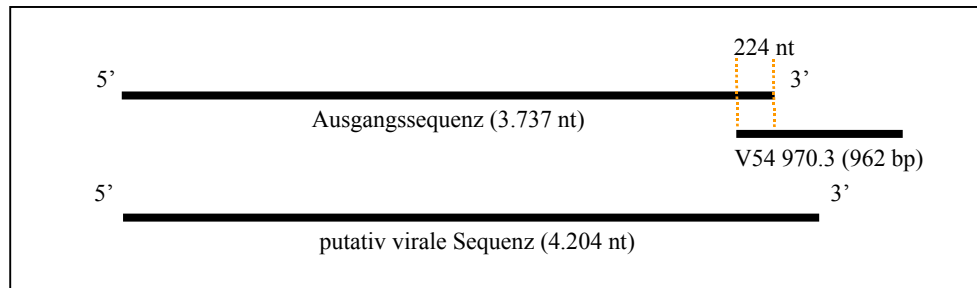


Abb. 3.11: Verlängerung der putativ viralen Ausgangssequenz von 3,7 kb durch den mit der modifizierten RACE nach Methode 1 erhaltenen Klon V54 970.3 auf eine Gesamtlänge von 4.204 nt.

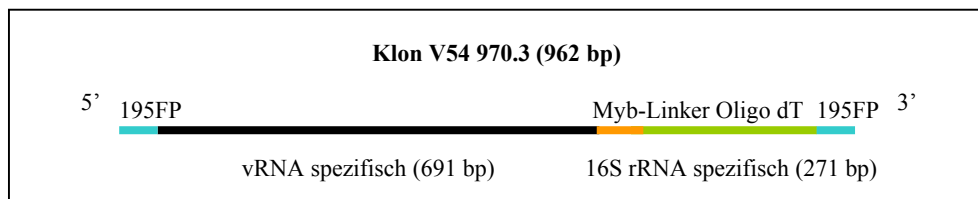


Abb. 3.12: Schematische Darstellung des in der modifizierten RACE nach Methode 1 erhaltenen Klon V54 970.3.

3.3.3 RACE – Methode 2

Da die Methode der Polyadenylierung der Erststrang-cDNA auch nach mehrfacher Anwendung nicht zur Amplifikation der Enden der putativ viralen RNA führte, wurde ein weiteres RACE-Verfahren etabliert (Abb. 3.13), bei dem der mit den Primern 970FP Bio und 1495RP Bio synthetisierte Erststrang zunächst durch die Ligation des phosphorylierten Myb-Linkers verlängert wurde. Im Anschluss erfolgte eine RT-PCR unter Verwendung der 'nested'-SSP 195FP bzw. A12_102 sowie des zum Linker komplementären Primers (Myb). Der Schritt der Anbindung an Streptavidin-Magnetpartikel (Roche) wurde beibehalten.

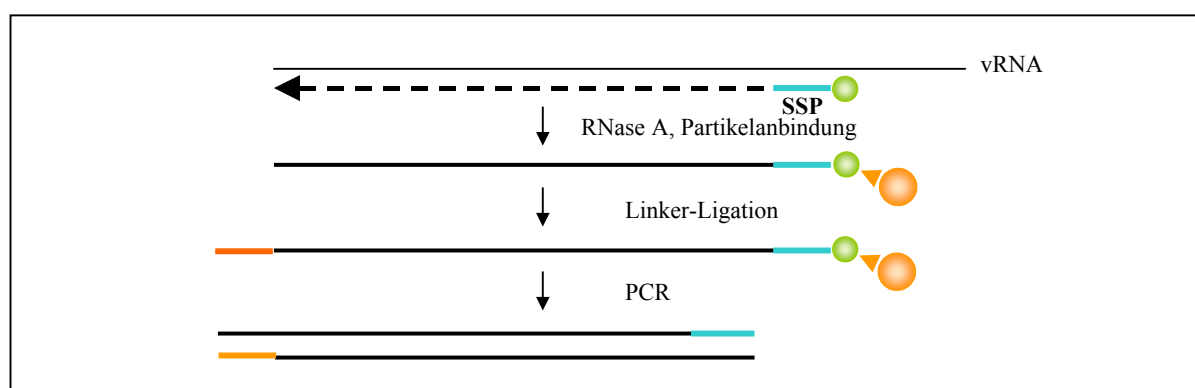


Abb. 3.13: Schematische Darstellung der RACE nach Methode 2

In der RT-PCR konnte unter Verwendung des 'nested'-SSP 195FP und des Primers Myb kein Amplifikationsprodukt erhalten werden (Abb. 3.14, Spur 1). Die Primerkombination Al2_102 und Myb resultierte hingegen in einem cDNA-Fragment der Größe von etwa 2.000 bp (Abb. 3.14, Spur 2). Die Klonierung in den Vektor pCR 4 TOPO und die anschließende Sequenzierung zeigte, dass der Primer Al2_102 unspezifisch an eine zweite Stelle auf der putativ viralen RNA gebunden hatte (Klon V60 1495.8). Die Überlappung mit der Ausgangssequenz bestätigt jedoch die Spezifität des Inserts (Abb. 3.15). Es ergab sich somit eine vorläufige Gesamtlänge der putativ viralen Sequenz von 6.041 nt.

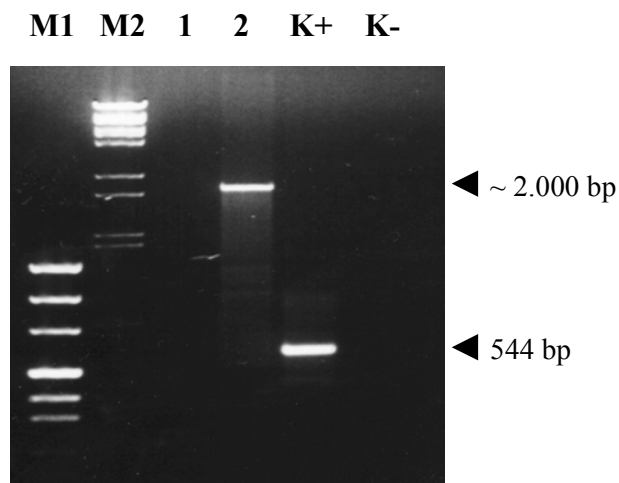


Abb. 3.14: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der RACE nach Methode 2 zur Amplifikation der Enden der putativ viralen RNA erhaltenen Produkte. Für die RACE wurde Gesamt-RNA aus Blättern symptomatischer Eberesche verwendet und mit den SSP 970FP Bio und 1495RP Bio revers transkribiert. An die Erststrang-cDNA wurde der Myb-Linker ligiert. **M1**: pUC Mix Marker (MBI) **M2**: DNA Molecular Weight Marker 15 (MBI), Spur **1**: Erststrangprimer 970FP Bio, 'nested'-PCR Primerkombination: 195FP/Myb, Spur **2**: Erststrangprimer 1495RP Bio, 'nested'-PCR-Primerkombination: Al2_102/Myb, **K+**: Erststrangprimer 970FP, PCR-Primerkombination 970FP/1495RP, **K-**: Wasserkontrolle.

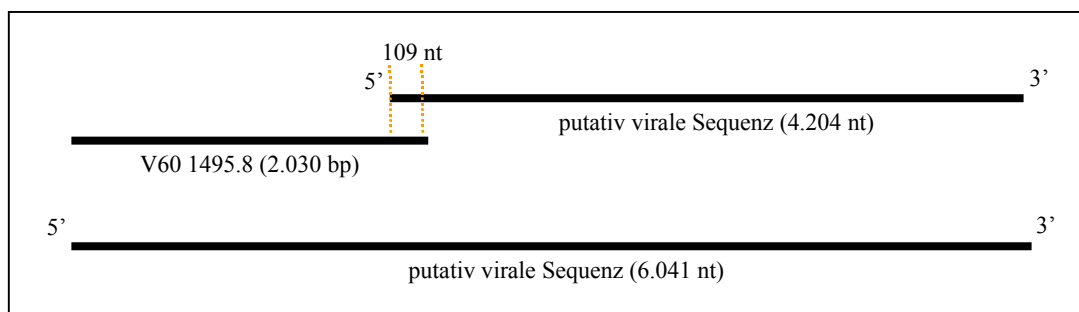


Abb. 3.15: Verlängerung der putativ viralen Sequenz durch den mit der RACE nach Methode 2 erhaltenen Klon V60 1495.8 auf eine Gesamtlänge von 6.041 nt.

3.3.4 SMARTTM-RACE

Da die Methoden 1 und 2 nur bedingt Amplifikationsprodukte hervorgebracht hatten und man nicht davon ausgehen kann, dass hiermit die tatsächlichen Enden der viralen cDNA erhalten werden konnten, wurden die Arbeiten mit dem 'SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit' der Firma Clontech fortgesetzt.

Zunächst wurden von der aus den ersten RACE-Analysen (3.3.2 und 3.3.3) hervorgegangenen putativ viralen Sequenz von 6.041 nt, bestehend aus der Consensussequenz der Klone V54 970.3, V60 1495.8 sowie der 3,7 kb langen Ausgangssequenz, am 5'-Ende drei weitere Primer (71FP, 261RP, 450RP) abgeleitet (Abb. 3.16).

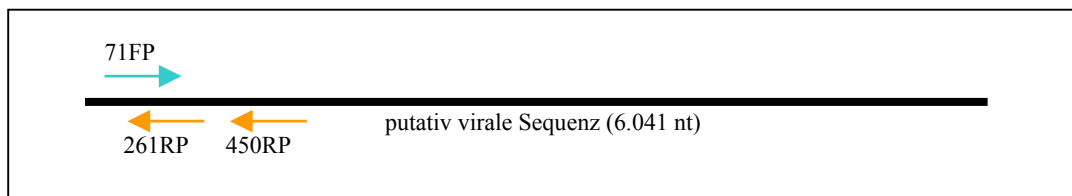


Abb. 3.16: Übersicht über die Lage der in der 'SMARTTM-RACE' verwendeten spezifischen Primer auf der putativ viralen Sequenz.

Die RACE wurde zunächst nur mit dem unter Verwendung des Primers 450RP hergestellten cDNA-Erststrang durchgeführt.

Für die Reverse Transkription wurde Gesamt-RNA erkrankten und symptomfreien Ebereschenblattgewebes mit dem SSP 450RP eingesetzt. In der anschließenden ersten PCR-Reaktion konnte in beiden Proben bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate eine schwache Bande von etwa 200 bp detektiert werden (Abb. 3.17, Spuren 1 und 2). In Probe 2 wurde zudem ein ebenfalls gering konzentriertes Fragment von etwa 650 bp erhalten. Nach einer zweiten PCR unter Verwendung von jeweils 2 und 5 µl aus der PCR 1 und dem nested Primer 261RP wurde hingegen in allen Proben nur noch ein starker, vorwiegend niedermolekularer, heterogener Schmier beobachtet (Abb. 3.17, Spuren 3-6). Von einer Klonierung der PCR-Produkte und dem Versuch der Amplifikation des 3'-Endes der putativ viralen RNA mit dieser Methode wurde abgesehen.

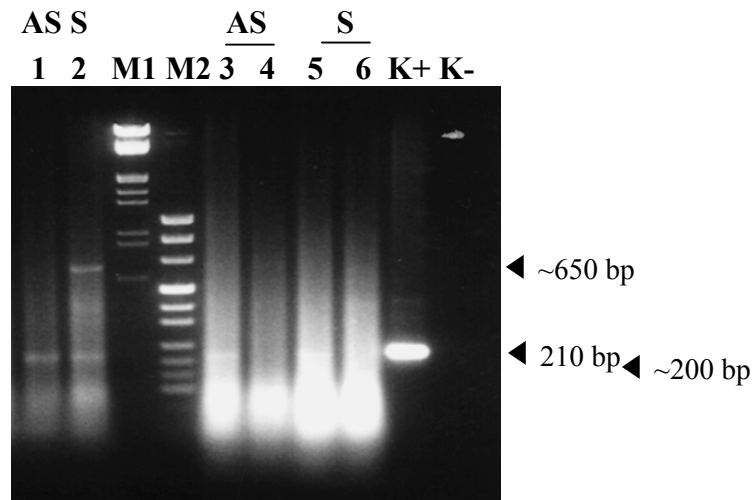


Abb. 3.17: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der 'SMARTTM-RACE' zur Amplifikation der Enden der putativ viralen RNA erhaltenen Produkte. Für die RACE wurde das 'SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit' der Firma Clontech verwendet. Die Reverse Transkription wurde unter Verwendung von Gesamt-RNA aus symptomatischen (S) und asymptomatischen (AS) Ebereschenblättern mit dem SSP 450RP durchgeführt. Als 'nested'-SSP für die zweite PCR-Reaktion wurde der Primer 261RP eingesetzt. **M1**: Molecular Weight Marker 3 (MBI), **M2**: pUC Mix Marker (MBI), Spuren **1** und **2**: PCR I mit dem SSP 450RP, Spuren **3** und **5**: PCR II mit 2 µl aus PCR I und dem SSP 261RP, Spuren **4** und **6**: PCR II mit 5 µl aus PCR I und dem SSP 261RP.

3.3.5 RACE – Methode 4

Da keine der zuvor angewendeten RACE-Verfahren zur Amplifizierung der Enden der putativ viralen RNA geführt hat, wurde ein weiteres Verfahren etabliert (Abb. 3.18). Die RACE wurde in Anlehnung an König (1997) optimiert. Im Wesentlichen basiert das Verfahren auf der modifizierten Methode 1 (3.3.2, Abb. 3.9), nur dass hier statt einer Polyadenylierung der Erststrang-cDNA die Anbindung eines 'poly(dC)-tails' erfolgte und statt zwei PCR-Reaktionen lediglich eine einzige 'nested'-PCR durchgeführt wurde.

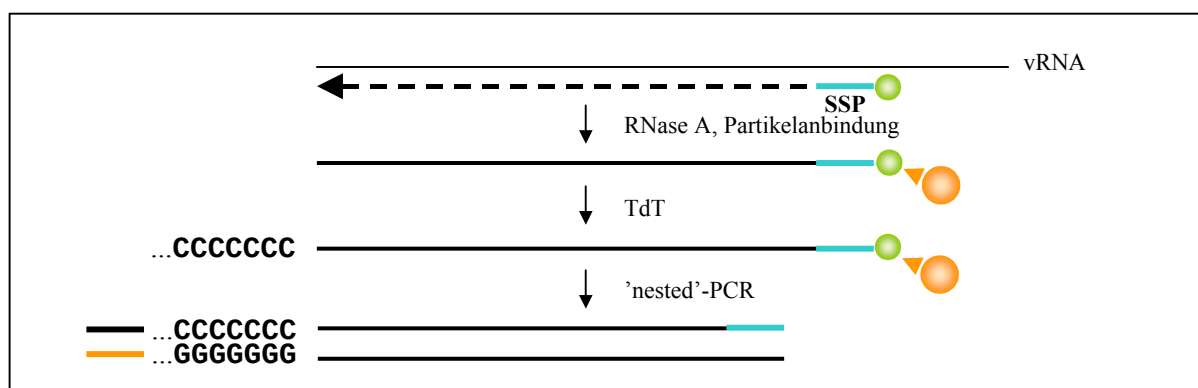


Abb. 3.18: Schematische Darstellung der RACE nach Methode 4.

Die Lage der verwendeten Primer auf der Consensussequenz von 6.041 nt, bestehend aus den zuvor erhaltenen Klonen V54 970.3, V60 1495.8 (3.3.2, 3.3.3) sowie der putativ viralen Ausgangssequenz von 3,7 kb, ist in der nachstehenden Abb. 3.19 dargestellt.

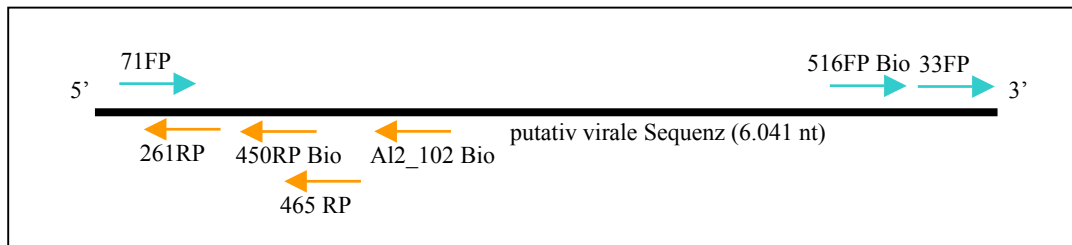


Abb. 3.19: Übersicht über die Lage der in den RACE-Analysen nach Methode 4 verwendeten spezifischen Primer auf der putativ viralen Sequenz.

Bei der RACE in Richtung 3'-Ende, ausgehend von dem mit 516FP Bio synthetisierten Erststrang, konnte in der 'nested'-PCR mit dem Primer 33FP ein Produkt von etwa 450 bp amplifiziert werden (Abb. 3.20, Spur 2). Die RACE in 5'-Richtung mit dem 'nested'-SSP 261RP, ausgehend von dem mit dem Primer 450RP Bio synthetisierten cDNA-Erststrang, ergab hingegen nur ein sehr schwaches Amplifikationsprodukt von etwa 1.000 bp (Abb. 3.20, Spur 1). Dieses ließ sich nicht erfolgreich klonieren. In der Wiederholung des Versuchs, konnte das cDNA-Fragment jedoch in höherer Konzentration erhalten und kloniert werden (Abb. 3.21, Spur 2).

Der Versuch, das 5'-Ende auch unter Verwendung des weiter in 3'-Richtung liegenden RT-Primers AL2_102 Bio, und somit mit einer wesentlich längeren Erststrang-cDNA, und dem 'nested'-Primer 465RP zu amplifizieren, führte zu keinem nennenswerten Produkt (Abb. 3.21, Spur 1). Von einer Klonierung der kleineren erhaltenen Fragmente wurde abgesehen.

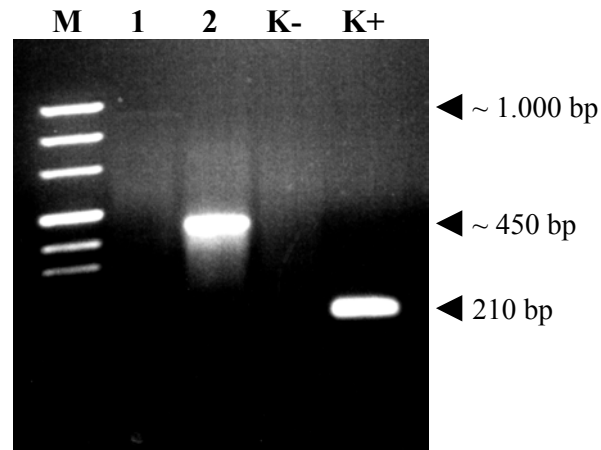


Abb. 3.20: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der RACE nach Methode 4 zur Amplifikation der Enden der putativ viralen RNA erhaltenen Produkte. Die Erststrangsynthese wurde unter Verwendung von Gesamt-RNA aus symptomatischen Ebereschen mit den 5'-Biotin-markierten Primern 450RP Bio (Spur 1) und 516FP Bio (Spur 2) durchgeführt. Die anschließende PCR erfolgte jeweils mit den 'nested'-Primern 261RP bzw. 33FP. **M:** pUC Mix Marker (MBI), **K-:** Wasserkontrolle, **K+:** Erststrangprimer 450RP Bio, PCR-Primerkombination: 261RP/71FP

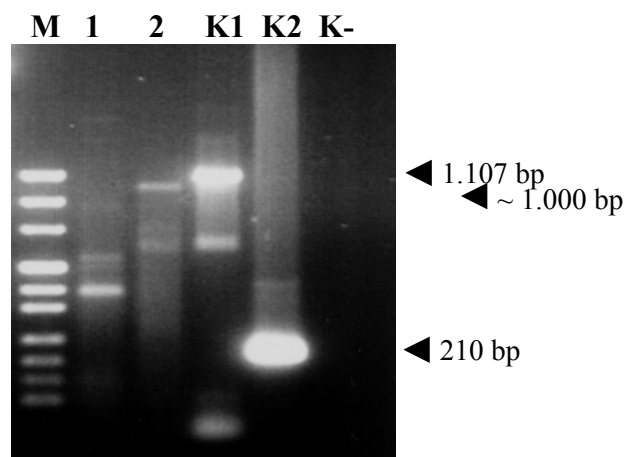


Abb. 3.21: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der Wiederholung der RACE nach Methode 4 zur Amplifikation des 5'-Endes der putativ viralen RNA erhaltenen Produkte. Die Erststrangsynthese wurde unter Verwendung von Gesamt-RNA aus symptomatischen Ebereschen mit den 5'-Biotin-markierten Primern A12_102 Bio (Spur 1) und 450RP Bio (Spur 2) durchgeführt. Die anschließende PCR erfolgte mit den 'nested'-Primern 465RP bzw. 261RP. **M:** pUC Mix Marker (MBI), **K1:** Erststrangprimer A12_102 Bio, PCR-Primerkombination: 465RP/71FP, **K2:** Erststrangprimer: 450RP Bio, PCR-Primerkombination: 261RP/71FP, **K-:** Wasserkontrolle

Das aus der RACE in 3'-Richtung hervorgegangene PCR-Produkt (Abb. 3.20, Spur 2) hatte eine Gesamtlänge von 433 bp (Klon V74 516.6) und überlappte mit einem Bereich von 105 nt mit der 6,0 kb langen putativ viralen Sequenz (Abb. 3.22). Der aus der Klonierung des 1 kb

langen RACE-Produktes (Abb. 3.21, Spur 2) resultierende Klon V89.6 hatte eine Gesamtlänge von 1.007 bp und überschneidet sich mit einer Region von 259 nt mit dem 5'-Ende der Ausgangssequenz (Abb. 3.22).

Die RACE nach Methode 4 führte demnach zum Erhalt einer putativ viralen Gesamtsequenz von 7.040 nt, die im Folgenden nur noch als RNA 1 bezeichnet wird.

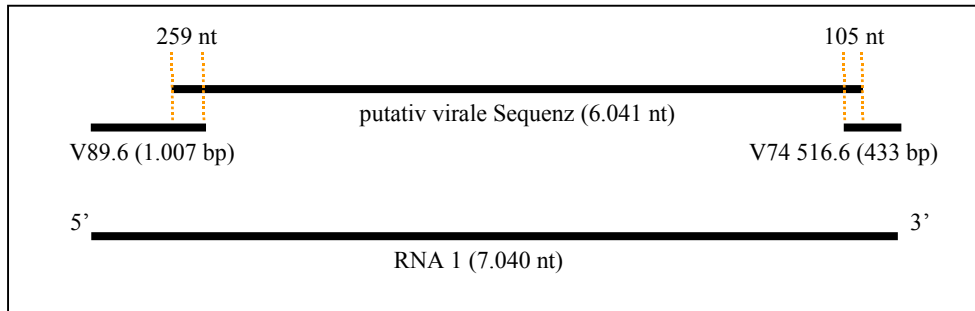


Abb. 3.22: Verlängerung der putativ viralen Sequenz durch die mit der RACE nach Methode 4 erhaltenen Klone V74 516.6 und V89.6 auf eine Gesamtlänge der RNA 1 von 7.040 nt.

Aufgrund erster Hinweise von Benthack (2001) auf eine mögliche Verwandtschaft der erhaltenen RNA-Sequenz (RNA 1) zu der Familie *Bunyaviridae* und deren L-RNA, wurde diese bezüglich komplementärer Terminussequenzen, die für diese Viren charakteristisch sind und zur Ausbildung einer 'panhandle'-Struktur der genomischen vRNA sowie ihrer im Zuge der Replikation gebildeten komplementären vcRNA führen, analysiert.

Die Enden der in erkrankten Ebereschen vorkommenden RNA 1 wiesen ebenfalls derartige komplementäre Sequenzen von 19 nt auf (Abb. 3.23). Lediglich 2 nt dieser Termini zeigten keine Möglichkeit zur Basenpaarung.

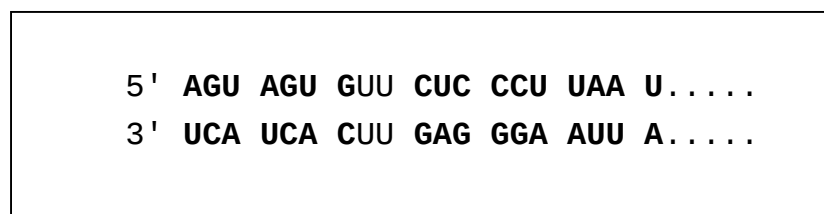


Abb. 3.23: Komplementäre Terminussequenz der RNA 1. Die komplementären Nukleotide sind fett markiert.

Ein Vergleich dieser Sequenz mit den konservierten Termini der einzelnen Genera der Familie *Bunyaviridae* sowie dem phytopathogenen Genus *Tenuivirus*, deren Vertreter ebenfalls solche charakteristischen Enden aufweisen, zeigte eine weitgehende Übereinstimmung mit denen der Orthobunyaviren und der Hantaviren (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Übersicht über die konservierten Termini der verschiedenen Genera der *Bunyaviridae* und des Genus *Tenuivirus* sowie der RNA 1. Identische Nukleotide in der Sequenz sind rot dargestellt.

	5' Terminus	3' Terminus
RNA 1	AGU AGU GUU CU . . .	. . .AG UUC ACU ACU
<i>Orthobunyavirus</i>	AGU AGU GUG CU . . .	. . .AG UAC ACU ACU
<i>Hantavirus</i>	U AGU AGU AUG CU . . .	. . .AG UCU ACU ACU A
<i>Tospovirus</i>	AGA GCA AU . . .	. . .AU UGC UCU
<i>Nairovirus</i>	UCU CAA AG . . .	. . .CU UUG AGA
<i>Phlebovirus</i>	ACA CAA AG . . .	. . .CU UUG UGU
<i>Tenuivirus</i>	ACA CAA AG . . .	. . .CU AUG UGU

Die weiteren Sequenzanalysen (offene Leserahmen (ORF), Homologien) bezüglich der RNA 1 sind unter 3.5.1 dargestellt.

3.4 RT-PCR unter Verwendung von Primern, die Bereiche der komplementären Termini beinhalten

Aufgrund der bereits von Benthack (2001) gezeigten Homologie von Regionen der RNA 1 zur RNA-abhängigen-RNA-Polymerase (RdRP) verschiedener Vertreter der *Bunyaviridae*, der Tatsache, dass mehrere dsRNA Fragmente aus symptomatischem Ebereschengewebe von der Autorin isoliert werden konnten und den nun identifizierten für ss(-)RNA-Viren mit segmentiertem Genom typischen komplementären Terminussequenzen sollte in RT-PCR-Analysen überprüft werden, ob weitere virale RNAs vorliegen. Hierfür wurden von den Termini der RNA 1 verschiedene Primer entwickelt, die Teile dieser Sequenz beinhalten.

3.4.1 RT-PCR unter Verwendung des Primers Termini11

Es wurde zunächst eine RT-PCR unter alleiniger Verwendung des Primers Termini11, der die letzten 11 nt des putativen 3'-Endes der RNA 1 beinhaltet, durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente sowohl Gesamt-RNA als auch angereicherte 'virion' (v)RNA einer Nucleocapsid-Aufreinigung (3.6) aus Blattmaterial symptomatischer Ebereschen.

Es konnten PCR-Produkte der Größenordnung von etwa 500 bp, 1.100 bp, 1.300 bp und 1.400 bp erhalten werden (Abb. 3.24, Spuren 1 und 2). Das Fragment von etwa 1.100 bp trat jedoch nur in der Probe mit angereicherter 'vRNA' auf (Abb. 3.24, Spur 1).

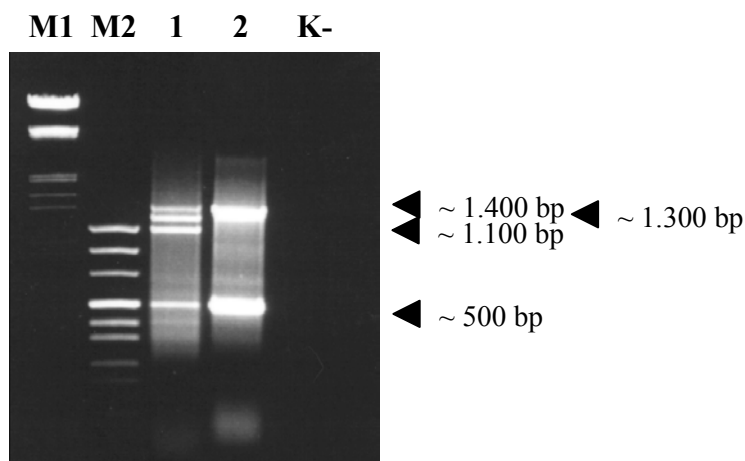


Abb. 3.24: Gelelektrophoretische Auftrennung der in einer RT-PCR unter Verwendung des Primers Termini 11, der die letzten 11 nt des putativen 3'-Endes der RNA 1 beinhaltet, erhaltenen Produkte. Für die Reaktion wurde Gesamt-RNA (Spur 2) sowie angereicherte vRNA (Spur 1) aus einer Nucleocapsid-Aufreinigung symptomatischer Ebereschensblätter verwendet. **M1:** DNA Molecular Weight Marker 3 (MBI), **M2:** pUC Mix Marker (MBI), **K-:** Fraktion der 'angereicherten vRNA' aus asymptomatischen Ebereschens.

Die Klonierung der aus angereicherter vRNA hervorgegangenen Amplifikate in den Vektor pCR 4 TOPO resultierte in zahlreichen Klonen mit Inserts der Größen von 1.429 bp (u.a. V107.6) und 495 bp (u.a. V107.1). Die Klone zeigten in der Datenbank jedoch weder Sequenzhomologien zu bereits bekannten viralen Proteinen noch zu pflanzlichen. Für die Klone mit dem längeren Insert (V107.6) konnte jedoch ein kurzes Motiv des Glykoproteinprecursors der tier- und humanpathogenen Phleboviren, die ebenfalls zur Familie *Bunyaviridae* gehören, identifiziert werden (3.5.2).

Darüber hinaus ging aus der RT-PCR ein Klon von 391 bp (V107.2) hervor, der mit dem 3'-Ende der bereits bekannten RNA 1 übereinstimmte.

Aus 40 in der M13-PCR analysierten Klonen konnte jedoch keiner mit Insertlängen von etwa 1.300 bp und 1.100 bp identifiziert werden.

3.4.2 Bestätigung des putativ viralen 3'-Endes des aus der RT-PCR mit dem Primer Termini 11 hervorgegangenen Klon V107.6 durch RACE

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem größeren erhaltenen Klon von 1.429 bp (V107.6) um das 3'-Ende einer weiteren viralen RNA handelt, wurde ein 5'-Biotin-markierter Primer (658 Bio) abgeleitet (Abb. 3.25) und eine RACE nach Methode 4 (3.3.5, Abb. 3.18) mit dem 'nested'-SSP M1217 und einem (dG)Terminus-Primer, der an seinem 3'-ende 7 nt der

Terminussequenz der RNA 1 besitzt, durchgeführt. Das PCR-Produkt der erwarteten Größe von 158 bp konnte erhalten werden (Abb. 3.26, Spur 1).

Die Klonierung und Sequenzierung (Klon V113.2) bestätigte, dass es sich bei der Sequenz tatsächlich um das 3'-Ende einer zweiten putativ viralen RNA handelt.

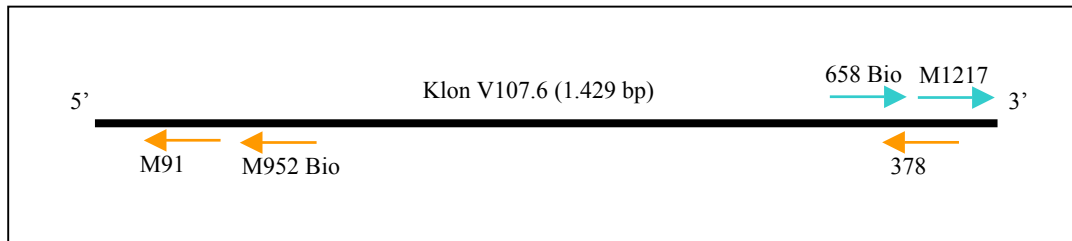


Abb. 3.25: Lage der für die RACE und RT-PCR-Analysen verwendeten Primer auf dem Klon V107.6.

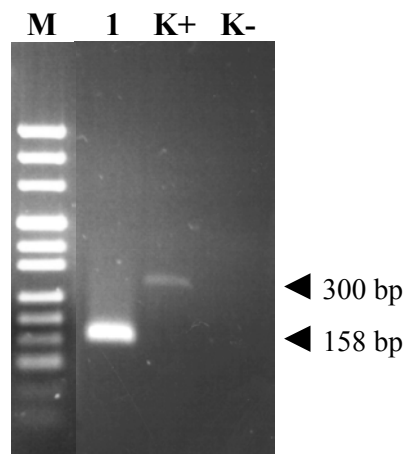


Abb. 3.26: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der RACE zur Bestätigung des putativ viralen 3'-Endes des Klon V107.6, der aus einer RT-PCR unter Verwendung des Primers Termini11 hervorgegangen ist, erhaltenen Produkte. Die Reverse Transkription wurde ausgehend von Gesamt-RNA aus symptomatischem Ebereschensblattgewebe mit dem SSP 658 Bio durchgeführt. Für die anschließende PCR-Reaktion wurde die Primerkombination M1217/(dG)Terminus gewählt (Spur 1). **M:** pUC Mix Marker (MBI), **K+:** PCR-Primerkombination 658/378, **K-:** Wasserkontrolle.

3.4.3 Amplifikation und Bestimmung des 5'-Endes der zweiten putativ viralen RNA (RNA 2)

Zum Erhalt des 5'-Endes dieser zweiten putativ viralen RNA wurde eine RT-PCR mit einem vom Klon V107.6 abgeleiteten Primer (M952) (3.4.2, Abb. 3.25) sowie dem Primer Termini11(5'), der die um 2 nt abweichende 5'-Terminussequenz der RNA 1 beinhaltet,

verwendet. Als Erststrangprimer wurde der SSP M952 eingesetzt. Die PCR lieferte ein Hauptamplifikationsprodukt der Größe von etwa 1.000 bp (Abb. 3.27, Spur 1), das in den Vektor pGEM T-Easy kloniert wurde (Klon V144.1). Die Sequenzierung des Inserts zeigte die erwartete Überlappung von 123 bp mit dem Klon V107.6. Die daraus resultierende Consensussequenz (RNA 2) hatte eine Gesamtlänge von 2.335 nt (3.4.4, Abb. 3.29).

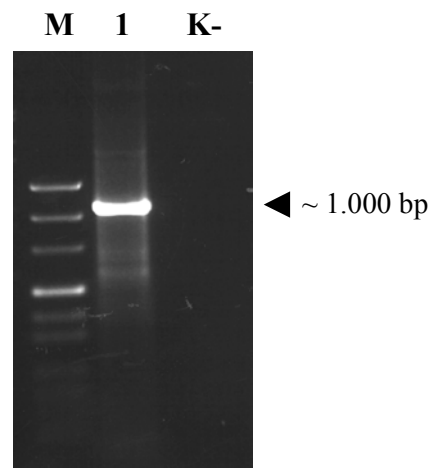


Abb. 3.27: Gelelektrophoretische Auftrennung der in einer RT-PCR zur Amplifizierung des 5'-Endes einer zweiten putativ viralen RNA (Klon V107.6) erhaltenen Produkte. Die Reverse Transkription wurde ausgehend von Gesamt-RNA aus symptomatischem Ebereschensblattgewebe mit dem SSP M952 durchgeführt. Für die anschließende PCR-Reaktion wurde dieser durch den Primer Termini11(5') ergänzt (Spur 1). **M:** pUC Mix Marker (MBI), **K-:** Wasserkontrolle.

3.4.4 Bestätigung des 5'- Endes der zweiten putativ viralen RNA (RNA 2)

Um das zuvor erhaltene 5'-Ende der RNA 2 (3.4.3, Klon V144.1) zu bestätigen wurde eine RACE unter Verwendung des 5'-Biotin-markierten Primers M952 Bio (3.4.2, Abb. 3.25) sowie der anschließenden PCR-Primerkombination M91/(dG)Terminus durchgeführt. Das erwartete Produkt der Größe von 762 bp konnte erhalten werden (Abb. 3.28, Spur 1). Die Klonierung und Sequenzierung (Klon V116.3) bestätigte die Spezifität des cDNA-Fragments und somit das 5'-Ende der putativ viralen RNA 2.

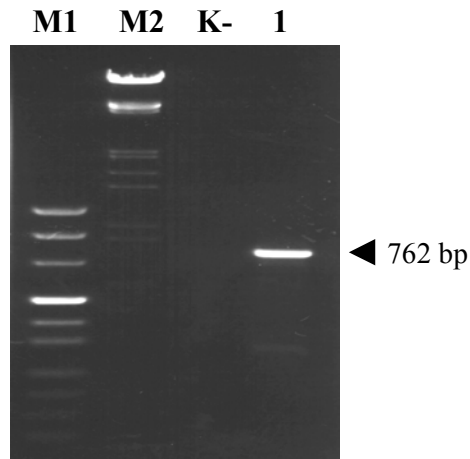


Abb. 3.28: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der RACE zur Bestätigung des 5'-Endes der zweiten putativ viralen RNA (RNA 2) erhaltenen Produkte. Die Reverse Transkription wurde ausgehend von Gesamt-RNA aus symptomatischem Ebereschensblattgewebe mit dem SSP M952 Bio durchgeführt. Für die anschließende PCR-Reaktion wurde die Primerkombination M91/(dG)Terminus gewählt (Spur 1). **M1:** pUC Mix Marker (MBI), **M2:** Molecular Weight Marker 3 (MBI), **K-:** Wasserkontrolle.

Nachstehende Abbildung 3.29 zeigt die Lage der in den verschiedenen RT-PCR- und RACE-Analysen (3.4.1-4) erhaltenen Klone, die zusammen die Consensussequenz der RNA 2 ergaben.

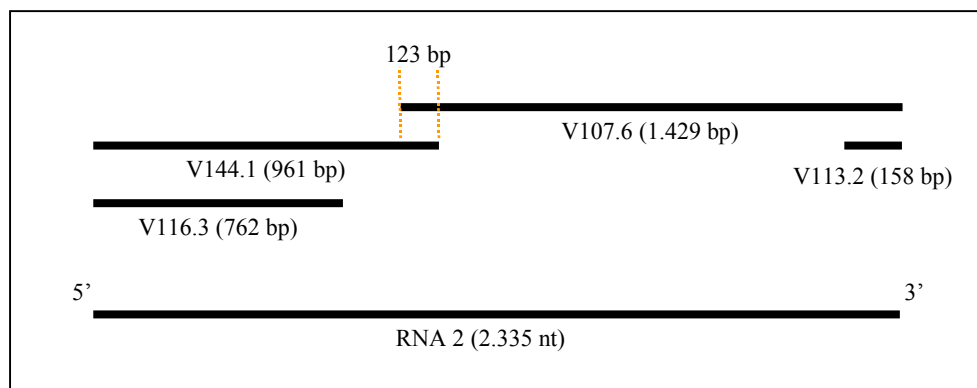


Abb. 3.29: Schematische Darstellung der Lage der Klone auf der RNA 2.

3.4.5 Amplifikation und Bestimmung des 5'-Endes der dritten putativ viralen RNA (Klon V107.1)

Mit dem bisher angewandten Verfahren sollte nun überprüft werden, ob es sich bei dem Klon V107.1, der bei der Klonierung der aus der Termini11-RT-PCR hervorgegangenen Produkte, isoliert werden konnte (3.4.1), ebenfalls um den 3'-Bereich einer weiteren, dritten viralen RNA handelt. Somit wurde auch hier zunächst ein sequenzspezifischer Primer (518) abgeleitet (Abb. 3.30) und in einer RT-PCR, zusammen mit dem Primer Termini11(5'), eingesetzt. Es konnten zwei Amplifikationsprodukte der Größen von etwa 700 bp und 1.150 bp erhalten werden (Abb. 3.31, Spur 1).

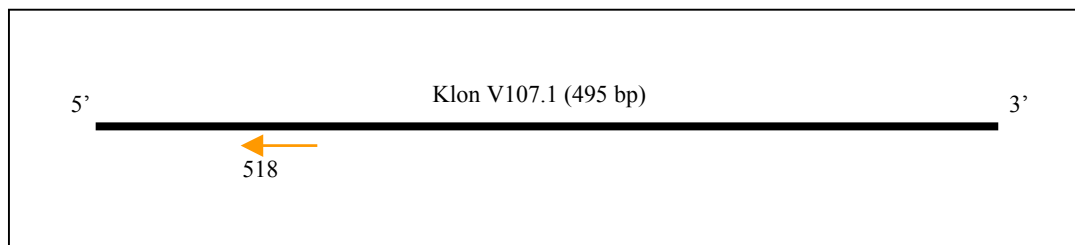


Abb. 3.30: Lage des für die RT-PCR-Analyse zur Amplifizierung des 5'-Endes der dritten putativ viralen RNA verwendeten spezifischen Primers auf dem Klon V107.1.

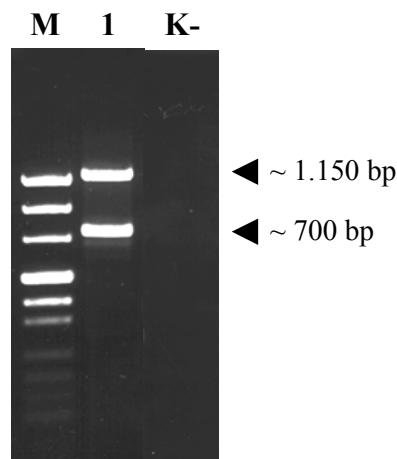


Abb. 3.31: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der RT-PCR zur Bestimmung des 5'-Endes einer dritten putativ viralen RNA (Klon V107.1) erhaltenen Produkte. Die Reverse Transkription wurde ausgehend von Gesamt-RNA aus symptomatischem Ebereschensblattgewebe mit dem SSP 518 durchgeführt. Für die anschließende PCR-Reaktion wurde dieser durch den Primer Termini11(5') ergänzt (Spur 1). **M:** pUC Mix Marker (MBI), **K-:** Wasserkontrolle.

Durch eine Überlappung von 54 bp mit dem Klon V107.1 erwies sich das größere Fragment (1.155 bp) als sequenzspezifisch (Abb. 3.32, Klon V133.10). Das kleinere cDNA-Produkt konnte hingegen Chloroplasten-DNA zugeordnet werden.

Es ergab sich somit eine vorläufige Gesamtsequenz der RNA 3 von 1.560 nt.

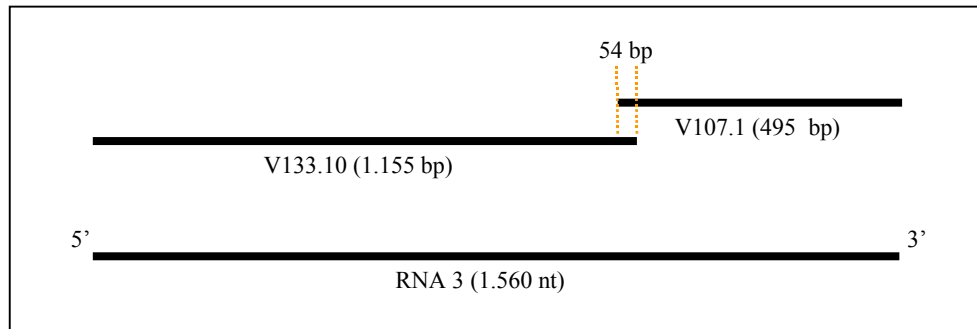


Abb. 3.32: Schematische Darstellung der Lage der Klone auf der RNA 3.

3.4.6 RT-PCR unter Verwendung der Primer T13 und T13(5')

Ein Vergleich der Termini der ersten drei erhaltenen viralen RNAs zeigte, dass hier nicht nur die letzten 11 sondern 13 Nukleotide konserviert sind :

5' **AGU AGU GUU CUC C... . . .G GAG UUC ACU ACU** 3'

Daher wurden zwei weitere Primer (T13 und T13(5')), die diese 13 nt lange Terminussequenz beinhalten, in RT-PCR-Analysen eingesetzt. Hierbei konnte neben zahlreichen schwächer konzentrierten Fragmenten ein Hauptprodukt von etwa 1.300 bp erhalten werden (Abb. 3.33, Spur 1). Die Klonierung und Sequenzierung dieses Amplifikats (Klon V 130.19) ergab eine vierte putativ virale RNA (RNA 4) von 1.348 nt Länge.

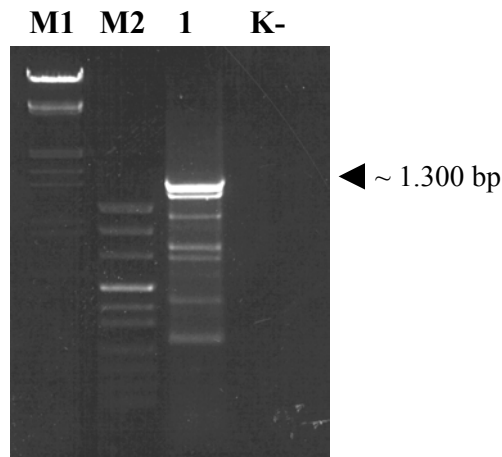


Abb. 3.33: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der RT-PCR unter Verwendung der Primer T13 und T13(5') erhaltenen Produkte. Gesamt-RNA aus symptomatischen Ebereschen wurde zunächst mit dem Primer T13 revers transkribiert. In der anschließenden PCR-Reaktion wurde dieser durch den Primer T13(5') ergänzt (Spur 1). **M1:** Molecular Weight Marker 3 (MBI), **M2:** pUC Mix Marker (MBI), **K-:** Wasserkontrolle.

3.5 Sequenzanalysen der RNAs 1-4

Unter Verwendung von verschiedenen Software-Programmen zur Bearbeitung und Analyse von Nuklotid- und Aminosäuresequenzen sowie der Datenbank BLAST des NCBI wurden die zuvor erhaltenen vier putativ viralen RNAs näher charakterisiert.

3.5.1 RNA 1

RNA 1 hat eine Gesamtlänge von 7.040 nt und besitzt einen einzigen ORF (45-6.926 nt). Dieser kodiert für ein 265,65 kD Protein (Abb.3.34). Datenbankanalysen zeigten für einen Bereich von 795 Aminosäuren (AA 554-1.625) eine Homologie von bis zu 43 % (Identität bis zu 25 %) zur RdRP verschiedener Vertreter der Familie *Bunyaviridae* (Abb. 3.34).

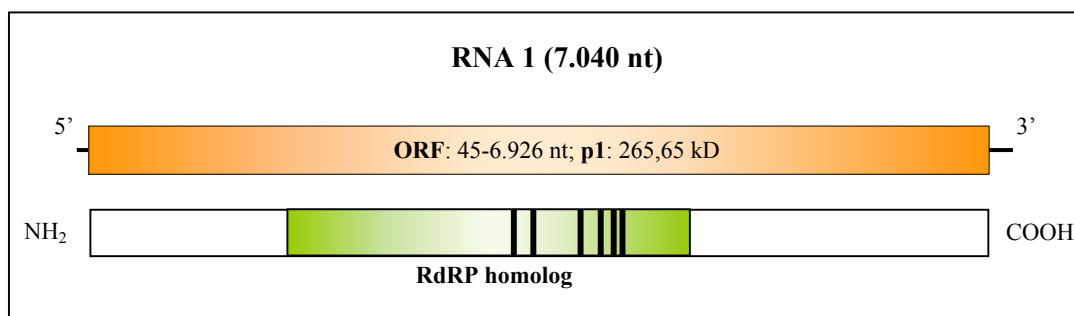


Abb. 3.34: Schematische Darstellung der RNA 1 und dem hiervon kodierten Protein p1. Der grünmarkierte Abschnitt zeigt den Bereich (554-1.625 AA), der eine Homologie zu RdRPs verschiedener *Bunyaviridae* aufweist. Die sechs konservierten Motive, Prämotiv A und Motive A-E, sind in der Reihenfolge vom N- zum C-Terminus durch schwarze Balken dargestellt.

Die fünf konservierten Motive A-E der RdRP sowie das Prämotiv A konnten eindeutig identifiziert werden (Abb. 3.35).

		Prämotiv A																													
Tospo-	p1	K	D	Q	R	T	T	D	D	R	E	I	Y	T	G	N	A	Q	V	R	L	C	L	Y	P	L	E	M	T	F	K
	TSWV	K	M	Q	R	T	K	M	D	R	E	I	Y	L	M	S	M	K	T	K	M	M	L	Y	F	I	E	H	T	F	K
	GBNV	K	M	Q	R	T	K	M	D	R	E	I	Y	L	M	S	M	K	T	K	M	M	L	Y	F	I	E	H	T	F	K
	WSMV	K	M	Q	R	T	K	M	D	R	E	I	Y	L	M	S	M	K	T	K	M	M	L	Y	F	I	E	H	T	F	K
Bunya-	BUNV	K	G	Q	K	T	A	K	D	R	E	I	F	V	G	E	F	E	A	K	N	C	M	Y	V	V	E	R	I	S	K
	LACV	K	G	Q	K	T	A	K	D	R	E	I	F	V	G	E	F	E	A	K	N	C	M	Y	A	V	E	R	I	A	K
	OROV	K	G	Q	K	T	A	K	D	R	E	I	F	V	G	E	F	E	A	K	N	C	L	Y	L	V	E	R	I	A	K
	DOBV	K	Y	Q	R	T	E	A	D	R	G	F	F	I	T	T	L	P	T	R	V	R	L	E	I	I	E	D	Y	Y	D
Hanta-	PUUV	K	Y	Q	R	T	E	A	D	R	G	F	F	I	T	T	L	P	T	R	C	R	L	E	I	I	E	D	Y	Y	D
	HTNV	K	Y	Q	R	T	E	A	D	R	G	F	F	I	T	T	L	P	T	R	C	R	L	E	I	I	E	D	Y	Y	D
	DUGV	K	A	Q	-	L	G	G	S	R	E	L	L	V	Q	E	T	G	T	K	V	I	H	A	T	V	E	M	F	S	R
	UUKV	K	P	Q	-	L	G	G	S	R	E	L	Y	V	L	G	F	E	E	R	V	V	G	L	V	I	E	T	I	A	R
Nairo-	RVFV	K	Q	Q	-	H	G	G	L	R	E	I	Y	V	M	G	A	E	E	R	I	V	G	S	V	I	E	T	I	A	R
	TOSV	K	Q	Q	-	H	G	G	L	R	E	I	Y	V	M	G	A	E	E	R	I	V	G	S	V	I	E	T	I	A	R
	RCSV	K	N	Q	-	H	G	G	L	R	E	I	Y	V	L	N	I	F	E	R	I	M	G	K	T	V	E	D	F	S	R
	RGSV	K	N	Q	-	H	G	G	L	R	E	I	Y	V	L	N	I	Y	E	R	I	V	Q	K	C	V	E	D	L	A	R
Tenui-																															

		Motiv A														Motiv B																												
Tospo-	p1	K	T	E	I	Y	S	V	S	S	D	A	S	K	W	S	A	R	D		N	W	F	N	V	R	S	N	W	L	Q	G	N	L	N	M	T	S	S	F	V	H	H	
	TSWV	K	S	R	L	A	F	L	S	A	D	Q	S	K	W	S	A	S	D		N	T	Y	P	V	S	M	N	W	L	Q	G	N	L	N	Y	L	S	S	V	Y	H	S	
	GBNV	E	C	K	M	A	F	L	S	A	D	Q	S	K	W	S	A	S	D		N	T	F	P	V	S	M	N	W	L	Q	G	N	L	N	Y	L	S	S	V	Y	H	S	
	WSMV	E	C	K	M	A	F	L	S	A	D	Q	S	K	W	S	A	S	D		N	T	F	P	V	S	M	N	W	L	Q	G	N	L	N	Y	L	S	S	V	Y	H	S	
Bunya-	BUNV	K	A	L	K	L	E	I	N	A	D	M	S	K	W	S	A	Q	D		N	Y	V	Q	I	K	R	N	W	L	Q	G	N	F	N	Y	I	S	S	Y	V	H	S	
	LACV	K	G	L	K	M	E	I	N	A	D	M	S	K	W	S	A	Q	D		N	T	V	L	I	K	R	N	W	L	Q	G	N	L	N	Y	T	S	S	Y	L	H	S	
	OROV	R	G	L	K	I	E	I	N	A	D	M	S	K	W	S	A	Q	D		N	T	V	E	I	K	R	N	W	L	Q	G	N	L	N	Y	T	S	S	Y	L	H	S	
	DOBV	K	R	K	L	M	Y	V	S	A	D	A	T	K	W	S	P	G	D		-	-	-	E	V	I	R	G	N	W	L	Q	G	N	L	N	K	C	S	S	L	F	G	V
Hanta-	PUUV	K	R	K	L	M	Y	V	S	A	D	A	T	K	W	S	P	G	D		-	-	-	E	V	I	R	G	N	W	L	Q	G	N	L	N	K	C	S	S	L	F	G	V
	HTNV	K	R	K	L	M	Y	V	S	A	D	A	T	K	W	S	P	G	D		-	-	-	E	V	I	R	G	N	W	L	Q	G	N	L	N	K	C	S	S	L	F	G	V
	DUGV	F	F	K	T	V	C	I	S	G	D	N	T	K	W	G	P	I	H		M	A	M	N	S	Y	N	H	M	G	Q	G	I	H	H	A	T	S	S	L	L	T	S	
	UUKV	H	H	E	T	V	A	T	S	D	D	A	A	K	W	N	Q	C	H		A	F	V	Q	T	E	T	T	G	M	M	Q	G	I	L	H	Y	T	S	S	L	L	H	T
Nairo-	RVFV	P	V	W	T	C	A	T	S	D	D	A	R	K	W	N	Q	G	H		T	Y	L	E	T	T	T	G	M	M	Q	G	I	L	H	Y	T	S	S	L	L	H	T	
	TOSV	S	V	W	T	C	A	T	S	D	D	A	R	K	W	N	Q	G	H		T	Y	L	E	T	T	T	G	M	M	Q	G	I	L	H	Y	T	S	S	L	L	H	T	
	RCSV	E	Y	M	T	I	S	T	S	D	D	A	S	K	W	N	Q	G	H		S	Y	I	E	T	E	T	T	G	M	M	Q	G	I	L	H	Y	T	S	S	L	F	H	A
	RGSV	S	Y	F	T	V	C	T	S	D	D	A	S	K	W	N	Q	G	H		T	Y	I	E	T	E	S	G	F	M	Q	G	I	L	H	Y	I	S	S	L	F	H	A	
Tenui-																																												

		Motiv C										Motiv D										Motiv E																				
Tospo-	p1	M	V	H	S	D	D	S	T	Y	D	F		I	T	L	N	E	K	K	T	Y	I	S		K	E	F	L	S	T	T	I	V	S	N						
	TSWV	I	V	H	S	D	D	N	A	T	S	L		I	T	L	N	P	K	K	S	Y	A	S		V	E	F	I	S	E	R	I	S	K	W						
	GBNV	M	V	H	S	D	D	N	A	T	S	I		I	T	L	N	P	K	K	S	Y	A	S		V	E	F	I	S	E	R	I	I	N	G						
	WSMV	M	V	H	S	D	D	N	A	T	S	I		I	T	L	N	P	K	K	S	Y	A	S		V	E	F	I	S	E	R	I	I	N	G						
Bunya-	BUNV	M	V	H	S	D	D	N	Q	T	S	L		C	Q	A	N	M	K	K	T	Y	I	T		K	E	F	V	S	L	F	N	L	H	G						
	LACV	L	V	H	S	D	D	N	Q	T	S	I		C	Q	A	N	M	K	K	T	Y	V	T		K	E	F	V	S	L	F	N	L	Y	G						
	OROV	M	V	H	S	D	D	N	Q	T	S	I		N	Q	A	N	M	K	K	T	Y	L	T		K	E	F	V	S	L	F	N	I	H	G						
	DOBV	A	H	H	S	D	D	A	L	F	I	Y		I	K	I	S	P	K	K	T	T	L	S		A	E	F	L	S	T	F	F	E	G	C						
Hanta-	PUUV	A	H	H	S	D	D	A	L	F	I	Y		I	K	I	S	P	K	K	T	T	V	S		A	E	F	L	S	T	F	F	E	G	C						
	HTNV	A	H	H	S	D	D	A	L	F	I	Y		I	K	I	S	P	K	K	T	T	V	S		A	E	F	L	S	T	F	F	E	G	C						
	DUGV	A	G	S	S	D	D	Y	A	K	C	I		Q	M	K	D	S	A	K	T	L	V	G		L	E	F	Y	S	E	F	M	M	G	N						
	UUKV	L	Q	S	S	D	D	S	G	M	I		I	Y	S	S	V	K	S	T	N	N	T		L	E	F	N	S	E	F	F	F	H	I							
Nairo-	RVFV	M	Q	G	S	D	D	S	S	M	I		I	Y	P	S	E	K	S	T	A	N	T		M	E	Y	N	S	E	F	Y	F	H	T							
	TOSV	M	Q	G	S	D	D	S	S	M	I		I	Y	P	S	E	K	S	T	P	N	T		M	E	Y	N	S	E	F	F	F	H	S							
	RCSV	M	E	S	S	D	D	S	S	F	I	I		I	Y	K	S	P	K	S	T	T	Q	T		M	E	F	N	S	E	F	F	F	S	G						
	RGSV	M	E	S	S	D	D	S	S	M	I		I	Y	K	S	I	K	S	T	T	G	T		M	E	F	N	S	E	F	F	F	A	G							
Tenui-																																										

Abb. 3.35: Identitätsvergleich der sechs konservierten RdRP-Motive verschiedener Bunyaviren und Tenuiviren mit dem p1 aus symptomatischen Ebereschen. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt. **TSWV:** Tomato Spotted Wilt Tospovirus; **GBNV:** Groundnut Bud Necrosis Tospovirus; **WSMV:** Watermelon Silver Mottle Tospovirus; **BUNV:** Bunyamwera Orthobunyavirus; **LACV:** La Crosse Orthobunyavirus; **OROV:**

Der auf diesen Homologien der RdRP-Motive basierende Stammbaum zeigt die engste phylogenetische Beziehung des putativen Virus der Eberesche mit den Tospo- und Orthobunyaviren (Abb. 3.36).

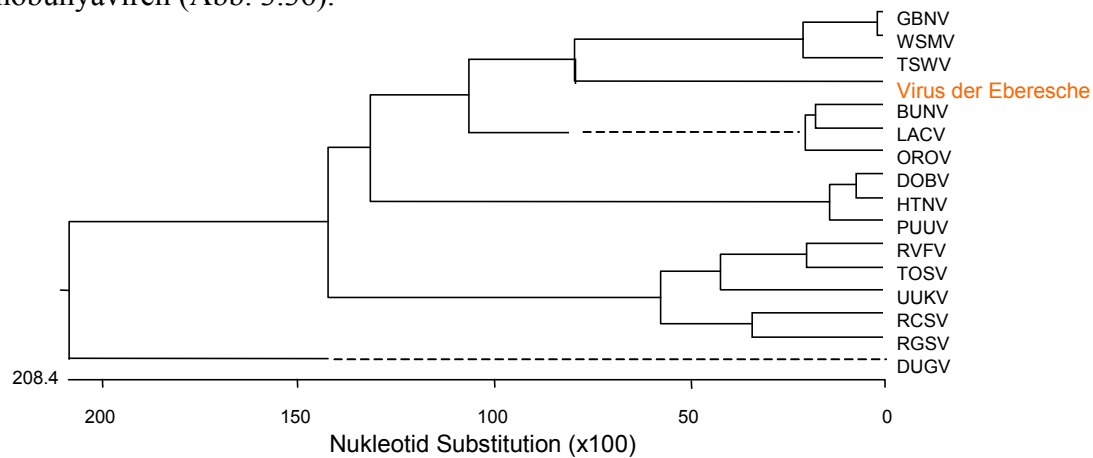


Abb. 3.36: Phylogenetische Beziehung des putativen Virus der Eberesche zu verschiedenen Bunyaviridae und Tenuiviren basierend auf dem Identitätsvergleich der sechs konservierten RdRP-Motive. TSWV: Tomato Spotted Wilt Tospovirus; GBMV: Groundnut Bud Necrosis Tospovirus; WSMV: Watermelon Silver Mottle Tospovirus; BUNV: Bunyamwera Orthobunyavirus; LACV: La Crosse Orthobunyavirus; OROV: Oropouche Orthobunyavirus; DOBV: Dobrava Hantavirus; PUUV: Puumala Hantavirus; HTNV: Hantaan Hantavirus; DUGV: Dugbe Nairovirus; UUKV: Uukuniemi Phlebovirus; RVFV: Rift Valley Fever Phlebovirus; TOSV: Toscana Phlebovirus; RCSV: Rice Stripe Tenuivirus; RGSV: Rice Grassy Stunt Tenuivirus.

Zudem konnte eine weitere Region des p1 als putatives endonukleolytisches Zentrum der RdRP, das im Zuge des 'Cap-Snatching'-Mechanismus bei der Synthese von mRNA benötigt wird, identifiziert werden (Abb. 3.37).

	p1	L	T	L	S	T	-	Y	N	M	Q	Y	T	S	E	K	N	P	R	C	N	I	P	N	S	T	D	L	P	I	G	I	Y	P	R	Y	K	L	P	L	S	L	A	G	C	I	P	Y	Y	S	S	D	A	Y	N	I	L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
Tospo-	TSWV	S	D	Y	S	S	-	L	L	Q	A	F	S	K	L	L	E	R	I	F	A	Y	K	L	F	D	D	L	N	S	L	S	I	-	-	H	V	T	M	L	L	R	K	G	C	P	N	E	V	I	P	F	A	Y	G	A	V																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	GBNV	A	V	I	P	L	-	Y	C	R	H	L	A	N	C	S	T	E	S	S	H	N	S	Y	F	D	D	L	N	S	L	S	I	-	-	H	I	T	M	L	L	R	K	G	C	P	N	E	L	I	P	F	A	Y	A	A	I																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	WSMV	A	V	I	P	L	-	Y	C	R	E	L	A	N	C	S	T	E	S	S	H	N	S	Y	F	D	D	L	N	S	L	S	I	-	-	H	I	T	M	L	L	R	K	G	C	P	N	E	L	I	P	F	A	Y	A	A	I																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
Bunya-	BUNV	E	P	L	S	V	-	F	G	R	F	L	L	P	S	V	G	D	C	A	Y	I	G	F	Y	E	D	L	A	S	R	L	S	-	-	A	A	Q	Q	S	L	K	H	G	C	P	P	S	L	V	W	L	A	I	S	C	S																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	LACV	E	P	F	S	I	-	Y	G	R	F	L	L	T	S	V	G	D	C	A	Y	I	G	F	Y	E	D	L	A	S	R	L	S	-	-	S	A	Q	T	A	I	K	H	G	C	P	P	S	L	A	W	S	I	A	I	S																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	OROV	E	P	F	S	I	-	Y	G	R	F	L	L	T	A	V	G	D	C	A	Y	I	G	F	Y	E	D	L	A	S	R	L	S	-	-	A	T	Q	T	A	I	K	H	G	C	P	P	S	L	A	W	S	I	A	I	S																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
Hanta-	DOBV	C	A	V	S	I	P	F	I	K	I	L	L	G	S	L	S	D	L	P	G	L	G	Y	F	D	D	L	A	A	A	Q	S	-	-	R	C	V	K	A	M	D	L	G	A	S	P	Q	V	A	Q	L	A	V	A	L	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	PUUV	C	A	V	S	I	P	F	I	K	I	L	L	G	S	L	S	D	L	P	G	L	G	Y	F	D	D	L	A	A	A	Q	S	-	-	R	C	V	K	A	M	D	L	G	A	S	P	Q	V	A	Q	L	A	V	A	L	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	HTNV	C	A	V	S	I	P	F	I	K	I	L	L	G	S	L	S	D	L	P	G	L	G	Y	F	D	D	L	A	A	A	Q	S	-	-	R	C	V	K	A	M	D	L	G	A	S	P	Q	V	A	Q	L	A	V	A	L	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
Nairo-	DUGV	R	V	T	P	A	V	I	K	F	I	F	T	G	L	-	-	D	N	S	S	V	T	S	P	Q	S	L	V	Q	A	C	H	-	-	V	S	S	Q	-	-	-	G	-	N	Y	M	S	V	P	L	V	T	N	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	UUKV	N	H	N	R	P	L	R	W	I	T	A	C	D	T	-	-	I	S	E	Q	E	S	L	A	S	R	Q	E	E	M	Y	-	-	N	N	L	T	S	V	L	E	G	-	G	G	S	F	S	-	L	V	S	F	C	Q																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	RVFV	Q	H	V	R	P	T	I	R	K	I	A	A	C	C	S	-	-	L	P	E	V	E	T	L	V	A	R	Q	E	E	A	S	-	-	N	L	M	T	S	W	T	E	G	-	G	G	S	F	S	-	L	A	A	I	Q																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
Phlebo-	TOSV	Q	H	V	R	P	T	I	R	W	I	T	A	S	C	S	-	-	L	P	E	V	E	T	L	V	A	S	K	E	E	A	A	-	-	N	L	L	T	A	I	T	E	G	-	G	G	S	F	S	-	L	A	A	M	I	Q																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	RCSV	D	V	H	R	P	T	F	R	W	V	N	A	A	V	L	-	-	I	G	E	Q	E	T	L	S	G	I	Q	E	E	L	S	-	-	N	T	L	K	D	V	I	E	G	-	G	G	T	Y	A	-	L	T	F	I	V	Q																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	RGSV	D	T	H	R	P	T	I	R	W	V	N	A	A	L	N	-	-	V	S	E	Q	E	T	L	I	A	S	Q	E	E	M	S	-	-	N	T	L	K	D	I	L	E	G	-	G	G	T	F	Y	-	H	T	F	V	T	Q																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
Tenui-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						</

Abb. 3.37: Identitätsvergleich des endonukleolytischen Zentrums der RdRP verschiedener Bunyaviren und Tenuiviren mit einer Region des p1 aus symptomatischen Ebereschen. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt. TSWV: Tomato Spotted Wilt Tospovirus; GBMV: Groundnut Bud Necrosis Tospovirus; WSMV: Watermelon Silver Mottle Tospovirus; BUNV: Bunyamwera Orthobunyavirus; LACV: La Crosse Orthobunyavirus; OROV: Oropouche Orthobunyavirus; DOBV: Dobrava Hantavirus; PUUV: Puumala Hantavirus; HTNV: Hantaan Hantavirus; DUGV: Dugbe Nairovirus; UUKV: Uukuniemi Phlebovirus; RVFV: Rift Valley Fever Phlebovirus; TOSV: Toscana Phlebovirus; RCSV: Rice Stripe Tenuivirus; RGSV: Rice Grassy Stunt Tenuivirus.

3.5.2 RNA 2

RNA 2 ist mit einer Gesamtlänge von 2.335 nt wesentlich kürzer als RNA 1 und besitzt ebenfalls einen einzigen ORF (59-2.009 nt) (Abb. 3.38).

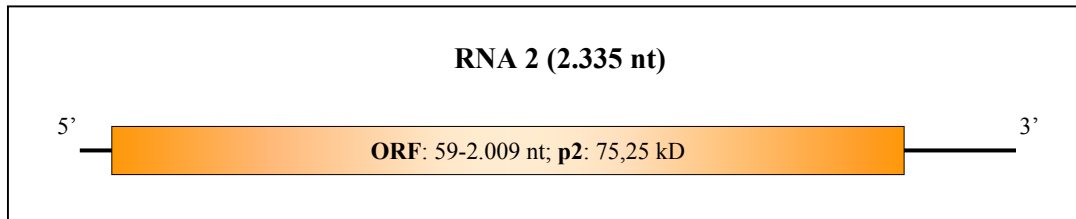


Abb. 3.38: Schematische Darstellung der RNA 2.

Das Gen kodiert für ein 74,25 kD Protein aus 650 AA (p2), das eines der vier konservierten Motive des Glykoproteinprecursors der *Phleboviren* (Liu *et al.*, 2003) beinhaltet:



Aufgrund dieser Information wurde die Aminosäuresequenz näher auf weitere Merkmale eines solchen Precursors hin untersucht. Es konnten alle für diese Gruppe von viralen Proteinen charakteristischen Elemente gefunden werden (Abb. 3.39). Es liegen drei putative Transmembranhelices, ein Signalpeptid am N-terminalen Ende (1-30 AA) sowie sechs mögliche N-Glykosylierungsreste vor. Eine potentielle Prozessierungsstelle (**THA**▼**DD**) würde den Precursor in zwei putative Glykoproteine G1 (C-terminal, 51,54 kD) und G2 (N-terminal, 22,71 kD) spalten.

```

MLSVAQSSALFLLQAICILYITKLTIPVSEINLVRQSDCVCVPIISRSGTDYITCFNN
CQIEPINTKLYNSTCTKMVNITLVRCNNEVYVMTLPNLVSNRSHSWEVLINYLRFISAI
IVYLLLSISKQGIFLFFSIVHYSFKFIKNKKSNCICGNDFYFIHIDCPKPDFTKRSDFHM
MFYIILFSLFFV▼THADDNVYNYEHGDLTEIQLLDKEHYSQDFVSDGFLNFYFVENS
LIYDISNISTITRPVKHNEVTSTWSCDGSSGCYKDHVGKYNKKPDYVLKKVHDGFSFFT
TATICGTCKSEHIAIGDHVRVINVKPYIHIVVKTANKTDKIVIDEFNKFIHEPYHIKPI
QIHIDQHDFLVTGSKVYQGTFCERPSKSCFGPNYITSDKTVTLHEPKIRDFTTHDREYII
DYCDYPSNSDLESLELTDMVHHSDKIYSPYDFGLISIGIPKLGYLGGFCESLSVSKKIE
VYGCYDCQNGVKISVTYESSDSCHTLICKHDSSTHRYFVQQTTLNFHFSFMSKKDTIE
CNQMRKALNLDESSETSVYFESNGVKGSAKEPVNFDFIKNLLYIDYKTIIFVFLVAIISI
GIFLRSPYMLLSSILKFRKRRKVATNRSEQLVMDDDDVDVFIGPPS

```

Abb. 3.39: Abgeleitete Aminosäuresequenz des von der RNA 2 kodierten Proteins p2 mit seinen potentiellen Strukturelementen. Für die Strukturanalysen wurden die Programme TMHMM 2.0, SignalP 1.1, iPSORT Prediction, Target P und NetNGly 1.0 (alle über www.expasy.org) verwendet. Das Protein p2 trägt an seinem N-terminalen Ende eine Signalsequenz (Orange). Zudem verfügt es über drei putative Transmembranhelices (Grün) und sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen (Türkis). Des Weiteren besitzt das Peptid eine mögliche 'Prozessierungsstelle', die die Spaltung des Precursors in zwei einzelne Glykoproteine G1 (C-terminal) und G2 (N-terminal) bewirken könnte (▼).

Die nachstehende Abb. 3.40 zeigt einen Vergleich des p2 mit dem Glykoproteinprecursor verschiedener *Bunyaviridae*.

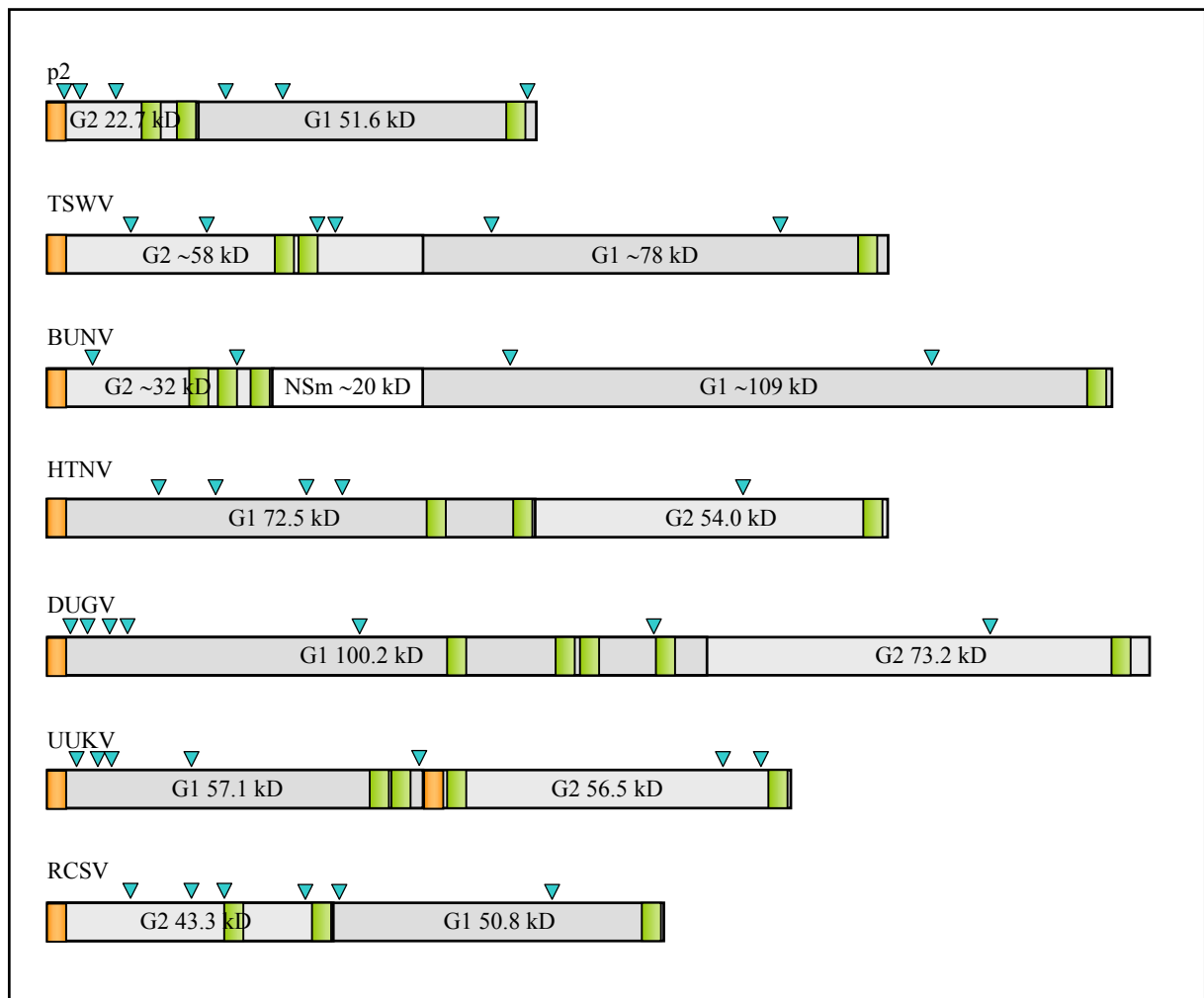


Abb. 3.40: Schematischer Vergleich der Glykoproteinprecursor und ihrer Strukturelemente verschiedener *Bunyaviridae* und einem *Tenuivirus* mit dem p2 aus symptomatischen Ebereschens. Die Bestimmung der Domänen erfolgte soweit bekannt nach Literaturangaben oder mit Hilfe der Programme TMHMM 2.0, SignalP 1.1, iPSORT Prediction, Target P und NetNGly 1.0 (alle über www.expasy.org). Signalsequenzen sind in Orange dargestellt, Transmembranhelices in Grün. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind durch Dreiecke (Türkis) markiert. **TSWV**: Tomato Spotted Wilt Tospovirus; **BUNV**: Bunyamwera Bunyavirus; **HTNV**: Hantaan Hantavirus; **DUGV**: Dugbe Nairovirus; **UUKV**: Uukuniemi Phlebovirus; **RCSV**: Rice Stripe Tenuivirus.

3.5.3 RNA 3

RNA 3 hat eine Gesamtlänge von 1.560 nt. Der ORF erstreckt sich über den Bereich von 120-1.064 nt und codiert für ein Protein (p3) der Größe von 35,08 kD (314 AA) (Abb. 3.42).

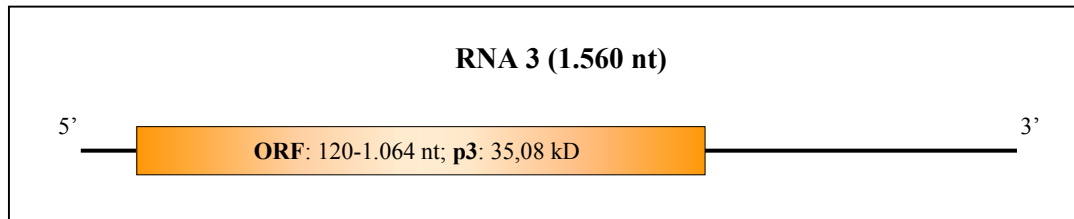


Abb. 3.41: Schematische Darstellung der RNA 3.

Das Protein p3 zeigt Homologien zu Proteinen zweier Pflanzenviren, die bis heute noch nicht klassifiziert sind. Hierbei handelt es sich zum einen um das putative 32 kD-Hüllprotein des High Plains Virus (HPV) (U60141) sowie die partielle Sequenz eines unbekannten Proteins des Pigeon Pea Sterility Mosaic Virus (PPSMV) (AJ439561), das von der RNA 5 kodiert wird. Der Anteil an identischen Aminosäuren des p3 mit dem N-Protein des HPV beträgt 15,6 %, mit dem unvollständigen PPSMV-Peptid 31 %. Der Identitätsvergleich ist in Abb. 3.42 dargestellt.

Zwei Bereiche, die eine besonders hohe Homologie der Proteine zeigen, sind durch ihre Sekundärstrukturen charakterisiert. Bei der ersten Region handelt es sich um ein β -Faltblatt, bei der zweiten um eine α -Helix (Abb. 3.4.2).

p3	M P I I P K P K S Q T K G S V E S S K K E S R V K M E T S D	30
PPSMV	- -	1
HPV	- -	1
p3	A K Y M V G N E V K T I K F L D M R G N I A T S A R N S L N	60
PPSMV	- -	1
HPV	- - - - - - - - - - - G F V T S S D I E T T V H D F S Y	17
p3	I S P G V F A V N P F - L G E T L A E D T F N I L - D Y A G	88
PPSMV	- -	1
HPV	E K P D L S S V D G F S L K S L L S S D G W H I V V A Y Q S	47
p3	L G N V D A C A S H L S R S Q E L R E Q V T E K T L R E V P	118
PPSMV	- -	1
HPV	V T N S E - - - - - - R L N N N K K N N K T Q R F K L F -	69
p3	I S D S Y V L K V V S N L Q A T T V Q N V V S F N K - - A	145
PPSMV	- -	1
HPV	- - - T F D I I V I P G L K P N K S K N V V S Y N R F M A L	96
p3	C A V M S F N I L R H T T D E M Y D W T K N E Y V S L G L K	175
PPSMV	- -	1
HPV	C I G M - - - I C Y H K K W K V F N W S N K R Y E D - N K N	122
p3	E K A A K V N P N I I N R L A G Q I N L S P Q S P Y Y Y L V	205
PPSMV	- -	1
HPV	T I N F N E D D D F M N K L A M S A G F S K E H K Y H W F Y	152
p3	T P G Y E F L Y D A Y P A E T I A M T L V K M A Y R K T M N	235
PPSMV	- -	23
HPV	S T G F E Y T F D I F P A E V I A M S L F R W S H R V E L K	182
p3	L P D S M K D S D I C S S L N A K I N K R H N L A V N N I D	265
PPSMV	- -	53
HPV	I P E K I S N Q D I V Q S L T A K M N K F H G L E T S T F K	206
p3	D I I K Q I G K K H I E D M Y N T L T Q N I A M S G K E S R	295
PPSMV	- -	83
HPV	D A V A V V G L E N I K A A Y Q A M S S S V G E T G R T R R	236
p3	N V E T A Q S F L A L I E S F K T T T - - - - - - - - -	314
PPSMV	- -	100
HPV	A A I V L A G F E E L L K S L K E - - - - - - - - -	266
p3	- -	314
PPSMV	- -	100
HPV	I D G E -	270

Abb. 3.42: Identitätsvergleich des p3 aus symptomatischen Ebereschens mit den bislang in der Datenbank zugänglichen Aminosäuresequenzen des putativen N-Proteins des High Plains Virus (HPV) (U60141) und des nicht charakterisierten, durch die RNA 5 kodierten Proteins des Pigeon Pea Sterility Mosaic Virus (PPSMV) (AJ439561). Identische Aminosäuren sind grau unterlegt.

Im N-terminalen Bereich zeigt das Protein p3 zudem eine möglicherweise funktional bedeutende 'low-complexity'-Region, wie sie auch bei den Tenuiviren, hier jedoch C-terminal, zu finden ist (Abb. 3.43). Die Region von 14 AA ist reich an basischen Lysinresten.

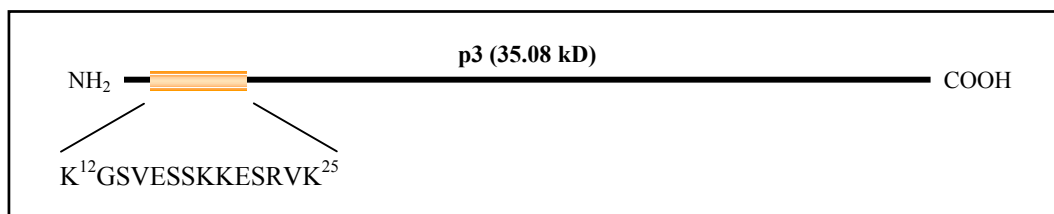


Abb. 3.43: Das p3 zeigt im N-terminalen Bereich eine 'low-complexity'-Region (Orange).

3.5.4 RNA 4

RNA 4 ist mit 1.348 nt die kürzeste identifizierte putativ virale RNA. Sie kodiert ebenfalls für ein einziges Protein (p4). Dieses hat eine Größe von 26,86 kD (ORF: 146-844 nt, 233 AA) (Abb. 3.45). In der Datenbank des NCBI konnten jedoch keine Homologien zu bereits bekannten viralen Proteinen gefunden werden.

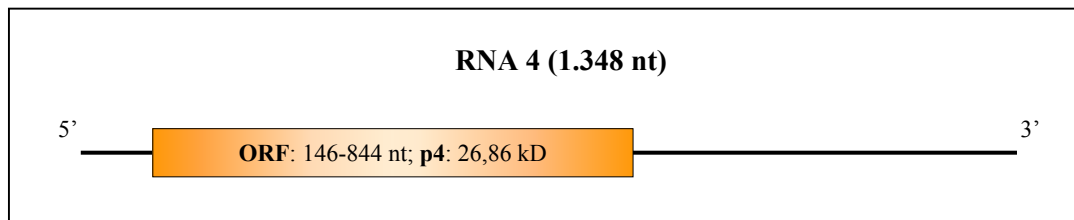


Abb. 3.45: Schematische Darstellung der RNA 4.

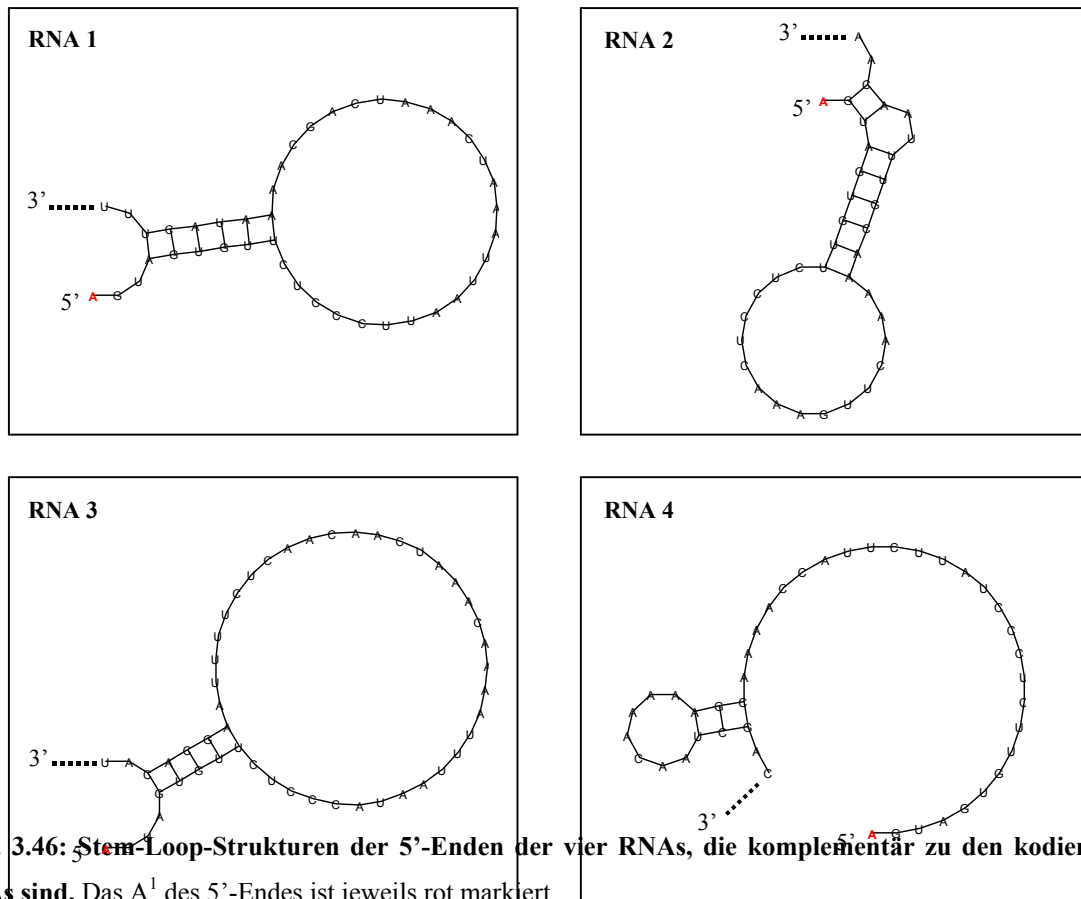
3.5.5 Vergleich der Terminussequenzen der vier RNAs

Ein Vergleich der Terminussequenzen der vier putativ viralen RNAs zeigte eine Übereinstimmung der letzten 13 Nukleotide. Die 3'- und 5'-Enden waren, abgesehen von 2 nt, bei RNA 4 4 nt, komplementär zueinander (Abb. 3.45). Die Länge dieser Termini war für die einzelnen RNAs unterschiedlich und reichte von 19 nt (RNA 1) bis 23 nt (RNA 4) (Abb. 3.45).

RNA 1	5'	AGU	AGU	GUU	CUC	CCU	UAA	U...
	3'	TCA	TCA	CUU	GAG	GGA	AUU	A...
RNA 2	5'	AGU	AGU	GUU	CUC	CTC	AAA	GT...
	3'	TCA	TCA	CUU	GAG	GAG	UUU	CA...
RNA 3	5'	AGU	AGU	GUU	CUC	CCA	UAA	UUU...
	3'	TCA	TCA	CUU	GAG	GGU	AUU	AAA...
RNA 4	5'	AGU	AGU	GUU	CUC	CCU	AGA	CUU AC...
	3'	TCA	TCA	CUU	GAG	GGA	UAA	GAA UG...

Abb. 3.45: Komplementäre Terminussequenzen der vier identifizierten putativ viralen RNAs. Die letzten 13 Nukleotide der vier RNAs sind konserviert. Komplementäre Nukleotide sind fett markiert. Graue Positionen vermögen keine Basenpaarung einzugehen.

Die 5'-Enden der 'negative sense'-orientierten vRNAs der *Bunyaviridae* zeigen 'Stem-Loops' (SL), die vermutlich eine Rolle bei der Initiation der Enkapsidierung spielen. Betrachtet man die 5'-Enden der RNAs, die komplementär zu den vier identifizierten kodierenden RNAs sind, so kann man auch hier solche SL-Strukturen erkennen (Abb. 3.46).



3.6 Anreicherung von Nucleocapsiden

Aufgrund erster Hinweise auf eine Verwandtschaft des putativen Virus der Eberesche mit den *Bunyaviridae* wurde versucht, virale Nucleocapside aus symptomatischem Blattgewebe anzureichern.

Die Aufreinigung wurde nach zwei verschiedenen klassischen Protokollen zur Isolierung von *Tospovirus*-Nucleocapsiden von Roggero *et al.* (1998) und Kellmann *et al.* (2001) durchgeführt.

3.6.1 Anreicherung von Nucleocapsiden nach Kellmann *et al.* (2001)

Zunächst wurde versucht, Nucleocapside nach dem Verfahren von Kellmann *et al.* (2001) anzureichern. Hierbei wurde nach dem Aufschluss der Zellen mit flüssigem Stickstoff der Zellextrakt zunächst durch ein Sucrosekissen sedimentiert und anschließend in einer CsSO₄-Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert. Die Nucleocapside konzentrieren sich dabei in einer lichtbrechenden, UV-absorbierenden Zone.

Der Erfolg der Aufreinigung aus Blättern symptomzeigender und symptomfreier Ebereschen wurde mittels RT-PCR unter Verwendung der RNA 1-spezifischen Primer 261RP und 12FP, die ein Amplifikationsprodukt von 402 bp ergeben, überprüft. Hierfür wurde jedoch die RNA zunächst von den Nucleocapsidproteinen mittels Phenol/Chloroform-Extraktion abgetrennt. Dabei wurde getestet, ob die vorherige Zugabe von 1 % SDS, wie es bei Cortez *et al.* (2002) beschrieben wird, der Trennung förderlich ist oder nicht.

Abb. 3.47 zeigt das Ergebnis der RT-PCR. Es konnte sowohl unter Verwendung von 1 % SDS, als auch ohne die vorherige Zugabe der Substanz, in den Proben der symptomzeigenden Ebereschenblätter ein starkes PCR-Produkt der erwarteten Größe erhalten werden. Aber auch in den symptomfreien Proben wurde eine schwache Bande auf gleicher Höhe detektiert.

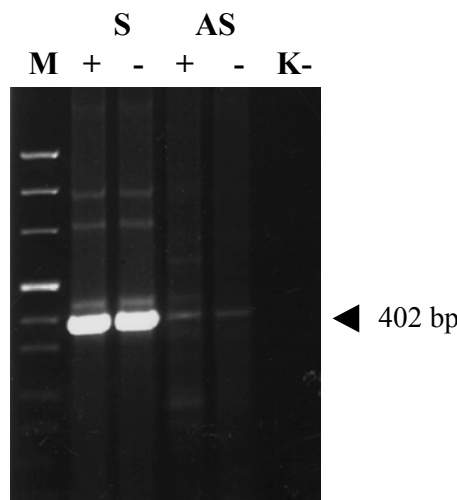


Abb. 3.47: RT-PCR mit angereicherter vRNA aus symptomatischen (S) und asymptomatischen (AS) Ebereschen unter Verwendung der Primerkombination 261RP/12FP. Zur Abtrennung der vRNA aus den nach dem Verfahren von Kellmann *et al.* (2001) angereicherten Nucleocapsiden wurden die Proben für die Phenol/Chloroform-Extraktion direkt (-) oder mit vorheriger Behandlung durch 1 % SDS (+) eingesetzt. **M:** pUC Mix Marker (MBI), **K-:** Wasserkontrolle.

In einem weiteren Versuch sollte überprüft werden, ob sich sowohl bei Einsatz eines 'Forward'- als auch eines 'Reverse'-Primers für die Reverse Transkription PCR-Produkte amplifizieren lassen. Hierfür wurden als Primer die RNA 2-spezifischen Oligonukleotide 368 und 658, die ein Fragment von 300 bp ergeben, verwendet. Wie in Abb. 3.48 dargestellt,

konnte das spezifische Produkt in beiden Fällen erhalten werden. Dies spricht dafür, dass sich in der Fraktion RNAs beider Polarität anreichern.

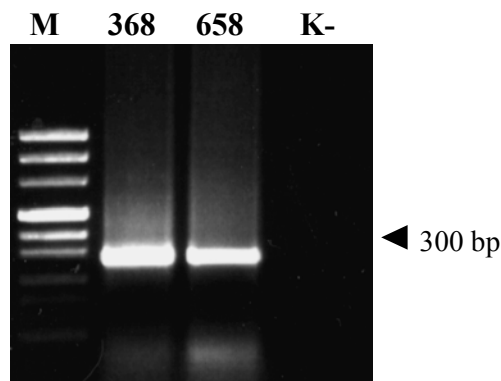


Abb. 3.48: RT-PCR mit angereicherter vRNA aus symptomatischen Ebereschen unter Verwendung der RNA 2-spezifischen Primerkombination 368/658. Die einzelnen Primer wurden in zwei Ansätzen jeweils als Erststrangprimer eingesetzt. Die putative vRNA wurde aus einer Nucleocapsid-Anreicherung nach Kellmann *et al.* (2001) gewonnen. **M:** pUC Mix Marker (MBI), **K-:** Wasserkontrolle.

3.6.2 Anreicherung von Nucleocapsiden nach Roggero *et al.* (1998)

Es sollte in einem zweiten Ansatz untersucht werden, ob sich das durch den Verzicht auf die CsSO₄-Gradientenzentrifugation im Vergleich zu Kellmann *et al.* (2001) wesentlich kürzere Protokoll nach Roggero *et al.* (1998) ebenfalls zur Anreicherung von viralen Nucleocapsiden aus Ebereschenblättern eignet. Dies wurde ebenfalls ausgehend von der durch Phenol/Chloroform-Extraktion abgetrennter vRNA mittels RT-PCR unter Verwendung der RNA 1-spezifischen Primer 261RP und 12FP überprüft.

Das erwartete Produkt von 402 nt konnte sowohl in Proben symptomzeigender als auch symptomfreier Ebereschen detektiert werden (Abb. 3.49, Spuren S und AS). In Letzterer war die Bande im Agarosegel jedoch um ein Vielfaches schwächer.

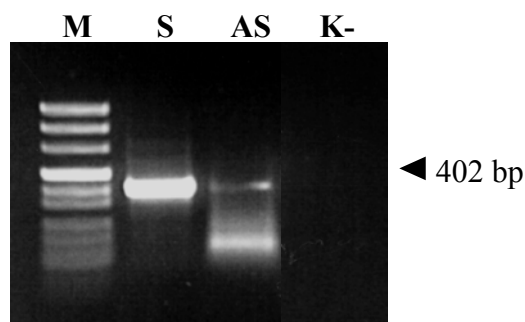


Abb. 3.49: RT-PCR mit angereicherter vRNA aus symptomatischen (S) und asymptomatischen (AS) Ebereschen unter Verwendung der Primerkombination 261RP/12FP. Die putative vRNA wurde aus einer Nucleocapsid-Anreicherung nach Roggero *et al.* (1998) gewonnen. **M:** pUC Mix Marker (MBI), **K-:** Wasserkontrolle.

3.6.3 Proteinanalyse der angereicherten Nucleocapsid-Fraktion in einer SDS-PAGE

Die unter Verwendung des Protokolls von Roggero *et al.* (1998) angereicherten Nucleocapside wurden in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.50). In Proben symptomzeigender Ebereschen konnte bei etwa 35 kD ein Protein detektiert werden, das in den Proben nichtsymptomzeigender Pflanzen mit der sensitiven Silberfärbung nicht nachzuweisen war.

Da sich durch Sequenzanalysen eine Homologie des durch die RNA 3 codierten 35,08 kD-Proteins p3 zu dem Hüllprotein des High Plains Virus (3.5.3, Abb. 3.42) nachweisen ließ, könnte es sein, dass es sich hierbei um das Nucleocapsidprotein handelt.

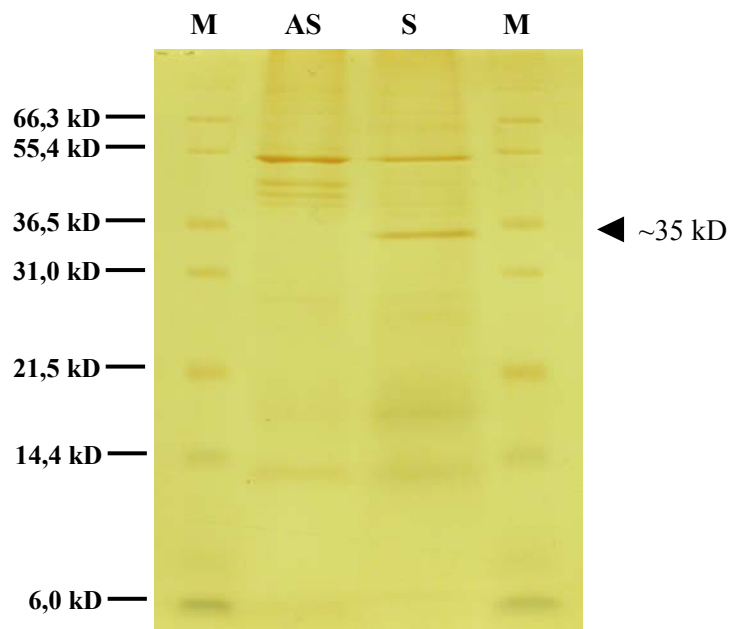


Abb. 3.50: SDS-PAGE von Proben einer Nucleocapsid-Anreicherung nach Roggero *et al.* (1998). Die Proteine wurden in einem 15 %igen Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung detektiert. Es wurden Blattproben symptomatischer (S) und asymptomatischer (AS) Ebereschen eingesetzt. M: Mark 12TM Wide Range Protein Standard (Novex).

3.7 Isolierung von Viruspartikeln

Aufgrund der beobachteten Ähnlichkeiten des putativen Virus der Eberesche mit den *Bunyaviridae*, wurde versucht, Viruspartikel nach einem Protokoll für Tospoviren von Kikkert *et al.* (1998) anzureichern.

Nach einer Sucrose-Gradientenzentrifugation konnte bei der Probe aus symptomatischem Blattmaterial im oberen Drittel des Röhrchens eine lichtbrechende Zone detektiert werden, die in der Probe asymptomatischen Gewebes nicht auftrat (Abb. 3.51).

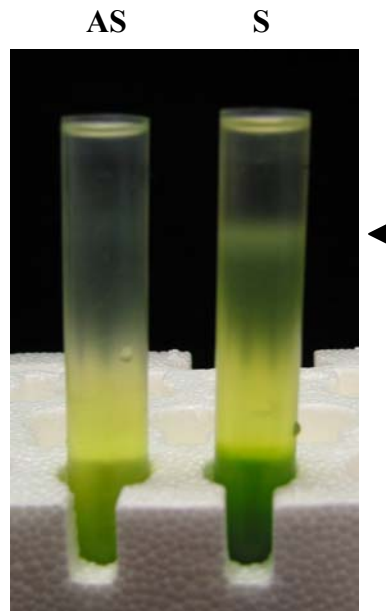


Abb. 3.51: Sucrose-Gradientenzentrifugation einer Viruspartikel-Aufreinigung nach Kikkert *et al.* (1998) unter Verwendung von Blättern symptomatischer (S) und asymptomatischer (AS) Ebereschen. Der Pfeil markiert die lichtbrechende Zone, in der sich die Partikel anreichern.

3.7.1 RT-PCR mit diagnostischen Primern

In einer RT-PCR konnten unter Verwendung der diagnostischen Primer (3.10) alle vier RNAs in der lichtbrechenden Fraktion der Sucrose-Gradientenzentrifugation detektiert werden (Abb. 3.52, Spuren 1-4). In der entsprechenden Fraktion der asymptomatischen Ebereschen wurde hingegen kein RNA 1-spezifisches Amplifikationsprodukt erhalten (Abb. 3.52, Spur 5).

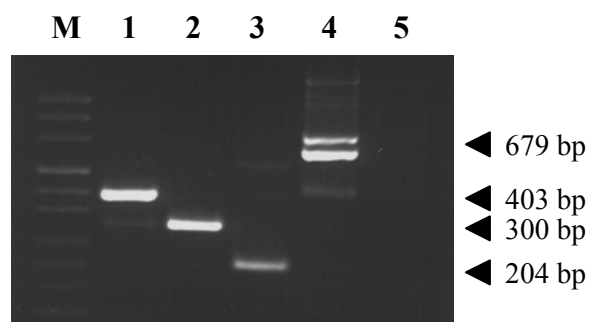


Abb. 3.52: RT-PCR zum Nachweis der vier putativ viralen RNAs in der lichtbrechenden Fraktion der Viruspartikel-Aufreinigung aus symptomatischen Ebereschenblättern (Spuren 1-4). M: pUC Mix Marker (MBI), Spur 1: RNA 1, 261RP/12FP, Spur 2: RNA 2, 658/378, Spur 3: RNA3, 1071.1/1071.2, Spur 4: RNA 4, 4.349/83.1, Spur 5: entsprechende Fraktion aus der Aufarbeitung von asymptomatischem Material, 261RP/12FP.

3.7.2 SDS-PAGE

Die bei der Sucrose-Gradientenzentrifugation in der lichtbrechenden Fraktion angereicherten Proteine wurden in verschiedenen Verdünnungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.53).

Auf der Höhe von etwa 35 kD, welches der Größe des putativen Nucleocapsidproteins entspricht, konnte in den Proben symptomatischen Blattmaterials ein Protein sehr hoher Konzentrationen detektiert werden. In der entsprechenden Fraktion der asymptomatischen Ebereschen wurde dieses hingegen nicht nachgewiesen.

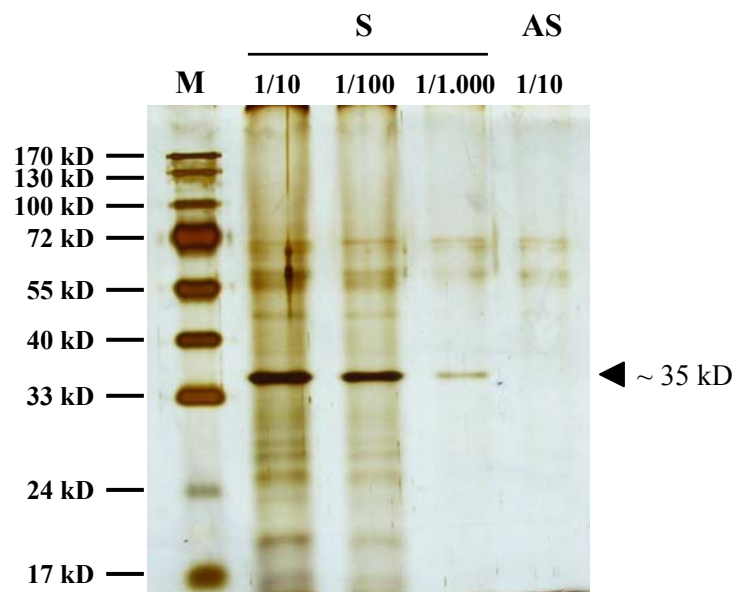


Abb. 3.53: SDS-PAGE der Proteine, die sich bei der Sucrose-Gradientenzentrifugation einer Viruspartikelaufreinigung nach Kikkert *et al.* (1998) unter Verwendung von Blättern symptomatischer (S) und asymptomatischer (AS) Ebereschen in einer lichtbrechenden Fraktion angereichert haben. Die aus etwa 100 g gewonnene Fraktion wurde nach der Sedimentation in einem Volumen von 150 µl aufgenommen. Auf dem Gel wurden jeweils 5 µl einer 1/10, 1/100 und 1/1,000 Verdünnung aufgetragen. Die Proteine wurden in einem 12 %igen Gel aufgetrennt und in einer Silberfärbung detektiert.

3.8 Serologischer Nachweis des putativ viralen Glykoproteins G1

Um in Viruspräparationen das putative Glykoprotein G1, das in die Virushülle integriert sein sollte, nachzuweisen, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen ein synthetisiertes Peptid der abgeleiteten Proteinsequenz (p2) der RNA 2 hergestellt.

3.8.1 Ermittlung des Peptid-Antigens

Bei der Ermittlung eines geeigneten Peptids zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers wurde die Software Protean (Lasergene, DNASTAR) verwendet. Hierbei wird auf Basis der Hydrophilität die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass sich ein Bereich des nativen Proteins an der Oberfläche befindet und somit angreifbar für einen Antikörper ist.

Die nachstehende Abb. 3.54 zeigt die Lage der gewählten Antigen-Region des p2 bzw. G1-Proteins. An die spezifische Aminosäuresequenz wurde auf Anraten der Firma SeqLab (Göttingen), die die Peptidsynthese sowie die Immunisierung durchgeführt haben, N-terminal ein zusätzlicher Cysteinrest angefügt.

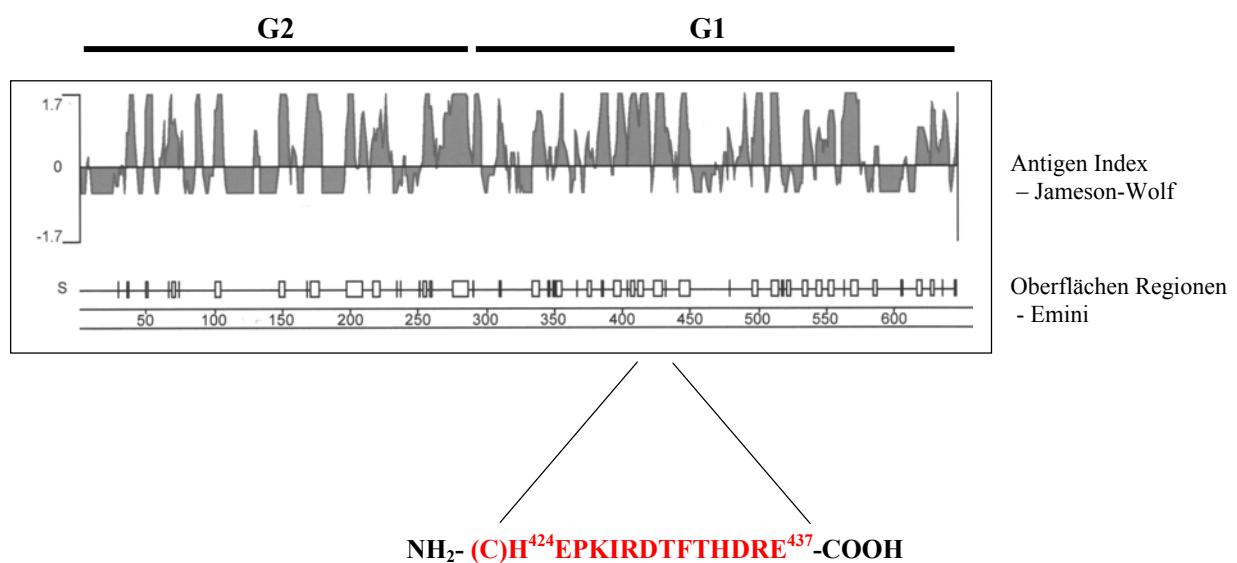


Abb. 3.54: Antigen-Analyse unter Verwendung des Programms Protean (Lasergene, DNASTAR) zur Ermittlung eines geeigneten Peptids für die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen das putative Glykoprotein G1. An das Peptid wurde N-terminal bei der Synthese ein zusätzlicher Cysteinrest angehängt.

3.8.2 Spot Blot-Analyse des G1-spezifischen Antikörpers

Zunächst wurde das Antiserum sowie das Präimmunserum in einer Verdünnung von 1:1.500 in einem Spot-Blot gegen verschiedene Konzentrationen des synthetisierten G1-Peptids **CHE PKI RDT FTH DRE** (1,8 kD) getestet (Abb. 3.55). Da die Bindung von kleineren Proteinen (<14 kD) auf der Nitrocellulosemembran aufgrund der Porengröße jedoch nicht besonders gut ist und die aufgetragene Menge an Peptid somit nicht vollständig gebunden bleibt, konnte auf diese Weise nur die Spezifität des Antikörpers, aber keine Sensitivitätsgrenze ermittelt werden.

Der Vergleich des Antiserums mit dem Präimmunserum zeigte, dass nur das Antiserum mit dem G1-spezifischen Peptid reagiert (Abb. 3.55).

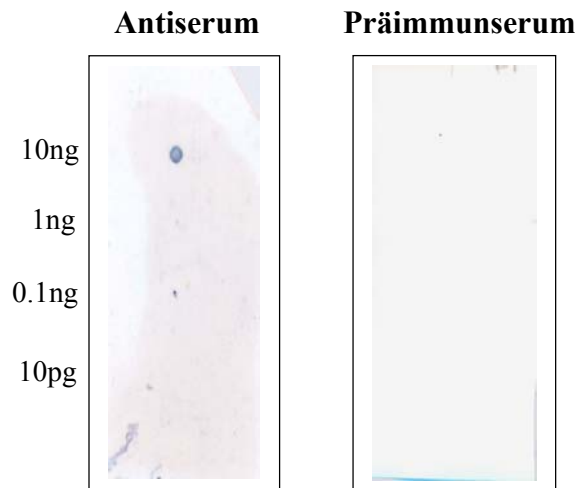


Abb. 3.56: Spot Blot-Analyse zur Überprüfung der Spezifität des Antiserums bezüglich des synthetischen G1-spezifischen Peptids. Das Peptid wurde jeweils in vier Konzentrationen aufgegeben.

3.8.3 SDS-PAGE von Gesamtproteinextrakten

In Western-Blot-Analysen mit Gesamtproteinextrakten aus Blättern und Rinde von symptomatischen und asymptomatischen Ebereschen sowie aus Blättern zweier krautiger Kontrollpflanzen (*Abutilon spec.*, *Euphorbia pulcherrima*) sollte die Spezifität des polyklonalen Peptid-Antikörpers gegen das putative G1-Protein (51,55 kD) (3.5.2) überprüft werden.

In einem 10-12 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden daher entsprechende Extrakte aufgetrennt und mittels Silberfärbung detektiert. Hierbei wurde versucht, äquivalente Mengen an Protein von etwa 2 µg aufzutragen.

Es ließen sich jedoch auf Höhe des putativen G1-Proteins von etwa 51,6 kD keine Unterschiede zwischen den Gesamtprotein-Proben symptomatischer und asymptomatischer Ebereschen feststellen (Abb. 3.56, Spuren S und AS).

Auffallend ist jedoch eine zusätzliche Proteinbande auf Höhe des putativen Nucleocapsidproteins von etwa 35 kD in den Blattextrakten symptomatischer Ebereschen. (Abb. 3.56, Spur S Blatt).

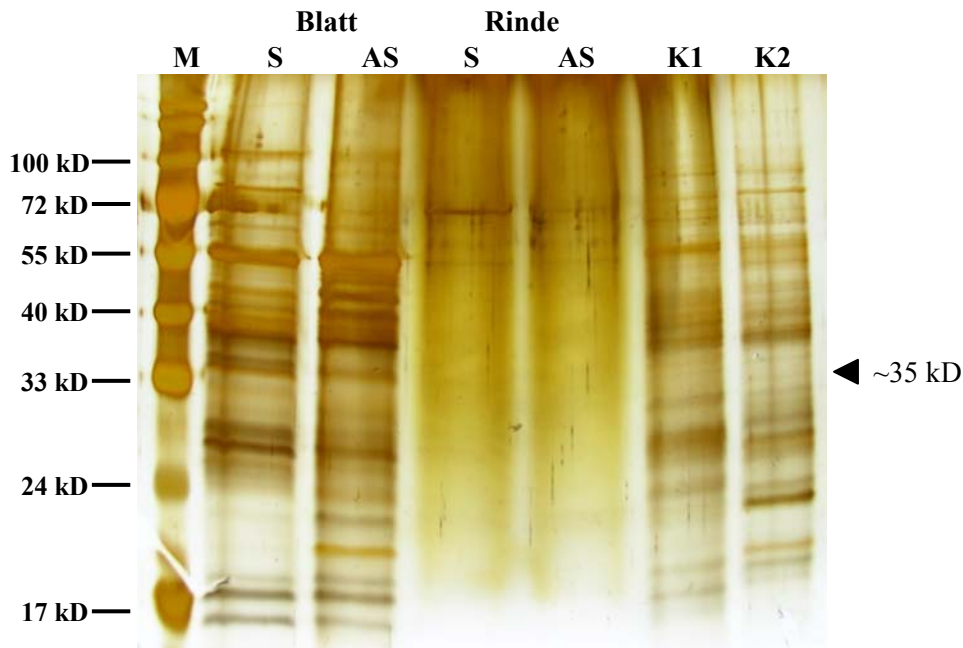


Abb. 3.56: Auftrennung von Gesamtproteinextrakten aus Blättern und Rinde symptomatischer (S) und asymptomatischer (AS) Ebereschen sowie aus Blättern zweier krautiger Kontrollpflanzen in der SDS-PAGE mit einem Gradienten von 10-12 %. Die Proteine wurden mittels Silberfärbung detektiert. M: Prestained Protein Ladder (MBI), K1: *Abutilon spec.*, K2: *Euphorbia pulcherrima*

3.8.4 Western Blot-Analyse

In Western-Blot-Analysen wurde das Antiserum sowie das Präimmunserum unter Verwendung von etwa 2 µg Gesamtproteinextrakt aus Rinde und Blättern symptomatischer und asymptomatischer Ebereschen sowie aus Blattproben zweier krautiger Kontrollpflanzen (*Abutilon spec.*, *Euphorbia pulcherrima*) getestet (Abb. 3.57).

Das putative G1-Protein sollte nach vorherigen Analysen der Aminosäuresequenz eine Größe von 51,55 kD haben (3.5.2). Auf der Nitrocellulosemembran konnte mit dem Antiserum bei Proben symptomzeigender Ebereschenblätter ein Protein dieser Größenordnung detektiert werden (Abb. 3.57, Spur S Blatt). Zudem wurde hier eine schwache Bande bei etwa 75 kD nachgewiesen, die auch in der Rindenprobe symptomatischer Pflanzen zu beobachten war (Abb. 3.57, Spuren S Blatt und S Rinde). Dieses würde in etwa der Größe des putativen Glykoproteinprecursors (p2) entsprechen.

In den Proteinextrakten der beiden krautigen Kontrollpflanzen konnte mit dem Antiserum keine Reaktion mit pflanzlichen Proteinen beobachtet werden (Abb. 3.57, Spuren K1 und K2).

Mit dem Präimmunserum wurden in der Blattprobe symptomatischer Ebereschen keine Proteine nachgewiesen (Abb. 3.58).

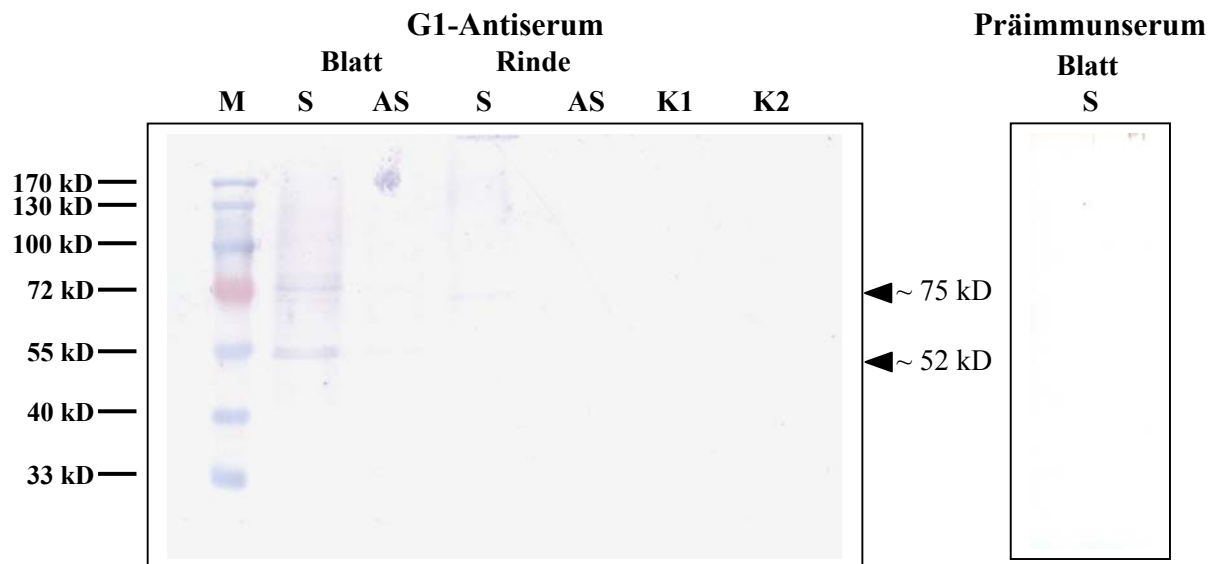


Abb. 3.57: Western-Blot-Analyse mit Gesamtproteinextrakten aus Blättern und Rinde symptomatischer (S) und asymptomatischer (AS) Ebereschen unter Verwendung des Antiserums gegen das putative G1-Protein. Die Proteine wurden in einem 10-12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. M: Prestained Protein Ladder (MBI), K1: Blattextrakt aus *Abutilon spec.*, K2: Blattextrakt aus *Euphorbia pulcherrima*. Das Präimmunserum wurde ausschließlich mit Proteinextrakt aus Blättern symptomatischer Ebereschen getestet.

In einem weiteren Western-Blot, der im Anschluss an die Viruspartikel-Anreicherung (3.7) gemacht wurde, konnten weder in den Proben asymptomatischer noch symptomzeigender Ebereschen ein Protein der Größe des putativen Glykoproteins G1 beobachtet werden (Abb. 3.58). Es ist lediglich eine schwache Kreuzhybridisierung des Antiserums mit dem putativen Nucleocapsidprotein zu beobachten (Abb. 3.58, Spuren S 1/10 und S 1/100).

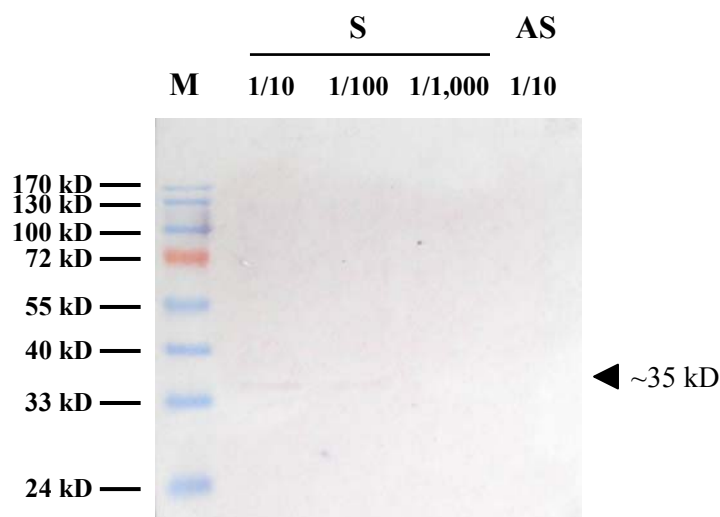


Abb. 3.58: Western-Blot-Analyse der in der lichtbrechenden Fraktion der Sucrosegradienten-Zentrifugation einer Viruspartikel-Aufarbeitung angereicherten Proteine mit dem G1-Antikörper. Die aus etwa 100 g Blattmaterial symptomatischer (S) und asymptomatischer (AS) Ebereschen gewonnene Fraktion wurde nach der Sedimentation in einem Volumen von 150 µl aufgenommen. Auf dem 12 %igen Gel wurden jeweils 5 µl einer 1/10, 1/100 und 1/1,000 Verdünnung aufgetragen.

3.9 Detektion von Glykoproteinen in Gesamtproteinextrakten aus Ebereschen

Da der von RNA 2 kodierte putative Proteinprecursor sechs potentielle Glykosylierungsstellen aufweist (3.5.2), wurden die Gesamtproteinextrakte von Rinde und Blättern symptomatischer und asymptomatischer Ebereschen sowie die Blattextrakte zweier krautiger Kontrollpflanzen (*Abutilon spec.*, *Euphorbia pulcherrima*) speziell auf Glykoproteine hin untersucht.

Hierfür wurden die Proben zunächst in einem 8-16 %igen SDS-Polyacrylamigel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und die Zuckerseitenketten mit Hilfe des 'Dig Glycan Detection Kits' (Roche) detektiert.

Auf der Höhe des putativen G1 von etwa 51,6 kD konnte jedoch nur bei Rindenproben von Ebereschen ein Signal erhalten werden (Abb. 3.59). Dieses war bei Proben asymptomatischer Bäume deutlich schwächer. Zudem konnte hier in symptomatischem Gewebe ein Glykoprotein der Größe von etwa 65 kD detektiert werden. Das Bandenmuster der beiden Extrakte aus Ebereschenblättern unterscheidet sich im Wesentlichen nur dadurch, dass bei dem Extrakt der infizierten Pflanze eine zusätzliche nichtglykosylierte Bande von etwa 75 kD auffällt (Abb. 3.59, Spur S Blatt).

Somit war lediglich in Rindenproben der symptomatischen Ebereschen ein Hinweis auf die Anwesenheit eines Glykoproteins der gesuchten Größe von etwa 52 kD erhalten worden.

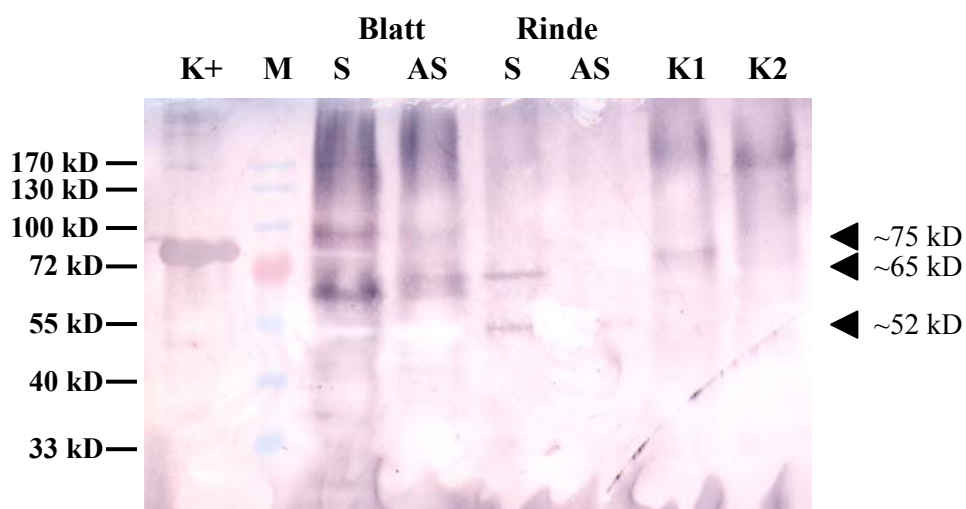


Abb. 3.59: Nachweis von Glykoproteinen in Blatt- und Rindenproben symptomatischer (S) und asymptomatischer (AS) Ebereschen. M: Prestained Protein Ladder (MBI), K+: 100 ng Transferrin, K1: Blattextrakt aus *Abutilon spec.*, K2: Blattextrakt aus *Euphorbia pulcherrima*

3.10 Diagnostische RT-PCR

Auf Basis der erhaltenen Sequenzinformationen zu den einzelnen putativ viralen RNAs konnte eine Diagnostische RT-PCR etabliert werden.

Mit hochspezifischen Primerpaaren (Tab. 3.2) wurden alle vier viralen RNAs 1-4 in dem gleichen pflanzlichen Blatt- bzw. Rindengewebe symptomatischer Ebereschen nachgewiesen (Abb. 3.60, Spuren 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 11). In asymptomatischen Pflanzen konnten, wenn überhaupt, nur sehr geringe Konzentrationen detektiert werden (Abb. 3.60, Spuren 3, 6, 9 und 12).

Tabelle 3.2: Primerkombinationen der Diagnostischen RT-PCR

	Primer 1	Primer 2	optimale Annealing [°C]	Produktgröße [bp]
RNA 1	261RP	12FP	52	403
RNA 2	658	378	53	300
RNA 3	107.1.1	107.2	53	204
RNA 4	4.349	83.1	56	679

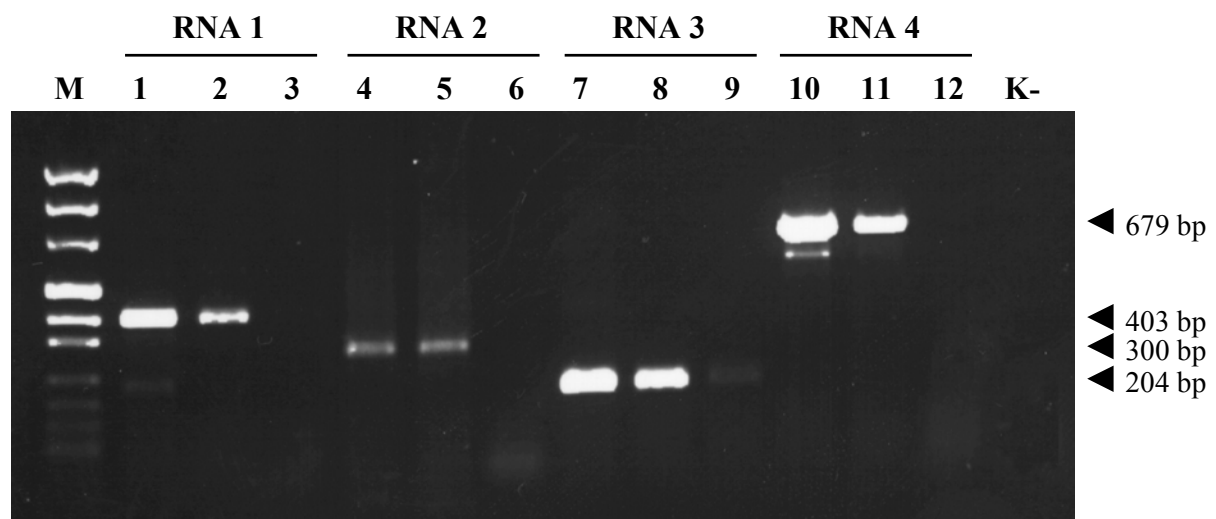


Abb. 3.60: Diagnostische RT-PCR. Nachweis der vier putativ viralen RNAs in Blatt (Spuren 1, 4, 7 und 10) und Rinde (Spuren 2, 5, 8 und 11) von symptomatischen Ebereschen mit sequenzspezifischen Primerpaaren (Tab. 3.2). Als Ausgangsmaterial wurde Gesamt-RNA verwendet. M: pUC Mix Marker (MBI), Spuren 3, 6, 9, 12: Blätter asymptomatischer Ebereschen, K-: Wasserkontrolle.

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnten auf der Basis erster Hinweise von Benthack (2001) vier putativ virale RNAs erhalten werden. Aufgrund der Sequenzanalysen stehen diese in Verdacht, zu einem neuen phytopathogenen Virus zu gehören, das mit der Ringfleckigkeit der Eberesche assoziiert ist. In der nachfolgenden Diskussion werden die einzelnen RNAs daher nur noch als 'virion' (v)RNA bzw. 'virion copy' (vc)RNA bezeichnet, auch wenn die Koch'schen Postulate bislang nicht erfüllt sind.

4.1 Experimentelle Strategien

4.1.1 Etablierung einer RACE

Die Isolierung von intakter, hochmolekularer und möglichst reiner RNA ist ein essentieller Schritt für die Amplifikation von cDNA-Enden und den Erhalt von 'full-length'-cDNA-Klonen. Von verschiedensten Firmen stehen Kits und Extraktionslösungen zur Anreicherung von Gesamt-RNA zur Verfügung. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete TRIzol[®] Reagent der Firma Invitrogen führte jedoch nicht zur erfolgreichen Isolierung von Gesamt-RNA aus Ebereschengewebe. Grund hierfür kann die Tatsache sein, dass die Aufreinigung von Nukleinsäuren aus pflanzlichen Geweben häufig durch einen hohen Gehalt an Sekundärmetaboliten erschwert wird. In diesem Zusammenhang sind insbesondere Polyphenole und Polysaccharide zu nennen. Phenolische Verbindungen wie Tannine binden an Nukleinsäuren und können dann nicht mehr durch herkömmliche Extraktionsverfahren abgetrennt werden (Newbury und Possingham, 1977; Maliyakal, 1992). Um diesem entgegen zu wirken kann dem Extraktionspuffer Polyvinylpyrrolidon zugesetzt werden. Diese Substanz bildet durch Wasserstoffbrücken Komplexe mit den Polyphenolen, die sich vom Homogenat abtrennen lassen. Hohe Konzentrationen an Polysacchariden stellen ebenfalls ein Problem dar, da sie mit Nukleinsäuren copräzipitieren und somit die Probe verunreinigen. Durch einen zusätzlichen Fällungsschritt, bei dem die Polysaccharide mit 10 % Ethanol abgetrennt werden, kann diese Schwierigkeit ebenfalls beseitigt werden.

Das Extraktionsverfahren von Wang *et al.* (2000) wurde speziell für solche sekundärstoffreichen Gewebe entwickelt. Dem Autor gelang es mit dieser Methode aus Nadeln und Rinde von Fichten große Mengen intakter Gesamt-RNA von etwa 90-950 µg/g Frischgewicht zu isolieren, die sich zudem durch eine geringe Kontamination auszeichnet. Auch die Eberesche besitzt eine hohe Konzentration an Polysacchariden und phenolischen

Verbindungen. Ihre Rinde enthält sogar mehr Phenole als die der Eiche, die als offizinelle Gerbstoffdroge im Deutschen Arzneibuch geführt wird. Dennoch wurden aus Ebereschenblättern und -rinde nach dem Protokoll von Wang *et al.* (2000) nur zwischen 16 und 25 µg Gesamt-RNA pro g Frischgewicht erhalten. Und auch das Verhältnis Abs.₂₆₀/Abs.₂₈₀ war deutlich schlechter, was auf eine noch zu starke Verunreinigung der Proben schließen lässt.

Ein weiteres Verfahren zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde von Boom *et al.* (1990) entwickelt und basiert auf der Beobachtung, dass in Gegenwart von hohen Konzentrationen an chaotropen Reagenzien Nukleinsäuren mit großer Affinität an Silica-Partikel binden. Die Autoren extrahierten mit dieser Methode verschiedenste Nukleinsäuren aus menschlichem Serum und Urin. Rott und Jelkmann (2001) wendeten dieses Extraktionsverfahren mit einigen Modifikationen bei der Isolierung von Gesamt-RNA aus Kirschbäumen an und konnten somit mehrere Viren bzw. ihre RNA mittels RT-PCR in den Pflanzen nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Protokoll erneut modifiziert. So wurde zum einen dem Extraktionspuffer 2,5 % PVP zugesetzt, um die störenden Polyphenole zu entfernen und zum anderen wurde das Verfahren für eine optimale Entfernung von Proteinen, und somit auch RNasen, durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung ergänzt. Hiermit war es möglich, hochreine, intakte Gesamt-RNA aus Ebereschenblättern sowie -rinde mit einer Konzentration von durchschnittlich 200-400 µg/g Frischgewicht zu isolieren, die ein ideales Template zur Amplifikation von virusspezifischer cDNA darstellte.

Das Verfahren der 'Rapid Amplification of cDNA Ends' (RACE) ermöglicht es, ausgehend von einem kurzen bekannten Sequenzabschnitt, die Enden einer cDNA zu amplifizieren. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen der 3'- und der 5'-RACE. In der 3'-RACE, die zum Erhalt des 3'-Endes einer polyadenylierten (m)RNA führt, wird die Erststrangsynthese mit einem Oligo(dT)-Primer durchgeführt und in einer anschließenden PCR-Reaktion durch einen sequenzspezifischen Primer (SSP) ergänzt. Die 5'-RACE geht hingegen von einer Reversen Transkription mit einem SSP aus. Das 3'-Ende dieser Erststrang-cDNA wird dann häufig durch ein 'homopolymer tailing' unter Verwendung der Terminalen Desoxyribonukleotidyl-Transferase (TdT) (Frohmann *et al.*, 1988; Ohara *et al.*, 1989) oder auch durch die Ligation eines Oligonukleotids (Dumas Milne Edwards *et al.*, 1991; Liu und Gorovsky, 1993) modifiziert. Die darauf folgende PCR wird dann meist mit einem 'nested'-SSP und einem Primer, der an das modifizierte Ende binden kann, durchgeführt. Desweiteren stehen zahlreiche Kits verschiedenster Firmen (u.a. Clontech, Invitrogen, Roche) zur Verfügung.

Um zu überprüfen, ob die kodierende putativ virale RNA polyadenyliert ist, wurde zunächst eine 3'-RACE durchgeführt. Wie auch schon von Benthack (2001) beobachtet, konnte kein spezifisches Amplifikationsprodukt erhalten werden. Demnach scheint die vorliegende Sequenz keinen 'poly(A)-Schwanz' zu besitzen. Damit lässt sich die Zugehörigkeit des viralen Erregers der Eberesche zu diversen Virusfamilien ausschließen. Zahlreiche ss(+)RNA-Viren wie z.B. die Potyviren, Potexviren, Comoviren und Nepoviren zeichnen sich durch eine Polyadenylierung der genomischen RNA aus. Aber auch die Rhabdoviren, die eine 'negative sense'-Strategie verfolgen, verfügen über poly(A)-modifizierte mRNAs. Die codierende RNA des Virus der Eberesche scheint demnach eine andere translationsstabilisierende Modifikation zu besitzen. So ist für zahlreiche phyto- und tierpathogenen Viren eine t-RNA ähnliche Struktur charakteristisch. Andere, wie auch die ss(-)RNA-*Bunyaviridae*, zu deren RdRP die durch Benthack (2001) erhaltene Sequenz eine gewisse Homologie gezeigt hat, tragen an den 3'-Enden ihrer mRNAs A/U-reiche 'hairpin'-Strukturen (Bouloy *et al.*, 1990; Simons und Pettersson, 1991).

Die Etablierung der 5'-RACE zur Amplifikation der Enden der putativen vRNA und vcRNA war ein essentieller Schritt in der Identifikation des Erregers der Ringfleckigkeit der Eberesche. Die gängigen Verfahren der Polyadenylierung der Erststrang-cDNA, der Ligase-vermittelten Modifikation sowie die Verwendung des 'SMARTTM RACE'-Systems der Firma Clontech führten jedoch nicht zum Erhalt der cDNA-Enden. Vielmehr wurden hier eher zufällig Klone erhalten, die mit der putativ viralen Ausgangssequenz eine spezifische Überlappungsregion aufzeigten. Auch Benthack (2001) gelang es mit dem verwendeten Kit nicht, ein spezifisches PCR-Produkt zu amplifizieren. Die Verlängerung der zuvor durch eine RT-DOP-PCR ausgehend von viraler dsRNA erhaltenen Klone, war hier nur durch die unspezifische Bindung des SSP an eine zweite Stelle auf der RNA bzw. cDNA gegeben.

Von Schwierigkeiten bei der RACE wird von zahlreichen Autoren berichtet. So stellt ein Problem z.B. die TdT dar, Dumas Milne Edwards *et al.* (1991) berichten von einer geringen Effizienz des Enzyms. Des Weiteren neigen die anschließend verwendeten 'homopolymer tail'-tragenden Primer zur unspezifischen Anlagerung. Aber auch die Ligation eines Oligonukleotids an die Erststrang-cDNA ist schwierig und kann in der folgenden PCR zur unspezifischen Amplifikation führen. Ein erster Schritt zur Verbesserung der Spezifität stellt daher die Anreicherung spezifischer RNA bzw. cDNA dar. So wird das System mit biotinylierten Primern, die eine Anbindung an Streptavidin beschichtete Magnetpartikel erlauben, vielfach als erfolversprechend beschrieben (Espelund *et al.*, 1990; Tagle *et al.*, 1993; König, 1997). Der Vorteil hier ist, dass ohne Fällungsschritte, die immer auch einen

gewissen Mengenverlust nach sich ziehen, die Änderung der Reaktionsbedingungen schnell und einfach erzielt werden kann und zudem unspezifische Nukleinsäuren, an die der biotinylierte Primer nicht gebunden hat, einfach gewaschen werden können. Des Weiteren wird nach König (1997) eine spezifischere Amplifikation erzielt, wenn statt der Polyadenylierung die Anheftung eines 'poly(dG) tails' an die Erststrang-cDNA erfolgt. Und auch Flouriot *et al.* (1999) berichten, dass ein 'tailing' mit dCTP effizienter ist. So führte die Kombination dieser Beobachtungen auch in der vorliegenden Arbeit zum Erhalt der Enden der putativ viralen Ausgangssequenz und somit letztendlich zu einer RNA der Gesamtlänge von 7.040 nt (RNA 1). Allerdings muss eingeräumt werden, dass die Amplifikation längerer cDNAs bezüglich der resultierenden Konzentration an PCR-Produkt weniger effektiv ist, als die kürzerer Fragmente. Dies wird auch in der Arbeit von Raineri *et al.* (1991) berichtet. Die Autoren verwendeten hier in einer 3'-RACE einen biotinylierten Oligo-dT-Erststrangprimer und konnten bei der Amplifikation von Produkten bis 700 nt eine sehr viel höhere Ausbeute erzielen, als bei der PCR mit größeren spezifischen cDNAs von etwa 1,3 kb und 2,2 kb. Ob dieses an der Anbindung an die Magnetpartikel und den anschließenden Waschschritten liegt, bleibt zu klären.

4.1.2 Komplementäre Terminussequenzen und RT-PCR-Analysen mit hieraus abgeleiteten Primern

Die erhaltene Sequenz (RNA 1) wies komplementäre Enden von 19 nt auf. Solche Termini sind charakteristisch für einige Virusfamilien wie die *Bunyaviridae*, die sowohl phyto- als auch tier- und humanpathogene Vertreter beinhaltet, die tier- und humanpathogenen *Arenaviridae* und *Orthomyxoviridae* sowie das phytopathogene Genus *Tenuivirus*. Alle diese Virusgruppen besitzen ein ss(-)RNA-Genom, das segmentiert ist. Aber auch die Rhabdoviren, die nur eine einzige vRNA besitzen, verfügen über dieses Charakteristikum. Solche komplementären Enden sind innerhalb der einzelnen Gruppen über einen Bereich von meist 8–11 nt hochkonserviert und bewirken die Ausbildung einer 'panhandle'-Struktur. Diese kann im Elektronen-Kraftfeld-Mikroskop dargestellt werden (Kellmann *et al.*, 2001). Die Rolle, die diesen Termini zukommt, ist vielfach diskutiert und führte zu verschiedenen Modellen. Die 5'- und 3'-Enden der vRNAs scheinen Promotoren darzustellen, die die Transkription sowie die Replikation regulieren. Dies wurde bereits für einige dieser Viren wie die Bunyaviren Rift Valley Fever Phlebovirus (RVFV), Uukuniemi Phlebovirus (UUKV) und Bunyamwera Orthobunyavirus (BUNV) (Prehaud *et al.*, 1997; Flick *et al.*, 2002; Barr *et al.*, 2003; Barr und Wertz, 2004) oder auch für das Influenzavirus, *Orthomyxoviridae* (Fodor *et al.*, 1994, 1995;

Lee und Seong, 1996; Park *et al.*, 2003) gezeigt. Bei dem RVFV konnte der für die Transkription essentielle Bereich des 3'-Endes der vRNA sogar auf die Nukleotide 3-8 und 13 durch Mutagenese-Studien eingegrenzt werden (Prehaud *et al.*, 1997), bei UUKV auf die Positionen 2-4 und 8 (Flick *et al.*, 2002). Die Promotoraktivität dieser Bereiche scheint jedoch für die einzelnen vRNAs unterschiedlich zu sein. So beobachteten schon Pettersson und Kääräinen (1973) und Rossier *et al.* (1988), dass bei der Replikation von Bunyaviren mehr M-Genome als L- und S-RNAs synthetisiert werden und Barr *et al.* (2003) zeigten zum ersten Mal in Promotoranalysen des BUNV, bei denen die 3'- und 5'-nichttranslatierten Regionen (NTR) vor ein Luciferase-Gen geschaltet wurden, die von M- über L- nach S-RNA hin abnehmende Effizienz dieser Bereiche.

Betrachtet man die komplementären Regionen der Enden näher, so stellt man fest, dass in der Regel immer einige Nukleotide zu finden sind, die keine Basenpaarung mit dem anderen Ende eingehen können, so auch bei der in dieser Arbeit identifizierten RNA 1. Dadurch können in diesen Bereichen kurze Loops gebildet werden, von denen bekannt ist, dass sie bei Viren eine regulatorische Funktion haben können (Hellendoorn *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1997; Koev *et al.*, 2002; Satyanarayana *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2003).

Eine andere Funktion kommt den komplementären Termini bei der Enkapsidierung zu. Das 5'-Ende der vRNAs der *Bunyaviridae* scheint eine Signalsequenz zu tragen, die für das BUNV an der Position 1-32 nt (Osborne und Elliott, 2000) und für das Hantaan Hantavirus (HTNV) bei Nukleotid 1-39 zu finden ist (Severson *et al.*, 2001). Charakteristisch für diese Region ist die Bildung von Stem-Loop (SL)-Strukturen, an die allem Anschein nach das N-Protein bei der Initiation spezifisch bindet. Auch für die 5'-Enden der in dieser Arbeit identifizierten RNAs konnten mögliche SLs gezeigt werden. Diese umfassen jedoch bis zu 51 nt.

Das 3'-Ende scheint bei der Verpackung hingegen keine Rolle zu spielen, da es häufig unvollständig ist (Raju und Kolakofsky, 1989; Kukkonen *et al.*, 1998; Meyer und Schmaljohn, 2000; Padula *et al.*, 2002). Vielmehr werden diese inkompletten Enden als Regulationselemente der mRNA-Synthese verstanden (Simons und Pettersson, 1991).

Vergleicht man nun den komplementären Terminus der RNA 1 mit denen der *Bunyaviridae* und den Tenuiviren, so stellt man eine weitgehende Übereinstimmung mit den Enden der Orthobunyaviren und Hantaviren fest. Dies ist möglicherweise koevolutionär zu erklären. So teilen sich auch das eigenständige phytopathogene Genus *Tenuivirus* und die tier- und humanpathogenen Phleboviren, *Bunyaviridae* den gleichen Terminus. Innerhalb des Genus

Nairovirus scheinen sich die komplementären Enden parallel zu ihren Vektoren entwickelt zu haben (Honig *et al.*, 2004).

Bei Kenntnis über diesen Bereich ist es möglich in einer RT-PCR mit hiervon abgeleiteten Primern die vRNAs bzw. ihre Enden zu amplifizieren (van Poelwijk *et al.*, 1997 ; Aquino *et al.*, 2003). Bei alleiniger Verwendung solcher Primer ist jedoch die Wahrscheinlichkeit hoch, auch unspezifische Nebenprodukte zu bekommen, da aufgrund der meist geringen Länge des terminusspezifischen 3'-Abschnitts des Oligonukleotids, zur Anlagerung in den ersten PCR-Zyklen eine relativ geringe 'Annealing'-Temperatur gewählt werden muss (Aquino *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte unter Verwendung eines Primers, der 11 nt des 3'-Endes der RNA 1 beinhaltet, das 3'-Ende zweier weiterer RNAs erhalten werden. Durch die Kombination hiervon abgeleiteter SSP sowie einem Primer, der 11 nt des 5'-Terminus der RNA 1 enthält, konnten die kompletten RNAs der Größen von 2.335 nt (RNA 2) und 1.560 nt (RNA 3) identifiziert werden. Der Vergleich der Termini zeigte, dass nicht nur 11 sondern 13 nt übereinstimmten. Der Einsatz von weiteren Termini-Primern, die diese 13 nt tragen, führte zur Klonierung der vierten RNA (RNA 4) mit einer Länge von 1.348 nt.

Vergleicht man die Größen dieser vier viralen RNAs mit den im Agarosegel detektierten dsRNAs (Mielke, 1999; Benthack, 2001), die in Verdacht standen, viralen Ursprungs und mit der Erkrankung der Ebereschen assoziiert zu sein, so stimmen sie überein. Da bei ssRNA-Viren im Rahmen der Replikation eine vcRNA gebildet wird, treten solche hochmolekularen doppelsträngigen Replikativen Formen (RF) auf. Diese stellen somit auch ein gutes Indiz für das Vorkommen eines viralen Erregers dar (Jordan *et al.*, 1983; Dodds *et al.*, 1984; Valverde *et al.*, 1990).

4.2 Sequenz- und Protein-Analysen – ein neues Pflanzenvirus

4.2.1 Sequenzanalysen der vier identifizierten RNAs

RNA 1

Wie schon von Benthack (2001) in Datenbankanalysen gezeigt, weist die RNA 1 bzw. die vom ORF abgeleitete Aminosäuresequenz eine über einen Bereich von etwa 800 AA reichende bis zu 43 % hohe Homologie zur RNA-abhängigen-RNA-Polymerase (RdRP) verschiedener ss(-)RNA-Viren, insbesondere aber zu der Replikase der *Bunyaviridae*, auf.

Alle RNA-Viren, mit Ausnahme der Retroviren, die eine RNA-abhängige-DNA-Polymerase (RdDP) besitzen, verfügen über dieses Protein. Die RdRP verwendet die vRNA sowohl als

Template zur Synthese einer vcRNA, die im Rahmen der Replikation gebildet wird, als auch zur Produktion von mRNA und, sofern diese Codierungsstrategie vorhanden, auch von subgenomischen RNAs. Innerhalb des Proteins lassen sich verschiedene homologe Bereiche identifizieren. Die Gruppen der ss(+)RNA-Viren, ss(-)RNA-Viren und dsRNA-Viren zeigen verschiedene hochkonservierte Motive auf (Habili und Symons, 1989; Poch *et al.*, 1989). Auf dieser Basis lassen sich die ss(+)RNA-Viren in verschiedene Superfamilien einteilen (Habili und Symons, 1989). In vielen viralen Polymerasen, so auch DNA-abhängigen-DNA-Polymerasen (DdDP), findet man das GD(T)D-Motiv (Argos, 1988), das von hydrophoben Bereichen flankiert wird und sich durch eine 'beta-hairpin'-Struktur (strand-loop-strand) auszeichnet. Dieses Motiv wurde bei ss(-)RNA-Viren später als Motiv C bezeichnet und als Ort der Nukleotid-Addition identifiziert (Li *et al.*, 2001).

Die ss(-)RNA-Viren weisen sechs konservierte Bereiche auf, das Prämotiv A sowie die Motive A-E (Poch *et al.*, 1989; Muller *et al.*, 1994; van Poelwijk *et al.*, 1997). Diese stehen alle in Verdacht, funktionale Domänen der Polymerase darzustellen. Li *et al.* (2001) konnten bei der RdRP-Untereinheit PB1 der Influenzaviren das Prämotiv A bereits als 3'vRNA-Bindungsstelle und, wie bereits erwähnt, das Motiv C als Ort der Nukleotid-Addition identifizieren. Die Autoren zeigten zudem zwei weitere katalytische Zentren, stromabwärts des Motivs E. Die erste Region scheint demnach Endonukleaseaktivität zu besitzen und der Produktion der 'capped' Primer, auf die später näher eingegangen werden soll (4.2.3), zu dienen. Der zweite Bereich wurde als Bindungsstelle des 5'-Endes der vRNA identifiziert. Aquino *et al.* (2003) konnten diese beiden zusätzlichen konservierten Regionen ebenfalls für verschiedenste *Bunyaviridae*, nachweisen. Diese hoch konservierten Regionen werden vornehmlich für Verwandtschaftsanalysen herangezogen werden, insbesondere auch dann, wenn eine Identifizierung bzw. Einordnung eines Virus auf Basis seiner Morphologie und der Sequenz des Hüll- oder Nucleocapsidproteins aufgrund zu geringer Homologien nicht möglich ist (van Poelwijk *et al.*, 1997).

Für die abgeleitete Aminosäuresequenz des ORF der RNA 1, konnten ebenfalls die sechs konservierten Motive nachgewiesen werden. Zudem wurde eine der zwei weiteren, weniger homologen, funktionalen Domänen identifiziert, das endonukleolytische Zentrum zur Produktion der 'capped'-Primer. Der aus dem Vergleich der Aminosäuresequenz der fünf Motive A-E und des Prämotivs A mit der RdRP verschiedener Bunyaviren und Tenuiviren resultierende Stammbaum zeigt die höchste Verwandtschaft des Virus der Eberesche mit den phytopathogenen Tospoviren innerhalb der *Bunyaviridae*. Aber auch eine nähere

phylogenetische Beziehung zu den Orthobunyaviren, mit denen sich die vRNA auch den konservierten komplementären Terminus teilt, scheint vorzuliegen.

Zwar findet man auch bei allen Eukaryonten, und somit sicherlich auch in der Eberesche, RdRPs, hier im Zusammenhang mit Postranskriptionellem 'Gene-Silencing' (PTGS), aber diese weisen keine so deutlichen Homologien zu den viralen Enzymen auf (Iyer *et al.*, 2003). Der fundierte Hinweis auf eine virale RdRP bestätigt damit erneut den Verdacht auf einen viralen Erreger im Zusammenhang mit der Ringfleckigkeit der Eberesche, auch wenn bis heute noch nicht alle Koch'schen Postulate erfüllt sind.

RNA 2

Der ORF der zweiten klonierten RNA (RNA 2) kodiert ein 74,3 kD-Protein (p2), das das kurze Motiv GCY.C..G (Region 4) des auf der M-RNA kodierten Glykoproteinprecursors der Phleboviren, *Bunyaviridae*, trägt. Die anderen drei homologen Bereiche (Liu *et al.*, 2003) konnten jedoch nicht identifiziert werden. Aber auch die Consensussequenz einer konservierten Region der Tospo- und Orthobunyaviren (Cortez *et al.*, 2002), die wie bereits erwähnt, aufgrund der RdRP-Motive die höchste Verwandtschaft zu dem Virus der Eberesche aufweisen, konnte nicht nachgewiesen werden.

Trotzdem besteht der Verdacht, dass es sich bei dem p2 um einen Glykoproteinprecursor handeln könnte, da alle essentiellen Elemente eines solchen Peptids gefunden wurden. So weist das Protein ein N-terminales Signalpeptid, drei Transmembranhelices, sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen und eine putative 'Prozessierungsstelle' auf.

Virale Glykoproteine, die auch 'spikes' genannt werden, sind charakteristisch für Viren, die von einer Extramembran umhüllt sind (z.B. Arena-, Bunya-, Orthomyxo-, Retro- und Rhabdoviren). Sie sind in eine vom Wirt stammende Doppelmembran eingelagert, die unterschiedlichen Ursprungs sein kann. Diese kann durch intrazelluläre Knospung vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) (z.B. *Flaviviridae*), der inneren Kernmembran (Herpesvirus) oder auch vom Golgi-Apparat (*Bunyaviridae*) stammen (Pettersson, 1991). Andere Viruspartikel wie bei den Orthomyxoviren oder auch die Rhabdoviren entstehen hingegen durch Knospung an der Plasmamembran der Wirtszelle. Damit sie fest in der Membran verankert sind, besitzen die Glykoproteine etwa 20-25 Aminosäuren lange nichtpolare Bereiche, die Transmembranhelices. Diese können zusätzlich, wie es für das Hepatitis C Virus bereits gezeigt wurde, auch als Lokalisierungssignal für das ER und der Heterodimerisierung dienen (Cocquerel *et al.* 2000).

Die *Bunyaviridae* besitzen wie das p2 des Virus der Eberesche ein einziges N-terminales Signalpeptid, das dazu dient, den Precursor zum ER bzw. Golgi-Apparat zu leiten, wo er modifiziert (glykolysiert und palmityliert), prozessiert und gefaltet wird (Matsuoka *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 1997).

Es konnte gezeigt werden, dass die Zuckerreste maßgeblich an der Faltung der reifenden Glykoproteine beteiligt sind. Verschiedene Autoren berichten, dass die Chaperone Calnexin und Calreticulin, beides Lectine, die monoglykosylierten Intermediate erkennen und durch eine Bindung im ER halten (Ou *et al.*, 1993; Helenius *et al.*, 1997; Shi und Elliott, 2004). Für das Uukuniemi Phlebovirus konnte die Bindung eines weiteren Chaperons, das grp78/BiP, und einer Protein-Disulfid-Isomerase nachgewiesen werden (Matsuoka *et al.*, 1995).

Die Glykosylierung des Polypeptids findet bei den Bunyaviren an Asparaginsäureresten statt und beinhaltet, wie für die Tospoviren bereits gezeigt, hohe Konzentrationen an Mannose (Naidu *et al.*, 2004). O-Glykosylierung wurde hingegen nur bei dem Genus *Nairovirus* nachgewiesen, das N-terminal wie auch andere Viren, die hämorrhagisches Fieber verursachen, eine Mucin-ähnliche Region trägt (Sanchez *et al.*, 2002). Dieses Genus unterscheidet sich auch insofern von den übrigen Bunyaviren, dass die Spaltung des Precursors wie bei den *Arenaviridae* posttranslational stattfindet, weswegen es möglich ist, größere Mengen der Vorstufen in den Zellen nachzuweisen (Sanchez *et al.*, 2002). Alle übrigen Bunyaviren werden hingegen cotranslational prozessiert (Andersson *et al.*, 1997; Schmaljohn und Hooper, 2001).

Die Spaltung des Precursors wird durch wirtseigene Peptidasen vorgenommen. Die beteiligten Enzyme und ihre Erkennungssequenzen können jedoch je nach Genus variieren. So wurde bereits für die Prozessierung des Hantaanvirus der Endoplasmatisches-Retikulum-Signal-Peptidase-Komplex (ER SPC) identifiziert (Lober *et al.*, 2001). Nairoviren und *Arenaviridae* greifen hingegen auf die Subtilase SKI-1/S1P zurück (Lenz *et al.*, 2001). Nach den vorgenommenen softwareunterstützten Analysen könnte das p2 des Virus der Eberesche an der Stelle THA~~3~~DD in ein kleineres N-terminales G2-Protein (22,71 kD inklusive des Signalpeptids) und ein größeres C-terminales Peptid (G1) von 51,54 kD gespalten werden.

Auf der Basis eines Modells, das Andersson *et al.* (1997) für die Prozessierung und Membrantopologie der Proteine G1 und G2 des Uukuniemi Phlebovirus aufgestellt haben und der Daten, die mittels der unterschiedlichen Software für das p2 erhalten wurden, könnte die Einlagerung der Glykoproteine des Virus der Eberesche in eine wirtsspezifische Membran wie folgt aussehen (Abb. 4.1).

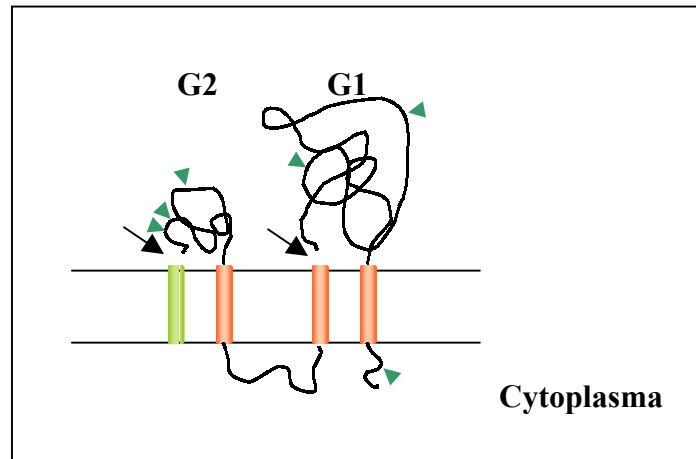


Abb. 4.1: Hypothetisches Modell der Prozessierung und Topologie der Glykoproteine G1 und G2 des Virus der Eberesche. Der Precursor von 74,3 kD könnte in die zwei Glykoproteine G1 (C-terminal, 51,6 kD und G2 (N-terminal, 22,7 kD) prozessiert werden. Von letzterem wird vermutlich das Signalpeptid (grün) abgespalten. Die Proteine sind mit insgesamt drei putativen Transmembranhelices (orange) verankert. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind durch Dreiecke (türkis) dargestellt.

Inwieweit das Modell der Glykosylierung und Prozessierung mit der Realität *in vivo* übereinstimmt, müsste in einem geeigneten Virus-Wirtszellsystem, mit Hilfe von Mutagenese-Analysen, 'Gelshiftassays' etc. überprüft werden.

Virale Glykoproteine bzw. 'spikes' spielen bei der Aufnahme des Viruspartikels in die Zelle eine Rolle (Hase *et al.*, 1989; Gavrilovskaya *et al.*, 1998; Rajceni und Vojvodova, 1998; Germi *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003; Tailor *et al.*, 2003), sie Adsorbieren an zelluläre Rezeptoren der tierischen Wirtszelle. Man vermutet zudem, dass Glykoproteine, ähnlich dem HA1/HA2-Komplex der Influenzaviren, nach einer endocytotischen Aufnahme der Partikel eine Fusion der Virus- mit der Endosomenmembran vermitteln (Huang *et al.*, 2003). Bei pflanzlichen Tospoviren, die eine Zellwand zu überwinden haben, scheint diese Funktion nur bei der Virus/Vektor-Interaktion eine Rolle zu spielen. Für die Verbreitung innerhalb der Pflanze stehen phytopathogenen Viren häufig Movementproteine zur Verfügung. So besitzen die Tospoviren auf der M-RNA einen zweiten in umgekehrter Orientierung zum Glykoproteinprecursorgen liegenden ORF, der ein Nichtstrukturprotein kodiert (NSm), das als ein solches Movementprotein identifiziert wurde (Soellick *et al.*, 2000). Auch die mit den *Bunyaviridae* verwandten Tenuiviren verfügen auf der RNA 2, auf der der ORF für den Glykoproteinprecursor pc2 liegt, über einen zweiten offenen Leserahmen. Das hiervon translatierte Protein p2 steht ebenfalls in der Diskussion als Movementprotein zu fungieren (Chomchan *et al.*, 2002). Und auch die Orthobunya- und die Phleboviren besitzen ein weiteres M-RNA kodiertes Protein. Dieses wird bei ersteren durch Prozessierung des

Glykoproteinprecursors gebildet. Die Phleboviren haben hingegen wie die Tospoviren ein zweites Gen in 'ambisense'-Orientierung. Die Funktion dieser NSm Proteine ist hier jedoch bislang unbekannt.

Hanta- und Nairoviren verfügen über kein weiteres M-RNA-kodiertes Protein und auch auf der RNA 2, die aus erkrankten Ebereschen isoliert wurde, ist kein weiterer ORF nachzuweisen. Es ist zudem unwahrscheinlich, dass ein solches Nichtstruktur-Protein wie bei den Orthobunyaviren durch die Prozessierung des Glykoproteinprecursors entsteht. Zum einen wurde mittels geeigneter Software keine zweite Schnittstelle gefunden und zum anderen ist der Precursor im Vergleich zu denen der verschiedenen Genera der *Bunyaviridae* und den Tenuiviren mit einer Größe von etwa 74 kD relativ klein. Hier erreichen die Polypeptide durchschnittliche Längen von etwa 100-160 kD.

Der Nachweis des G1 des Virus der Eberesche in Western-Blot-Analysen mittels eines Peptid-Antikörpers zeigte bislang erste erfolgversprechende Ergebnisse, die das Modell der Prozessierung des Precursors bestätigen könnten. Es konnte in Gesamtproteinextrakten symptomatischer Ebereschenblätter ein Protein der gesuchten Größe von etwa 52 kD nachgewiesen werden. Es stellte sich in diesem Fall allerdings auch die Frage, ob es sich hierbei nicht um eine Kreuzreaktion mit der großen Untereinheit der Rubisco handeln könnte, die eine ähnliche Größe wie das G1 aufweist und in Blättern in sehr hoher Konzentration vorliegt. Da jedoch in den Blattextrakten der krautigen Kontrollpflanzen keine Reaktion des Antikörpers nachgewiesen werden konnte und die Rubisco sehr hoch konserviert ist, kann eine unspezifische Reaktion des Serums weitgehend ausgeschlossen werden. Aber auch in den Rindenproben wurde keine Bande dieser Größenordnung detektiert. Dies könnte jedoch darin begründet sein, dass in Leitgeweben und seinen umgebenden Zellen das Virus nicht in Form von Partikeln, sondern nur als Ribonucleoproteinkomplex (RNP) vorliegt. So werden viele Pflanzenviren nicht als Partikel sondern als RNPs assoziiert mit dem Hüllprotein oder Nichtstrukturproteinen durch die Leitgefäße transportiert (Petty *et al.*, 1990; Ding *et al.*, 1996; Ryabov *et al.*, 1999; Cohen *et al.*, 2000, Morozov und Solovyev, 2003). Über den 'Longdistance'-Transport der Tospoviren ist bislang jedoch wenig bekannt. In den Blattproben infizierter Ebereschen konnte noch ein zusätzliches Protein mit dem Antikörper detektiert werden. Dieses hat eine Größe von ungefähr 75 kD und könnte somit den Precursor darstellen. Ein Nachweisverfahren zur Detektion von Glykoproteinen in diesen Extrakten brachte allerdings keine zusätzlichen Hinweise. Auf der Höhe des 52 kD Proteins konnte in den Blattproben keine Glykosylierung beobachtet werden. Dies kann zum einen in der Überlagerung mit der bereits erwähnten Rubiscountereinheit begründet sein, zum anderen

aber vielleicht auch in der zu geringen Konzentration dieses Proteins, da die Nachweisgrenze des Systems je nach Glykosylierungsgrad bei etwa 10-250 ng liegt.

In den Versuchen zur Isolierung von Viruspartikeln konnte keines der Proteine von 52 und 75 kD detektiert werden. Grund hierfür könnte die Tatsache sein, dass das Aufreinigungsverfahren nicht geeignet ist intakte, membranumhüllte Viruspartikel zu isolieren. Auch der Versuch der Aufreinigung von intakten Tenuivirus-Partikeln, die ebenfalls einen Glykoproteinprecursor kodieren und somit in Verdacht stehen membranumhüllt zu sein, ist bislang nicht gelungen (Estabrook *et al.*, 1996; Falk und Tsai, 1998). Für dieses Genus konnten selbst in Ultradünnschnitten infizierter Pflanzen oder Vektoren (Zikaden) keine sphärischen umhüllten Partikel nachgewiesen werden. Es wird daher diskutiert, ob diesen Proteinen vielleicht eine weitere Funktion zukommt, die eine Einbindung in wirtseigene Membranen nicht erfordert (Falk und Tsai, 1998).

Auch die Aufreinigung der in den Gewebeschnitten beobachteten sphärischen Partikel des High Plains Virus (HPV) und des Pigeon Pea Sterility Mosaic Virus (PPSMV), beides nichtklassifizierte RNA-Viren, bereitete offensichtlich Schwierigkeiten. Bei der Untersuchung der Fraktion konnten im Elektronenmikroskop (EM) auch hier nur fädige RNP-Strukturen wie bei den Tenuiviren identifiziert werden (Jensen *et al.*, 1996; Ahn *et al.*, 1998, Kumar *et al.*, 2003). Die hieraus gefolgerte Instabilität der Partikel zeigt sich zudem in einer sehr geringen mechanischen Übertragbarkeit der Viren (Ahn *et al.*, 1998; Falk und Tsai, 1998). So gelang es auch Kadri (2002) erst nach direktem Abrieb der Indikatorpflanzen mit symptomatischen Material, das putative Virus der Eberesche auf Tabak zu übertragen. Eine klassische Übertragung mittels Puffer-Homogenat konnte nicht erzielt werden.

Um jedoch nun eine deutliche Aussage darüber machen zu können, inwiefern der in dieser Arbeit verwendete Antikörper spezifisch gegen das vermutliche G1-Protein gerichtet ist, scheint die Aufreinigung intakter Viruspartikel oder eine Anreicherung von Glykoproteinen mittels geeigneter Lektine unerlässlich.

RNA 3

Das von der RNA 3 kodierte Protein p3 hat eine Größe von 35,1 kD und zeigt in der Datenbank Homologien zu Proteinen zweier phytopathogener Viren, die bislang noch nicht klassifiziert wurden. Hierbei handelt es sich zum einen um das potentielle 32 kD-Hüllprotein des High Plains Virus (HPV), ein RNA-Virus, das in Nordamerika in Mais und Weizen einen nicht unerheblichen wirtschaftlichen Schaden anrichtet (Jensen, 1994; Jensen *et al.*, 1996). Das zweite Peptid ist nur mit einer partiellen Sequenz erfasst und wird von der etwa 1,4 kb

langen RNA 5 des in Indien gefundenen Pigeon Pea Sterility Mosaic Virus (PPSMV) kodiert (Kumar *et al.*, 2003). Interessanterweise ist das dsRNA-Muster des PPSMV im Agarosegel dem der von Benthack (2001) im Zusammenhang mit der Ringfleckigkeit der Eberesche identifizierten dsRNAs sehr ähnlich (Kumar *et al.*, 2003).

Es fällt auf, dass insbesondere im C-terminalen Bereich, der u. a. einen α -helicalen Bereich beinhaltet, eine hohe Homologie der Aminosäuresequenz zu verzeichnen ist. Dieses legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um funktionale Domänen handeln könnte, die der RNA-Bindung, der Protein/Protein-Interaktion zwecks Oligomerisierung oder aber auch der Bindung an ein Movementprotein dienen.

Wie bereits erwähnt, zeigen sowohl das HPV als auch das PPSMV in partiell aufgereinigter Form schwach kontrastierte fädige Strukturen im Elektronenmikroskop (Ahn *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2003), die denen der Tenuiviren, Ophioviren und den Nucleocapsiden der Tospoviren sehr ähneln (Milne *et al.*, 1996; Falk und Tsai, 1998; Roggero *et al.*, 2000). Beide Viren konnten zudem in Ultradünnschnitten als sphärische, durch eine Doppelmembran umhüllte Partikel identifiziert werden (Jensen *et al.*, 1996; Ahn *et al.*, 1998, Kumar *et al.*, 2002).

Diese Hinweise auf eine hypothetische Funktion des p3 als Nucleocapsidprotein finden eine Unterstützung darin, dass ein Protein dieser Größenordnung in der SDS-PAGE einer Nucleocapsid-Aufreinigung sowie einer Partikelaufreinigung detektiert wurde. Zudem verfügt das p3 über eine N-terminale 'region of low complexity', die an der RNA-Bindung beteiligt sein könnte. Dafür spricht auch der hohe Anteil an basischen Aminosäuren in diesem Bereich. Bekannt ist, dass solche Regionen auch bei Protein/Protein-Interaktionen eine Rolle spielen können (Ball *et al.*, 2002).

Die N-Proteine der ss(-)RNA-Viren lagern sich durch eine direkte Bindung wie auf einer Perlenschnur auf der vRNA an und machen sie somit weitgehend RNase-resistent (Osborne und Elliott, 2000). Aber nicht nur die vRNA, auch die vcRNA ist mit dem Protein assoziiert, da die Bindung nach der Initiation der Enkapsidierung nachweislich unspezifisch an RNA erfolgt (Severson *et al.*, 1999; Osborne und Elliott, 2000). Die Tatsache, dass die virale mRNA, die nicht die charakteristischen Enden der vRNA und der vcRNA besitzt, nicht verpackt wird, liegt an der sequenzspezifischen Initiation. So wird heute angenommen, dass die 5'-Enden aufgrund ihrer 'Stem-Loop' (SL)-Struktur als Initiationssignal zur spezifischen Bindung eines N-Proteins dienen und die anschließende ungerichtete Anlagerung an die RNA aufgrund der Oligomerisierung der Proteine erfolgt (Severson *et al.*, 1999, 2001; Osborne und Elliott, 2000; Kaukinen *et al.*, 2001; Alfadhli, *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002).

Homologien zu den N-Proteinen der auf Basis der RdRP-Motive identifizierten, nächsten Verwandten des putativen Virus der Eberesche, den *Bunyaviridae*, wurden nicht gefunden.

Ein weiteres Gen für ein Nichtstrukturprotein, wie es bei den S-RNAs einiger Genera der *Bunyaviridae* und bei den Tenuiviren zu finden ist, konnte auf der RNA 3 wie bei den Hanta- und Nairoviren nicht identifiziert werden.

RNA 4

Für das p4 (26,86 kD), das von der RNA 4 kodiert wird, konnte in der Datenbank keinerlei Homologie zu viralen oder pflanzlichen Proteinen gefunden werden.

Bei dem ORF könnte es sich um das Gen eines Movementprotein handeln, das der systemischen Verbreitung der Viren innerhalb der Pflanze über die Plasmodesmata dient. Das p4 stellt aber möglicherweise auch einen RNA-Silencing-Repressor dar, wie er bereits für einige phytopathogene Viren identifiziert wurde.

Ob dem p4 des Virus der Eberesche eine Funktion als Movementprotein zukommt, könnte durch den Nachweis verschiedener Charakteristika überprüft werden. So werden diese Proteine vorwiegend in frühen Infektionsstadien exprimiert, sind intrazellulär nahe den Plasmodesmata lokalisiert, weisen eine Bindungsaffinität zu den Nucleocapsiden auf und sind häufig an der Bildung tubulärer Strukturen beteiligt (Kormelink *et al.*, 1994; Storms *et al.*, 1995; Soellick *et al.*, 2000). Allerdings besitzen nicht alle Pflanzenviren ein eigenständiges Movementprotein. Bei einigen Spezies übernimmt das Hüllprotein diese Aufgabe, so z.B. bei dem Cucumber Mosaic Cucumovirus oder dem Potato Virus X (Oparka *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 1998).

Bei den Tospoviren steht das NSs-Protein im Verdacht, Posttranskriptionelles 'Gene-Silencing' (PTGS) zu unterdrücken (Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003). Auch die Tenuiviren besitzen mit dem p3, das wie auch bei den Tospoviren auf der gleichen RNA wie das N-Protein in 'ambisense'-Orientierung kodiert ist, einen solchen Repressor (Bucher *et al.*, 2003). Inwieweit diese Proteine auch ihre Funktion in den Zellen des Vektors, in dem sich das Virus ebenfalls repliziert, ausübt, ist noch nicht geklärt. Tatsache ist jedoch, dass es in den tierischen Geweben hoch exprimiert wird (Kormelink *et al.*, 1991; Kitajima *et al.*, 1992). Das NSs-Protein der tier- und humanpathogenen *Bunyaviridae* fungiert als Interferon-Antagonist und schaltet sich somit ebenfalls in die Pathogenabwehr des Wirtes ein (Bouloy *et al.*, 2001; Bridgen *et al.*, 2001).

Eine mögliche Funktion des p4 als RNA-Silencing-Repressor könnte durch 'green fluorescens protein' (GFP)-Reporter Versuche, wie es bereits für die Helferkomponente des Tobacco Etch

Potyvirus, das Beet Western Yellows Luteovirus, das TSWV oder auch das Rice Hoja Blanca Tenuivirus gezeigt wurde (Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau und Carrington, 1998; Pfeffer *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2002, Bucher *et al.*, 2003), geklärt werden.

Sowohl Movementproteine als auch PTGS-Repressoren sind jedoch zu wenig konserviert, als dass sich hier intergenusspezifische Motive finden lassen. So bleibt die Rolle des p4 im Lebenszyklus der Eberesche durch Funktionsanalysen zu klären. Voraussetzung für solche Versuche wäre allerdings ein geeignetes Modellsystem, da sich Ebereschen im Gewächshaus nur schlecht kultivieren lassen. Hinzu kommt eine unregelmäßige Verteilung und ein geringer Virustiter der Erreger in holzigen Pflanzen (Büttner, 1994; Fuchs und Grüntzig, 1994; Büttner *et al.*, 1996; Werner *et al.*, 1997). Die ersten Erfolge der Übertragung des Virus der Eberesche auf *Nicotiana rustica* haben jedoch gezeigt, dass das Virus nur sehr schlecht in den Pflanzen repliziert, so dass ein hoher Virustiter und eindeutige, charakteristische Krankheitssymptome nicht gegeben sind (Kadri, 2002; Ringel, 2003).

4.2.2 Verwandtschaftsbeziehungen des Virus der Eberesche

Basierend auf den Sequenzhomologien der konservierten RdRP-Motive der ss(-)RNA-Viren konnte gezeigt werden, dass das Virus der Eberesche mit den *Bunyaviridae*, und hier insbesondere mit den phytopathogenen Tospo- und den tier- und humanpathogenen Orthobunyaviren, verwandt ist. Allerdings sprechen zahlreiche Indizien dagegen, dass es in eines dieser Genera einzuordnen ist. So finden wir zwar eine weitgehende Übereinstimmung der Sequenz der RNA-Enden mit den komplementären Termini der Orthobunyaviren, aber keine weiteren Sequenzhomologien bezüglich anderer viraler Proteine. Zudem konnten im Rahmen dieser Arbeit vier vRNAs identifiziert werden statt der für die *Bunyaviridae* üblichen drei. Im Gegensatz zu den Tospoviren wird hier bei keinen dieser RNAs eine 'ambisense'-Kodierungsstrategie verfolgt und die Thripse, als einzige bekannte Vektoren dieses Genus, sind als Überträger auszuschließen, da sie in unseren Breiten in der freien Natur nicht vorkommen.

Aber auch in die anderen Gruppen der *Bunyaviridae* oder in die Tenuiviren lässt sich das Virus nicht einordnen, da hier ebenfalls keine höheren Sequenzhomologien zu deren Proteinen gefunden wurden. Lediglich ein kurzes Motiv des Glykoproteinprecursors der Phleboviren konnte identifiziert werden.

Die dennoch bestehenden Ähnlichkeiten mit der Familie *Bunyaviridae* könnten auf einen gemeinsamen Ursprung dieser Viren zurückzuführen sein. So steht seit längerem in der Diskussion, dass Viren wie die Bunyaviren, Rhabdoviren, Reoviren oder auch die Tenuiviren,

die sowohl in dem eigentlichen Wirt als auch in ihrem Vektor replizieren, aus einem gemeinsamen Insektenvirus hervorgegangen sind (Goldbach, 1986; Koblet, 1993). Das *Nilaparvata lugens* Reovirus scheint in dieser Gruppe eine Brücke zwischen Insekten- und Phytoreoviren darzustellen, da es sich zwar in Reispflanzen systemisch ausbreiten, aber nur in Zikaden replizieren kann (Noda und Nakashima, 1995).

Generell jedoch bleibt die Frage nach der Evolution der Viren bis heute ungeklärt. So ist es möglich, dass alle Viren einen gemeinsamen Ursprung haben, oder aber sich abhängig vom Wirtsorganismus entwickelten. Für erstere Theorie würde sprechen, dass einige virale Proteine wie die RdRP oder Helicasen konservierte Domänen besitzen (Argos, 1988; Poch *et al.*, 1998; Ohba *et al.*, 1996; van Poelwijk *et al.*, 1997). Auch die Glykoproteine verschiedener umhüllter Viren weisen oftmals Ähnlichkeiten auf. So zeigen *Alpha*- und *Flaviviridae* in diesen Proteinen auffallende strukturelle Übereinstimmungen (Lescar *et al.*, 2001; Pletnev *et al.* 2001; Strauss und Strauss, 2001). Und auch die Glykoproteine der Phlebo- und Tenuiviren haben eine nicht zu vernachlässigende Sequenzhomologie (Estabrook *et al.*, 1996).

Für die Theorie der Evolution in Abhängigkeit eines Wirtsorganismus sprechen jedoch ebenfalls verschiedenste Beobachtungen. Die Movementproteine der verschiedenen phytopathogenen Viren zeigen nur wenig Übereinstimmung. Einige Viren verfügen über einen 'Triple-Gene-Block', der im Zusammenhang mit der Verbreitung des Erregers von Zelle zu Zelle steht (Morozov und Solovyev, 2003), andere besitzen ein Peptid, das zur Superfamilie der '30K'-Movementproteine gehört (Melcher, 2000). Wiederum andere Pflanzenviren besitzen zur Ausbreitung innerhalb des Wirts Proteine, die sich in keine der beiden Kategorien zuordnen lassen oder akquirieren für diese Funktion ihr Hüllprotein (Oparka *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 1998). Auch steht in der Diskussion, ob diese Peptide nicht eventuell aus pflanzlichen Proteinen hervorgegangen sind, die in Verbindung mit der Struktur oder der Funktion der Plasmodesmata stehen (Lucas und Wolf, 1993).

Roossinck (1997) schließt aufgrund dieser Beobachtungen nicht aus, dass eine Kombination dieser beiden Theorien bezüglich der Virusevolution vorliegt. So unterliegen Viren drei verschiedenen Kräften, die ihre phylogenetische Entwicklung beeinflussen: Mutationen, Rekombination und Neuordnung der einzelnen RNAs bei segmentierten viralen Genomen. RNA-Viren haben eine besonders hohe Mutationsrate, da sie über keine 'proofreading'-Funktion ihrer RdRP verfügen. Jedoch scheint die hieraus resultierende Entstehung neuer Isolate unabhängig vom Selektionsdruck zu sein und einer linearen Funktion zu unterliegen, da die meisten Mutationen neutral bleiben (Sala und Wain-Hobson, 2000).

Rekombination wurde bereits für zahlreiche phytopathogenen Viren wie für Vertreter der Luteo-, Nepo-, Bromo- und Cucumoviren (Allison *et al.*, 1989; Gibbs, 1995; Le Gall *et al.*, 1995; Fraile *et al.*, 1997) gezeigt, und auch das Neuarrangieren segmentierter Genome ist bei Pflanzenviren beobachtet worden (White *et al.*, 1995).

Neben den Sequenzhomologien des p1 zu der RdRP verschiedenster *Bunyaviridae* konnte eine auffallende Ähnlichkeit des p3, das aufgrund der Ergebnisse der Nucleocapsid-Anreicherung in Verdacht steht das Nucleocapsid (N)-Protein zu sein, zu dem N-Protein des HPV und einer partiellen Aminosäuresequenz des PPSMV beobachtet werden. Die Sequenz des Hüll- oder Nucleocapsidproteins zeigt innerhalb einer Familie oder eines Genus eine nicht zu vernachlässigende Homologie, die sich aber nicht für weitgehende phylogenetische Studien heranziehen lässt (Callaway *et al.*, 2001). Andererseits spricht gerade die beobachtete Homologie des möglichen N-Proteins des Virus der Eberesche (p3) mit denen des HPV und PPSMV für eine Verwandtschaft dieser drei Viren miteinander. Da jedoch weder HPV noch PPSMV bezüglich ihrer RdRP charakterisiert sind, können über die Nähe der phylogenetischen Beziehung zueinander noch keine Aussagen gemacht werden. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die ähnlichen dsRNA-Muster des PPSMV und des Virus der Eberesche im Agarosegel (Mielke, 1999; Benthack, 2001; Kumar *et al.*, 2003). Aus HPV-infizierten Pflanzen liegen bislang noch keine Information bezüglich einer dsRNA-Präparation vor.

Eine weitere Gemeinsamkeit des PPSMV und des HPV ist die Übertragung der Viren durch Milben (Seifers *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2003). So wird das HPV durch *Aceria tosichella* übertragen, PPSMV von *Aceria cajani*. In diesem Zusammenhang fällt die beobachtete Infektion der Eberesche mit Gallmilben auf. Eine Funktion dieser Arthropoden als potentielle Überträger des Erregers bleibt zu klären.

Da sich das Virus der Eberesche auch nach der Identifizierung und Charakterisierung von vier putativ viralen RNAs, wie auch die Tenuiviren, nicht direkt in die Familie *Bunyaviridae* oder ein anderes bestehendes Genus einordnen lässt, muss es zunächst unklassifiziert bleiben und ist vermutlich als Mitglied eines eigenständigen Genus zu betrachten.

4.2.3 Expressionsstrategie

Virale Genome verfolgen verschiedenste Strategien ihrer Expression. So können segmentierte Genome, subgenomische mRNAs, 'frameshifting', Suppression eines Stopp-Codons, Polyprotein-Prozessierung, überlappende ORFs oder Signalsequenzen als Enhancer der

Transkription und Translation zur Regulierung der Expression vorliegen (Zaccomer *et al.*, 1995).

Aufgrund der Verwandtschaft des Virus der Eberesche zu den *Bunyaviridae* und Tenuiviren lässt sich ein Modell der hypothetischen Expressionsstrategie aufstellen, das hier exemplarisch für die RNA 1 dargestellt ist (Abb. 4.2). Demnach könnte dieses ebenfalls eine 'negative-sense'-Kodierungsstrategie verfolgen, d.h., die vier ORFs der verschiedenen identifizierten RNAs liegen auf einem zur vRNA komplementären Strang. Die vRNA dient somit nicht nur als Template zur Synthese einer vcRNA, die im Rahmen der Replikation gebildet wird, sondern auch der Produktion einer verkürzten mRNA. Die komplementären Termini wirken hierbei als Promotoren (Prehaud *et al.*, 1997; Flick *et al.*, 2002; Barr *et al.*, 2003; Barr und Wertz, 2004).

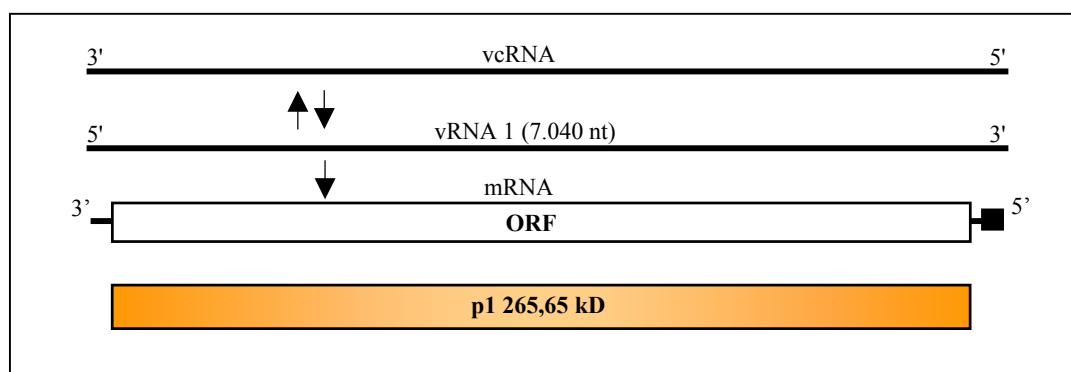


Abb. 4.2: Hypothetisches Modell der Genexpression der RNA 1 des Virus der Eberesche. Die 'virion' (v)RNA dient als Template zur Synthese der im Rahmen der Replikation gebildeten 'virion copy' (vc)RNA und der mRNA, die eine vom Wirt stammende 5'Cap-Struktur (■) trägt.

Die Replikation erfolgt bei multipartiten ss(-)RNA-Viren *de novo* und bedarf keines Primers. Zur mRNA-Synthese hingegen wird der Mechanismus des 'Cap-Snatching' verfolgt (Duijsing *et al.*, 2001; Kao *et al.*, 2001). Hierbei wird mittels der Endonukleaseaktivität der RdRP die 5'Cap-Struktur einer wirtseigenen mRNA entfernt und als Primer für die eigene mRNA verwendet. Die Länge des 'capped'-Primers ist unterschiedlich, liegt meist jedoch zwischen 13 und 18 nt (Jin und Elliott, 1993). Auch die Schnittstelle scheint für die einzelnen Viren unterschiedlich zu sein. So konnte für das DUGV eine endonukleolytische Spaltung nach einem C (Jin und Elliott, 1993), für das BUNV nach dem U (Jin und Elliott, 1993) und für das Influenzavirus nach CA (Rao *et al.*, 2003) identifiziert werden. Die Wahl der Wirts-mRNA scheint jedoch ungerichtet zu sein (Duising *et al.*, 1999). Nach einem Modell dieser Strategie für das Influenzavirus von Rao *et al.* (2003), bindet das 5'-Ende der vRNA über eine loop-Struktur an die Polymerase und aktiviert damit das endonukleolytische Zentrum, in deren

Nähe die ^7mG -capped-wirtsspezifische mRNA fixiert ist. Die Cap-Struktur bindet nun über Basenpaarung an das 3'-Ende der vRNA und die Transkription wird durch die Verlängerung des Caps mit einem G initiiert. Während der Elongation löst sich dann die neusynthetisierte mRNA von der RdRP ab. Dieses Modell kann nach den Autoren auch für alle anderen segmentierten ss(-)RNA-Viren angenommen werden. Die Termination der Transkription erfolgt anschließend vermutlich über A/U-reiche Sequenzen, die bereits bei einigen dieser Viren nachgewiesen wurden und in der Lage sind, 'hairpin'-Strukturen auszubilden (Cunningham und Szilegyi, 1987; Bouloy *et al.*, 1990).

Die Tatsache, dass bei der Replikation vorwiegend vRNA und nicht vcRNA gebildet wird, liegt vermutlich daran, dass sich die Enden der Templates geringfügig unterscheiden und aufgrund der Sekundärstruktur eine unterschiedliche Promotoraktivität besitzen. So konnte aufgrund dessen für das Influenzavirus ein Verhältnis von 10:1 an vRNA gegenüber vcRNA beobachtet werden (Park *et al.*, 2003).

Inwieweit das hier aufgestellte hypothetische Modell der Genexpression auch für das Virus der Eberesche realistisch ist, kann erst durch weiterführende Versuche gezeigt werden.

4.2.4 Entwicklung eines Nachweisverfahrens - Diagnostische RT-PCR

Der frühe Nachweis von phytopathogenen Erregern ist ein zentraler Punkt im Pflanzenschutz. Insbesondere bei Viruserkrankungen ist die Diagnostik für den Erhalt gesunder Bestände unerlässlich, da sich Viren nicht direkt mit chemischen Verfahren bekämpfen lassen.

Das in Routinelabors heute noch gängigste Verfahren der Virustestung ist der ELISA, da er schnell und kostengünstig durchzuführen ist (Seigner, 2000). Jedoch ist seine Sensitivität begrenzt, die Antikörper können unzureichende Spezifität besitzen und ein Nachweis von Erregern in Geweben, die reich an Sekundärmetaboliten sind, ist durch Kreuzreaktionen oft erschwert (Seigner, 2000).

Die PCR besitzt im Vergleich zum ELISA jedoch eine sehr viel höhere Sensitivität und erlaubt somit auch den Nachweis in Probenmaterial mit niedrigem Virustiter (Stevens *et al.*, 1997). Daher eignet sie sich sogar für die Detektion von Viren in einzelnen Invertebraten oder Samen (Werner *et al.*, 1997; Singh, 1998, 1999) sowie für sehr geringe Ausgangsmengen an Pflanzenmaterial und Chargenprüfung, beispielsweise an Saatgut. Auch überwindet sie die Problematik der durch pflanzliche Inhaltsstoffe hervorgerufenen 'falsch positiven' Befunde.

Des Weiteren ist man in der Lage, mit Hilfe der PCR verschiedene Isolate eines Virus zu differenzieren, die sich durch serologische Verfahren nicht unterscheiden lassen.

Mit den in dieser Arbeit ausgewählten Primerpaaren konnten alle vier RNAs des Virus der Eberesche in Blatt- als auch in Rindenproben symptomatischer Pflanzen nachgewiesen werden (Abb. 4.3). Aber auch in nichtsymptomatischem Gewebe wurden immer wieder geringe Mengen viraler RNA detektiert. Dies ist jedoch weniger auf die Unspezifität der Primer zurückzuführen als auf die Problematik, tatsächlich virusfreies Material zu verwenden, da die Pflanzen allein nach visueller Bonitur eingestuft wurden. So könnte in virusinfizierten Pflanzen die Symptomentwicklung erst ab einem bestimmten Titer auftreten. Bekannt ist, dass holzige Pflanzen generell einen geringen Virustiter und eine inhomogene Verteilung des Erregers aufweisen (Büttner, 1994; Fuchs und Grüntzig, 1994; Büttner *et al.*, 1996; Werner *et al.*, 1997). Das Ergebnis zeigt jedoch auch, wie weit verbreitet dieses Virus der Eberesche inzwischen ist.

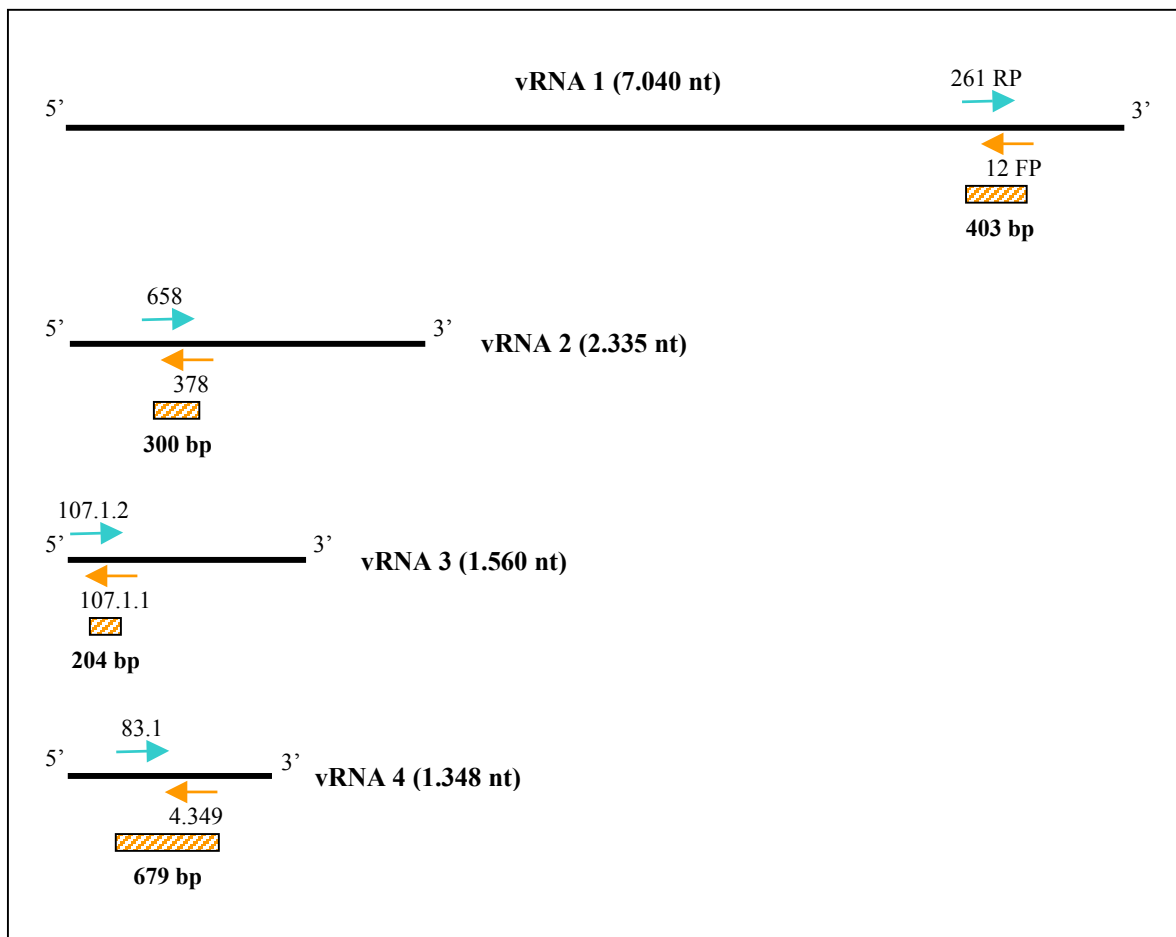


Abb 4.3: Schematische Darstellung der vier vRNAs 1-4, die komplementär zu den kodierenden RNAs sind und den in der diagnostischen RT-PCR amplifizierten Bereichen.

4.2.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte das Genom eines neuen phytopathogenen Virus, das mit der Ringfleckigkeit der Eberesche assoziiert ist, durch weitreichende molekularbiologische Analysen näher charakterisiert werden. Dennoch muss, als endgültiger Beweis der Korrelation des Virus mit der Erkrankung, zukünftig die Erfüllung der Koch'schen Postulate angestrebt werden.

Die Isolierung von infektiösen Viruspartikeln und deren Darstellung in der Elektronenmikroskopie ist hierbei von besonderem Interesse. Die Verwendung von Protokollen für Tospo- und Tenuiviren haben jedoch bislang keinen Erfolg gezeigt, so dass die Etablierung eines geeigneten Verfahrens zunächst im Mittelpunkt stehen muss. In diesem Zusammenhang sollte auch nach einer Indikatorpflanze gesucht werden, in der sich das Virus mit einem hohen Titer systemisch ausbreitet. Erste Studien diesbezüglich haben gezeigt, dass sich das Virus zwar durch direkten Abrieb mit symptomatischem Ebereschengewebe auf *Nicotiana rustica* übertragen lässt, allerdings zeigen die Pflanzen keine eindeutige Symptomatik und auch der Virustiter ist äußerst gering (Kadri, 2002; Ringel, 2003). So kann aber auch in dem bislang noch unbekannten natürlichen Wirtskreis des Virus der Eberesche nach einer geeigneten krautigen Pflanze gesucht werden. Nach der Identifizierung eines geeigneten Modellsystems könnte zudem versucht werden, die Übertragung des Virus mittels 'reverse genetics' und somit infektiösen Klonen zu erreichen.

Für die Lokalisierung der Partikel und/oder der Nucleocapside in den Pflanzenzellen müsste man diese mit spezifischen Antikörpern gegen die Glykoproteine bzw. das Nucleocapsid-Protein dekorieren. Weiterführende Tests des in dieser Arbeit verwendeten G1-Antiserums sowie die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen das N-Protein sind hierfür Voraussetzung.

Da bislang die Verbreitung des Virus in der Natur unklar ist, ist auch die Identifizierung von potentiellen Vektoren von besonderem Interesse. Aufgrund der Hinweise auf eine Verwandtschaft mit den *Bunyaviridae* könnte bei dem Virus der Eberesche ebenfalls ein Arthropode involviert sein. In diesem Zusammenhang ist auch der Befall vieler Bäume mit Gallmilben näher zu untersuchen, da die Datenbankanalysen des p3 gezeigt haben, dass auch eine phylogenetische Beziehung zu den beiden nichtklassifizierten Viren PPSMV und HPV, die beide durch Milben übertragen werden, besteht. Inwieweit diese beiden Viren und das Virus der Eberesche vielleicht gemeinsam in ein neues Genus oder sogar eine neue Familie einzuordnen sind, bleibt durch weitere Charakterisierung des Genoms des HPV und des PPSMV zu klären.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte durch molekularbiologische Analysen ein neues Virus, das mit der Ringfleckigkeit der Eberesche assoziiert ist, näher charakterisiert werden.

Ausgehend von einer durch Benthack (2001) erhaltenen putativ viralen Sequenz von 3,7 kb, die Homologie zu verschiedenen ss(-)RNA-Viren, insbesondere zu den *Bunyaviridae*, gezeigt hat, wurde zunächst ein geeignetes RACE-Verfahren etabliert, das zum Erhalt der Enden dieser RNA und somit zu einer Gesamtsequenz von 7.040 nt führte. Der ORF dieser RNA 1 kodiert für ein 265,65 kD Protein, das über einen Bereich von etwa 800 Aminosäuren in der Datenbank eine Homologie von bis zu 43 % zur RNA-abhängigen-RNA-Polymerase (RdRP) verschiedener *Bunyaviridae* zeigt. Die sechs konservierten Motive, Prämotiv A und die Motive A-E, konnten eindeutig identifiziert werden. Zudem wurde das endonukleolytische Zentrum einer solchen Polymerase, das im Zuge des 'Cap-Snatching'-Mechanismus aktiviert wird, anhand der abgeleiteten Sequenz ausgemacht. Die auf diesen Homologien basierenden Stammbaumanalysen zeigen die höchste Verwandtschaft des Virus der Eberesche zu den phytopathogenen Tospo- sowie den tier- und humanpathogenen Orthobunyaviren innerhalb der *Bunyaviridae*.

Die Enden der RNA 1 wiesen die für segmentierte ss(-)RNA-Viren charakteristischen komplementären Terminussequenzen auf. Es konnte eine weitgehende Übereinstimmung mit den konservierten Termini der Orthobunya- und der Hantaviren beobachtet werden. Eine Ähnlichkeit zu den vRNA-Enden der Tospoviren ist hingegen nicht gegeben. RT-PCR-Analysen unter Verwendung von Primern, die Teile dieser Terminussequenzen beinhalten, führten zum Erhalt von drei weiteren RNAs.

RNA 2 mit einer Gesamtlänge von 2.335 nt kodiert für ein Protein (p2) von 74,25 kD, das nach softwareunterstützten Untersuchungen alle charakteristischen Elemente eines Glykoproteinprecursors trägt. Demnach besitzt das p2 ein N-terminales Signalpeptid, sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen sowie drei putative Transmembranhelices und würde in zwei einzelne Glykoproteine G1 (C-terminal, 51,54 kD) und G2 (N-terminal, 22,71 kD) prozessiert werden. Zudem konnte ein kurzes Motiv des Glykoproteinprecursors der Phleboviren, *Bunyaviridae*, identifiziert werden. Mit einem polyklonalen Antikörper gegen ein G1-spezifisches, synthetisches Peptid konnte in Western-Blot-Analysen mit Gesamtproteinextrakten aus Blättern und Rinde symptomatischer und asymptomatischer Ebereschen ein Protein der gesuchten Größe in Proben symptomatischer Pflanzen detektiert werden.

RNA 3 mit einer Größe von 1.560 nt kodiert für ein 35,08 kD Protein, das Homologie zu Proteinen zweier bislang nichtklassifizierter phytopathogener RNA-Viren zeigt. Hierbei handelt es sich zum einen um das putative Hüllprotein des High Plains Virus (HPV), zum anderen um die partielle Sequenz eines Proteins des Pigeon Pea Sterility Mosaic Virus (PPSMV). Sowohl in einer Nucleocapsid-Isolierung als auch in einem Versuch zur Anreicherung von Viruspartikeln nach Protokollen für Tospoviren, konnte in der SDS-PAGE bei symptomatischen Ebereschen ein zusätzliches Protein von etwa 35 kD, das in den Proben asymptomatischer Bäume nicht nachzuweisen war, detektiert werden. Es ist daher sehr gut möglich, dass es sich bei dem p3 um das Nucleocapsidprotein handeln könnte.

Die RNA 4 hat eine Gesamtlänge von 1.348 nt und kodiert für ein Protein von 26,86 kD, das in der Datenbank keinerlei Homologie zu bereits bekannten viralen Proteinen zeigt.

Die komplementären Termini dieser vier RNAs sind über einen Bereich von 13 nt konserviert. Die Länge dieser doppelsträngigen Bereiche der einzelnen RNAs variiert jedoch und reicht von 19 bis 23 nt. Bei RNA 1-3 wird die Basenpaarung an zwei Positionen unterbrochen, bei RNA 4 sogar an vier. Solche kurzen 'Loops' sind auch bei anderen segmentierten ss(-)RNA-Viren zu beobachten und haben hier eine regulatorische Funktion bei der Replikation und mRNA-Synthese. Die 5'-Enden der in dieser Arbeit identifizierten kodierenden RNAs bzw. ihrer komplementären Sequenzen zeigen ausgeprägte 'Stem-Loop' (SL)-Strukturen, die ein Signal für die Initiation der Enkapsidierung darstellen könnten, wie es für andere *Bunyaviridae* bereits gezeigt wurde.

Zuletzt konnte eine diagnostische RT-PCR mit spezifischen Primerpaaren entwickelt werden, mit der alle vier RNAs des Virus der Eberesche in Rinden- und Blattgewebe symptomatischer Bäume nachgewiesen wurden.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen molekularen Analysen haben gezeigt, dass das Virus der Eberesche mit den *Bunyaviridae* zwar verwandt ist, sich aber in keine der bestehenden Gruppen einordnen lässt, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es sich hierbei um den Vertreter eines neuen, eigenständigen, phytopathogenen Genus handelt.

6. Literaturverzeichnis

Aas G, Holdenrieder O (1992) Die Vogelbeere (*Sorbus aucuparia* L.) – der vielseitige Pionier. Wald und Holz 15: 48-50

Ahn K-K, Kim KS, Gergerich RC, Jensen SG (1998) High plains disease of corn and wheat: ultrastructural and serological aspects. J. Submicrosc. Cytol. Path. 30: 563-571

Alfadhli A, Love Z, Arvidson B, Seeds J, Willey J, Barklis E (2001) Hantavirus nucleocapsid protein oligomerization. J. Virol. 75: 2019-2023

Allison RF, Janda M, Ahlquist P (1989) Sequence of Cowpea chlorotic mottle virus RNAs 2 and 3 and evidence of a recombination event during bromovirus evolution. Virology 172: 321-330

Andersson AM, Melin L, Persson R, Raschperger E, Wikström L, Pettersson RF (1997) Processing and membrane topology of the spike proteins G1 and G2 of Uukuniemi virus membrane glycoprotein. J. Virol. 71: 218-225

Aquino VH, Moreli ML, Moraes Figueiredo LT (2003) Analysis of Oropouche virus L protein amino acid sequence showed the presence of an additional conserved region that could harbour an important role for the polymerase activity. Arch. Virol. 148: 19-28

Argos P (1988) A sequence motif in many polymerases. Nucl. Acids Res. 16: 9909-9916

Ball LJ, Jarchau T, Oschkinat H, Walter U (2002) EVH1 domains: structure, function and interactions. FEBS Lett. 513: 45-52

Barr JN, Elliott RM, Dunn EF, Wertz GW (2003) Segment-specific terminal sequences of Bunyamwera bunyavirus regulate genome replication. Virology 311: 326-338

Barr JN, Wertz GW (2004) Bunyamwera bunyavirus RNA synthesis requires cooperation of 3'- and 5'-terminal sequences. J. Virol. 78: 1129-1138

Benthack W (2001) Klonierung und partielle Charakterisierung des unbekannten Erregers der Ringfleckigkeit der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) anhand doppelsträngiger RNA. Dissertation Universität Hamburg: 152 S.

Benthack W (1998) Virologische Untersuchungen an Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.). Diplomarbeit Universität Hamburg: 106 S.

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523

- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME, van der Noordaa J (1990)** Rapid and simply method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28: 495-503
- Bouloy M, Pardigon N, Vialat P, Gerbaud S, Girard M (1990)** Characterization of the 5' and 3' ends of viral messenger RNA isolated from BHK21 cells infected with Germiston virus (bunyavirus). *Virology* 175: 50-58
- Bouloy M, Janzen C, Vialat P, Khun H, Pavlovic J, Huerre M, Haller O (2001)** Genetic evidence for an interferon-antagonist in function of Rift valley fever virus nonstructural protein NSs. *J. Virol.* 75: 1371-1377
- Bridgen A, Weber F, Fazakerley JF, Elliott RM (2001)** Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 664-669
- Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC (1998)** Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 17: 6739-6746
- Bucher E, Sijen T, de Haan P, Goldbach R, Prins M (2003)** Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J. Virol.* 77: 1329-1336
- Büttner C (1994)** Die Verbreitung sowie die Bedeutung der Laubbaumvirosen als prädisponierender Faktor im Zusammenwirken mit anderen Stressoren im Ursachenkomplex der Waldschäden. Habilitationsschrift Universität Hamburg: 164 S.
- Büttner C, Führling M, Werner R, Mühlbach H-P, Lukács N (1996)** Phytopathogene Viren in Laubbäumen des öffentlichen Grüns und Baumschulen sowie in Böden und Gewässern – eine diagnostische Vorgehensweise. *Gesunde Pflanze* 48: 95-103
- Büttner C, Führling M (1993)**: Beobachtungen zu virusbedingten Symptomen an Stieleichen (*Quercus robur* L.) – eine Abgrenzung zu ähnlichen, nicht virusbedingten Krankheitsbildern. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzdienst* 45: 110-115
- Callaway A, Giesman-Cookmeyer D, Gillock ET, Sit TL, Lommel SA (2001)** The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu. Rev. Phytopath.* 39: 419-460
- Chomchan P, Miranda GJ, Shirako Y (2002)** Detection of Rice grassy stunt tenuivirus nonstructural proteins p2, p5 and p6 from infected rice plants and from viruliferous brown planthoppers. *Arch. Virol.* 147: 2291-2300
- Chomczynski P, Sacchi N (1987)** Single-step method of RNA-isolation by acid guanidinium thiocyanat-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156
- Cooper JI (1993)** Virus diseases of trees and shrubs, 2nd edn. Chapman & Hall, London

- Cocquerel L, Op de Beeck A, Lambot M, Roussel J, Delgrange D, Pillez A, Wychofski C, Penin F, Dubuisson J (2000)** Topological changes in the transmembrane domains of Hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J.* 21: 2893-2902
- Cohen Y, Gisel A, Zambryski PC (2000)** Cell-to-Cell and systemic movement of recombinant green fluorescent protein-tagged Turnip crinkle viruses. *Virology* 273: 258-266
- Cunningham C, Szilegyi JF (1987)** Viral RNAs synthesized in cells infected with Germiston bunyavirus. *Virology* 157: 431-439
- Cortez I, Aires A, Pereira A-M, Goldbach R, Peters D, Kormelink R (2002)** Genetic organisation of Iris yellow spot virus M RNA: indications for functional homology between the G(C) glycoproteins of tospoviruses and animal-infecting bunyaviruses. *Arch. Virol.* 147: 2313-2325
- de Cuveland J (1996)** Gesund trotz schlechter Luft. Robust und ökologisch wertvoll: die Eberesche ist 'Baum des Jahres 1997'. *Die Welt – Wissenschaft*, 01.11.1996
- Ding X, Shintaku MH, Carter SA, Nelson RS (1996)** Invasion of minor veins of tobacco leaves inoculated with Tobacco mosaic virus mutants defective in phloem-dependent movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11155-11160
- Dodds JA, Morris TJ, Jordan RL (1984)** Plant viral double-stranded RNA. *Annu. Rev. Phytopath.* 22: 151-168
- Duijsing D, Kormelink R, Goldbach R (1999)** Alfalfa mosaic virus RNAs serve as cap donors for Tomato spotted wilt virus transcription during coinfection of *Nicotiana benthamiana*. *J. Virol.* 73: 5172-5175
- Duijsing D, Kormelink R, Goldbach R (2001)** *In vivo* analysis of the TSWV cap-snatching mechanism: single base complementary and primer length requirements. *EMBO J.* 10: 2545-2552
- Dumas Milne Edwards JB, Delort J, Mallet J (1991)** Oligoribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by *in vitro* amplification. *Nucl. Acids Res.* 19: 5227-5232
- Ebert W (1973)** Mehr Vogelbeerbäume für Landschaftspflege und Vogelschutz! *Der Forst- und Holzwirt* 11: 216-217
- Ebrahim-Nesbat F, 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. Path.* 22: 1-10
- Eisenreich H (1956)** Schnell wachsende Holzarten. Ein Leitfaden. Deut. Bauernverlag, Berlin: 332 S.

Erlbeck R (1979) Die Vogelbeere. Unser Wald 5: 139-141

Espelund M, Prentice Stacy RA, Jakobsen KS (1990) A simple method for generating single-stranded DNA probes labeled to high activities. Nucl. Acids Res. 18: 6157

Estabrook EM, Suyenaga K, Tsai JH, Falk BW (1996) Maize stripe tenuivirus RNA2 transcripts in plant and insect analysis of pvc2, a protein similar to the phlebovirus virion glycoproteins. Virus Genes 12: 239-247

Falk BW, Tsai JH (1998) Biology and molecular biology of viruses in the genus *tenuivirus*. Annu. Rev. Phytopath. 36: 139-163

Flick R, Elgh F, Hobom G, Pettersson RF (2002) Mutational analysis of the Uukuniemi virus (*Bunyaviridae* family) promotor reveals two elements of functional importance. J. Virol. 76: 10849-10860

Flouriot G, Brand H, Gannon F (1999) Identification of differentially expressed 5'-end mRNA variants by an improved RACE technique (PEETA). Nucl. Acids Res. 27: e8

Fodor E, Pritlove DC, Brownlee GG (1994) The Influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. J. Virol. 68: 4092-4096

Fodor E, Pritlove DC, Brownlee GG (1995) Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in Influenza A virus. J. Virol. 69: 4012-4019

Fuchs E, Grüntzig M (1994) Der serologische Nachweis von mechanisch übertragbaren Viren des Kern- und Steinobstes. Nachrichtenbl. Pflanzenschutz DDR 42: 208-211

Führling M (1994) Virologische Studien an erkrankten Stileichen (*Quercus robur* L.) und Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) in Norddeutschland sowie Untersuchungen von stoffwechselphysiologischen Veränderungen durch abiotische Stressoren an ausgewählten virusinfizierten Forstgehölzen. Dissertation Universität Hamburg: 142 S.

Führling M, 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. Path. 25: 129-135

Führling M, Büttner C (1998) Studien zum Auftreten der Ringfleckigkeit und Scheckung der Blätter von Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) Forstw. Cbl. 117: 327-338

Fraile A, Alonso-Prados JL, Aranda MA, Bernal JJ, Maplica JM, Garcia-Arenal F (1997) Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA plant virus. J. Virol. 71: 934-940

Friedrich G, Schuricht W (1985) Edel-Ebereschen. In: Seltenes Kern-, Stein- und Beerenobst. Neumann (ed), Radebeul, Leipzig

Frohmann MA, Dush MK, Martin GR (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 8998-9002

le Gall O, Candresse T, Dunez J (1995) Transfer of the 3' non-translated region of Grapevine chrome mosaic virus RNA-1 by recombination to Tomato black ring virus RNA-2 in pseudorecombinant isolates. J. Gen. Virol. 76 : 1285-1289

Gavrilovskaya IN, Shepley M, Shaw R, Ginsberg MH, Mackow ER (1998) Beta3 integrins mediate the cellular entry of hantavirus that cause respiratory failure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 7074-7079

Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, Zarski JP, Drouet E (2002) Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in Hepatitis C virus adsorption. J. Med. Virol. 68: 206-215

Gibbs AJ, Calisher CH, Garcia-Arenal F, eds (1995) Molecular basis of virus evolution. Cambridge Univ. Press, Cambridge: 603 S.

Goldbach R (1986) Molecular evolution of plant RNA viruses. Annu. Rev. Phytopath. 24: 289-310

Greger O (1987) Waldgeschichte und Waldbau im Hochharz. Der Forst- und Holzwirt 10: 264-269

Habili N, Symons RH (1989) Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. Nucl. Acids Res. 17: 9543-9555

Hase T, Summers PL, Eckels KH (1989) Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. Arch. Virol. 104: 129-143

Helenius A, Trombetta ES, Hebert DN, Simons JF (1997) Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. Trends Cell Biol. 7: 193-200

Hellendoorn K, Verlaan PW, Pleij CW (1997) A functional role for the conserved protonatable hairpins in the 5' untranslated region of Turnip yellow mosaic virus RNA. J. Virol. 71: 8774-8779

Heukeshoven J, Dernick R (1988) Improved silver stain procedure for staining in phastsystem development unit; staining of sodium dodecylsulfate gels. Electrophoresis 9: 28-32

Hillebrand K, Leder B (1995) Auch die Vogelbeere kann erhebliche Dimensionen erreichen. AFZ 49: 582-584

Honig JE, Osborne JC, Nichol ST (2004) The high genetic variation of viruses of the genus *nairovirus* reflects the diversity of their predominant tick hosts. *Virology* 318: 10-16

Huang Q, Sivaramakrishna RP, Ludwig K, Korte T, Bottcher C, Herrmann A (2003) Early steps of the conformational change of Influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin. *Biochim. Biophys. Acta* 1614: 3-13

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

Ito T, Lai MM (1997) Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the Hepatitis C virus RNA genome. *J. Virol.* 71: 8698-8706

Iyer LM, Koonin EV, Aravind L (2003) Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. *BioMed Central Structural Biology* 3: 1-23

Jelkmann W, Kunze L, Vetten HJ, Lesemann DE (1992) cDNA cloning of dsRNA associated with apple stem pitting disease and evidence for the relationship of the viruslike agents associated with apple stem pitting and pear vein yellows. *Acta Horticulturae* 309: 55-62

Jensen SG (1994) The High plains virus – a new threat to corn and wheat production in the west. *Proc. Annu. Corn Sorghum Indus. Res. Conf., 49th. Am. Seed Trade Assoc., Chicago*: 156-164

Jensen SG, Lane LC, Seifers DL (1996) A new disease of maize and wheat in high plains. *Plant Dis.* 80: 1387-1390

Jin H, Elliott RM (1993) Non-viral sequences at the 5' ends of Dugbe nairovirus S mRNAs. *J. Gen. Virol.* 74 : 2293-2297

Jordan RL, Dodds JA, Ohr HD (1983) Evidence for viruslike agents in avocado. *Phytopathology* 73: 1130-1135

Kadri A (2002) Untersuchungen zur experimentellen Übertragung, Partikelisolierung und weiterer Charakterisierung des Erregers der Ringfleckigkeit der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.), Diplomarbeit Universität Hamburg, 99 S.

Kaplan IB, Zhang L, Palukaitis P (1998) Characterization of Cucumber mosaic virus. V. Cell-to-cell movement requires capsid protein but not virions. *Virology* 264: 221-231

Kao CC, Singh P, Ecker DJ (2001) *De Novo* initiation of viral RNA-dependent RNA synthesis. Virology 287: 251-260

Kasschau KD, Carrington JC (1998) A counter defensive strategy of plant viruses: suppressor of posttranscriptional gene silencing. Cell 95: 461-470

Kaukinen P, Koistinen V, Vapalathi O, Vaheri A, Plyusnin A (2001) Interaction between molecules of hantavirus nucleocapsid protein. J. Gen. Virol. 82 : 1845-1853

Kegler H (1960) Das Ringfleckenmosaik der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.). Phytopathologische Z. 37: 214-216

Keim-Konrad R, Jelkmann W (1996) Genome analysis of the 3'-terminal part of little cherry disease associated dsRNA reveals a monopartite chlostero-like virus. Arch. Virol. 141: 1-14

Kellmann J-W, Liebisch P, Schmitz K-P, Piechulla B (2001) Visual representation by atomic force microscopy (AFM) of Tomato spotted wilt virus ribonucleoproteins. Biol. Chem. 382: 1559-1562

Kikkert M, van Poelwijk F, Storms M, Kassies W, Bloksma H, van Lent J, Kormelink R, Goldbach R (1997) A protoplast system for studying Tomato spotted wilt virus infection. J. Gen. Virol. 78 : 1755-1763

Kitajima EW, Resende RD, de Avila AC, Goldbach RW, Peters D (1992) Immuno-electron microscopical detection of Tomato spotted wilt virus and its nucleocapsids in crude plant extracts. J. Virol. Meth. 38: 313-322

Koblet H (1993) Viral evolution and insects as a possible virologic turning table. In Vitro Cell. Dev. Biol. 29: 274-283

Koev G, Liu S, Beckett R, Miller WA (2002) The 3prime prime or minute-terminal structure required for replication of Barley yellow dwarf virus RNA contains an embedded 3prime prime or minute end. Virology 292: 114-126

König R (1997) Magnetic bead technology aids sequence determinations for the 3' and 5' ends of viral RNAs. BioTechniques 23: 102-104

Köstler JN, Brückner E, Bibelriether H (1968) Die Wurzeln der Waldbäume, Paul Parrey Verlag

Kormelink R, Kitajima EW, de Haan P, Zuidema D, Peters D, Goldbach R (1991) The nonstructural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of Tomato spotted wilt virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. Virology 181: 459-468

- Kormelink R, Storms S, van Lent J, Peters D, Goldbach R (1994)** Expression and subcellular location of the NSm protein of Tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative movement protein. *Virology* 200: 56-65
- Kukkonen SKJ, Vaheri A, Plyusnin A (1998)** Completion of Tula hantavirus genome sequence: properties of the L segment and heterogeneity found in the 3' termini of S and L genome RNAs. *J. Gen. Virol.* 79: 2615-2622
- Kumar PL, Duncan GH, Roberts IM, Jones AT, Reddy DVR (2002)** Cytopathology of Pigeon pea sterility mosaic virus in pigeon pea and *Nicotiana benthamiana*: similarities with those of eriophyid mite-borne agents of undefined etiology. *Ann. Appl. Biol.* 140: 87-96
- Kumar PL, Jones AT, Reddy DVR (2003)** A novel mite-transmitted virus with a divided RNA genome closely associated with pigeon pea sterility mosaic disease. *Phytopathology* 93: 71-81
- Lee KH, Seong BL (1996)** The position 4 nucleotide at the 3' end of the Influenza virus neuraminidase vRNA is involved in temporal regulation of transcription and replication of neuraminidase RNAs and effects the repertoire of Influenza virus surface antigens. *J. Gen. Virol.* 79 : 1923-1934
- Lenz O, ter Meulen J, Klenk HD, saidah NG, Gorten W (2001)** The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 : 12701-12705
- Lescar J, Roussel A, Wien MW, Navaza J, Fuller SD, Wengler G, Rey FA (2001)** The fusion glycoprotein shell of Semliki forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* 105: 137-148
- Li ML, Rao P, Krug RM (2001)** The active sites of the Influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J.* 20: 2078-2086
- Liu X, Gorovsky MA (1993)** Mapping of the 5' and 3' ends of *Tetrahymena thermophila* mRNAs using RNA ligase mediated amplification of cDNA ends (RLM-RACE). *Nucl. Acids Res.* 21: 4954-4960
- Liu DY, Tesh RB, Travassos da Rosa APA, Peters CJ, Yang Z, Guzman H, Xiao SY (2003)** Phylogenetic relationships among members of the genus *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*) based on partial M segment sequence analyses. *J. Gen. Virol.* 84: 465-473
- Lober C, Anheiner B, Lindow S, Klenk HD, Feldmann H (2001)** The Hantaanvirus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA. *Virology* 289: 224-229
- Lucas WJ, Wolf S (1993)** Plasmodesmata: the intercellular organelles of green plants. *Trends Cell Biol.* 3: 308-315

Maliyakal EJ (1992) An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. Nucl. Acids Res. 20: 2381

Maiß E, Breyel E, Casper R, Lesemann DE (1987) Detection of Plum pox virus by isolation of double-stranded ribonucleic acid (dsRNA). Bulletin OEPP/EPPO 17: 91-95

Matsuoka Y, Chen S-Y, Compans RW (1995) A signal for golgi retention in the bunyavirus G1 glycoprotein. J. Biol. Chem. 269: 22565-22573

Melcher U (2000) The '30K' superfamily of viral movement proteins. J. Gen. Virol. 81 : 257-266

Meyer BJ, Schmaljohn CS (2000) Accumulation of terminally deleted RNAs may play a role in Seoul virus persistence. J. Virol. 74: 1321-1331

Mielke N (1999) Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren aus Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) mit virusähnlichen Krankheitssymptomen. Diplomarbeit Universität Hamburg: 82 S.

Milne RG, Djelouah K, Garcia ML, Dal Bo E, Grau O (1996) Structure of Citrus ringspot-psorosis-associated virus particles: implication for diagnosis and taxonomy. 13th IOCV Conference – Other Viruses: 189-197

Morozov SY, Solovyev AG (2003) Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. J. Gen. Virol. 84: 1351-1366

Morris TJ, Dodds JA (1979) Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. Phytopathology 69: 854-858

Muller R, Poch O, Delarue M, Bishop DH, Bouloy M (1994) Rift valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. J. Gen. Virol. 75: 1345-1352

Naidu RA, Ingle CJ, Deom CM, Sherwood JL (2004) The two envelope membrane glycoproteins of Tomato spotted wilt virus show differences in lectine-binding properties and sensitivities to glycosidases. Virology 319: 107-117

Namvar K, Spethmann W (1983) Die Baumarten der Gattung Sorbus: Vogelbeere, Mehlbeere, Elsbeere und Speierling. Allg. Forstz 36: 937-943

Newbury HJ, Possingham JV (1977) Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissue containing interfering phenolic compounds. Plant Physiol. 60: 543-547

- Nienhaus F (1985)** Zur Frage der parasitären Verseuchung von Forstgehölzen durch Viren und primitive Mikroorganismen. Allg. Forstz. 6: 119-124
- Nienhaus F, Castello JD (1985)** Viruses in forest trees. Annu. Rev. Phytopath. 27: 165-186
- Noda H, Nakashima N (1995)** Nonpathogenic reoviruses of leafhoppers and planthoppers. Semin. Virol. 6: 109-116
- Ohara O, Dorit RL, Gilbert W (1989)** One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5673-5677
- Ohba K, Mizokami M, Lau JYN, Orito E, Ikeo K, Gojobori T (1996)** Evolutionary relationship of Hepatitis C, pesti-, flavi-, plantviruses and newly discovered GB hepatitis agents. FEBS Lett. 378: 232-234
- Oparka KJ, Roberts AG, Roberts IM, Prior DAM, Santa Cruz S (1996)** Viral coat protein is targeted to, but does not gate, plasmodesmata during cell-to-cell movement of Potato virus X. Plant J. 10: 805-813
- Osborne JC, Elliott RM (2000)** RNA binding properties of Bunyamwera virus nucleocapsid protein and selective binding to an element in the 5' terminus of the negative-sense S segment. J. Virol. 74: 9946-9952
- Ou WJ, Cameron PH, Thomas DY, Bergeron JJ (1993)** Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. Nature 364: 771-776
- Padula PJ, Sanchez AJ, Edelstein A, Nichol ST (2002)** Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Andes virus and analysis of the variability of the termini of the virus S, M and L segments. J. Gen. Virol. 83: 2117-2122
- Park C-J, Bae S-H, Lee M-K, Varani G, Choi B-S (2003)** Solution structure of the Influenza A virus cRNA promotor: implications for differential recognition of viral promotor structures by RNA-dependent RNA polymerase. Nucl. Acids Res. 31: 2824-2832
- Pettersson RF (1991)** Protein localization and viral assembly at intracellular membranes. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 170: 67-104
- Pettersson R, Kääriäinen L (1973)** The ribonucleic acids of Uukuniemi virus, a noncubical tick-borne arbovirus. Virology 56: 608-619
- Petty IT, Edwards MG, Jackson AO (1990)** Systemic movement of an RNA plant virus determined by a point substitution in a 5' leader sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8894-8897

- Pfeffer S, Dunoyer P, Heim F, Richards KE, Jonard G, Ziegler-Graff V (2002)** P0 of Beet western yellows virus in a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 76: 6815-6824
- Pletnev SV, Zhang W, Mukhopadhyay S, Fisher BR, Hernandez R, Brown DT, Baker TS, Rossmann MG, Kuhn RJ (2001)** Locations of carbohydrate sites on alphavirus glycoproteins show that E1 forms an icosahedral scaffold. *Cell* 105: 127-136
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1989)** Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 8: 3867-3874
- van Poelwijk F, Prins M, Goldbach R (1997)** Completion of the Impatiens necrotic spot virus genome sequence and the genetic comparison of the L proteins within the family *Bunyaviridae*. *J. Gen. Virol.* 78: 543-546
- Polák Z, Procházková Z, Braniaová H (1990)** Recent findings of viruses in forest trees on territory of the Czech Republic. *Arch. Phytopath. Pflanzenschutz* 26: 389-393
- Polák Z, Zieglerová J (1996)** Towards ringspots and variegation in mountain ash leaves. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 103: 432-435
- Prehaud C, Lopez N, Blok MJ, Obry V, Bouloy M (1997)** Analysis of the 3' terminal sequence recognized by the Rift valley fever virus transcription complex in its ambisense S segment. *Virology* 227: 189-197
- Qi ZT, Kalkeri G, Hanible J, Prabhu R, Bastian F, Garry RF, Dash S (2003)** Stem-loop structures II-IV of the 5' untranslated sequences are required for the expression of the full-length Hepatitis C virus genome. *Arch. Virol.* 148: 449-467
- Raineri I, Moroni C, Senn HP (1991)** Improved efficiency for single-sided PCR by creating a reusable pool of first-strand cDNA coupled to a solid phase. *Nucl. Acids Res.* 19: 4010
- Rajcani J, Vojvodova A (1998)** The role of Herpes simplex virus glycoproteins in the virus replication cycle. *Acta Virol.* 42: 103-118
- Raju R, Kolakofsky D (1989)** The ends of La crosse virus genome and antigenome RNAs within nucleocapsids are base paired. *J. Virol.* 63: 122-128
- Rao P, Yuan W, Krug RM (2003)** Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis. *EMBO J.* 22: 1188-1198
- Rezaian M, Krake LR, Cunyng Q, Hazzalin CA (1991)** Detection of virus-associated dsRNA from leafroll-infected grapevines. *J. Virol. Meth.* 31: 335-344

- Ringel A (2003)** Entwicklung eines Verfahrens zur Isolierung von Nukleinsäuren des viralen Erregers der Ringfleckkrankheit der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.). Diplomarbeit Universität Hamburg: 91 S.
- Roggero P, Ciuffo M, Vaira AM, Milne RG (1998)** Rapid purification of tospovirus nucleocapsids for antibody production and RNA analysis. In: Peters D, Goldbach R, Recent progress in tospovirus and thrips research. Wageningen University, Wageningen: 25-28
- Roggero P, Ciuffo M, Vaira AM, Accotto GP, Masenga V, Milne RG (2000)** An ophiovirus isolated from lettuce with big-vein symptoms. Arch. Virol. 145: 2629-2642
- Roossinck MJ (1997)** Mechanisms of plant viral evolution. Annu. Rev. Phytopath. 35: 191-209
- Rossier C, Raju R, Kolakofsky D (1988)** La crosse virus gene expression in mammalian and mosquito cells. Virology 165: 539-548
- Rott ME, Jelkmann W (2001)** Characterisation and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. J. Plant Path. 107: 411-420
- Ryabov V, Robinson DJ, Taliansky ME (1999)** A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1212-1217
- Saigner L (2000)** Virusnachweis mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Gesunde Pflanzen 52: 205-211
- Sala M, Wain-Hobson S (2000)** Are RNA viruses adapting or merely changing?. J. Mol. Evol. 51: 12-20
- Sanchez AJ, Vincent MJ, Nichol, ST (2002)** Characterization of the glycoproteins of Crimean-congo hemorrhagic fever virus. J. Virol. 76: 7263-7275
- Sambrook J, Russel DW (2001)** Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Satyanarayana T, Gowda S, Ayllon MA, Albiach-Marti MR, Dawson WO (2002)** Mutational analysis of the replication signals in the 3'-nontranslated region of Citrus tristeza virus. Virology 300: 140-152
- Schmaljohn Cs, Hooper JW (2001)** *Bunyaviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe DM et al. (ed.), Fields virology. 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia
- Schimanski H-H, Kegler H, Fuchs E (1987)** Wild-growing woody rosaceous plants as natural reservoirs of pome and stone fruit viruses. Zentralbl. Mikrobiol. 142: 239-255

- Schmelzer K (1977)** Zier-, Forst- und Wildgehölze. In: Schmelzer K, Spaar D (ed) Pflanzliche Virologie. Akademie Verlag, Berlin: 276-405
- Seifers DL, Harvey TL, Martin TJ, Jensen SG (1997)** Identification of the wheat curl mite as the vector of the High plains virus of corn and wheat. Plant Dis. 81: 1161-1166
- Severson WE, Partin L, Schmaljohn CS, Jonsson CB (1999)** Characterization of the Hantaan nucleocapsid-ribonucleic acid interaction. J. Biol. Chem. 47: 33732-33739
- Severson WE, Xu X, Jonsson CB (2001)** *cis*-acting signals in encapsidation of Hantaan virus S-segment viral genomic RNA by its N protein. J. Virol. 75: 2646-2652
- Shi X, Elliott RM (2004)** Analysis of N-linked glycosylation of hantaan virus glycoprotein and the role of oligosaccharide side chains in protein folding and intracellular trafficking. J. Virol. 78: 5414-5422
- Simons JF, Pettersson RF (1991)** Host-derived 5' ends and overlapping complementary 3' end of two mRNAs transcribed from the ambisense S segment of Uukuniemi virus. J. Virol. 65: 4741-4748
- Singh RP (1998)** Reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. J. Virol. Meth. 74: 125-138
- Singh RP (1999)** A solvent-free, rapid and simple virus RNA-release method for Potato leafroll virus detection in aphids and plants by reverse transcription polymerase chain reaction. J. Virol. Meth. 83: 27-33
- Soellick TR, Uhrig JF, Bucher GL, Kellmann J-W, Schreier PH (2000)** The movement protein NSm of Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 2373-2378
- Storms MMH, Kormelink R, Peters D, van Lent JWM, Goldbach R (1995)** The nonstructural NSm protein of Tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. Virology 214: 485-493
- Strauss JH, Strauss EG (2001)** Virus evolution: how does an enveloped virus make a regular structure?. Cell 105: 5-8
- Sweet JB (1980)** Fruit tree virus infections of woody exotic and indigenous plants in Britain. Acta Phytopath. Acad. Sci. Hungaricae 15: 231-238
- Tagle DA, Swaroop M, Lovett M, Collins FS (1993)** Magnetic bead capture of expressed sequences encoded within large genomic segments. Nature 361: 751-753

Takeda A, Sugiyama K, Nagano H, Mori M, Kaido M, Mise K, Tsuda S, Okuno T (2002) Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. FEBS Lett. 532: 75-79

Verstl A (1997) Diskret und genügsam – die Eberesche/*Sorbus aucuparia* ist Baum des Jahres 1997. Deut. Baumschule 49: 263-267

Valverde RA, Nameth ST, Jordan RL (1990) Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. Plant Dis. 74: 255-258

Wang SX, Hunter W, Plant A (2000) Isolation and purification of functional total RNA from woody branches and needles of sitka and white spruce. BioTechniques 28: 292-296

Werner R, Mühlbach HP, Büttner C (1997) Detection of Cherry leaf roll nepovirus (CLRV) in birch, beech and petunia by immuno-capture RT-PCR using a conserved primer pair. Eur. J. For. Path. 27: 309-318

White KA, Morris TJ (1995) RNA determinants of junction site selection in RNA virus recombinants and defective interfering RNAs. RNA 1: 1029-1040

Xu X, Severson WE, Villegas N, Schmaljohn CS, Jonsson CB (2002) The RNA binding domain of the Hantaan virus N protein maps to a central, conserved region. J. Virol. 76: 3301-3308

Zaccomer B, Haenni A-L, Macaya G (1995) The remarkable variety of plant RNA virus genomes. J. Gen. Virol. 76 : 231-247

7. Anhang

Anhang I – RNA- und Proteinsequenzen

Nachstehend sind die Sequenzen der vier identifizierten kodierenden RNAs 1-4 sowie die vom jeweiligen ORF abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Proteine p1-4 dargestellt.

RNA 1

```

AGTAGTGAAC TCCCTTAATA TACAAAAACT CAAACTCAAC TCTCATGGAA AACATAAGGA AACTTGAGGC ACAGCGAAGG 80
AAGGAATATT TGAGAGCTGA AACAGAGATA AGAAACAACA ATGTTTTCGA AAAGGACATA TTGCAGAAGT TTCTACATAT 160
TGTTGGCAAG AAACAGAGGC ATTACACTAT TTCTTCAAAA AAGAAGGAAG TTCAGGATAT TTTTAATAAA TGTTCACAA 240
ATCCTGGGTT TACTAAAGAT GTGATTGATC TAGCTGAGAG GATACTGTAT GCACCACCCA ATTTGAATCA GATTGATTTT 320
GCAATGACAA TTGTTTCCCT TATAGAGATG CAGAGGCATG ATGACTTGAT TCACAAGCTG AATGAACCTT TGGTGAGGTC 400
TGGCATGAAA GTGATATCAT TTGAATTTAA GTTATGTGAT CACTTCCCAT TCACAAACAG TATTCTGACT CCTGATATAC 480
TGTTTGAAGA TCCATATGGT TCTCGCTATA TACTTGAAGT TAAAGTGAGG AATAAACATA CAGATTGGGA GCATTATTAC 560
ATGAGATATA AGAAAGTTGT GGGTGTTCAT GCCAAAGTTG GTGTATTCAA TTTGTCACAG TCTGGTTACA TGCAACACGG 640
CGATTATAAA CTTTCTGAAA AAATCAATCT TGAATCAGAT GATTTTGATG ATATTTTGCT TTGTGTTGAA TTGGCTGGTA 720
AAATCAGGGA GAAATATATA CAATATCCAC AGTATTTCTT TTACACGCTA CAATCTGAAG TCACAAATCC AGATAGTTTC 800
CTTGATGGCT TCAAACTAG ATTATCTGAT CTTTCAATGT TTGAAGAAAT TAAGAGTGGT TTTGGTGATT ATTGGAATGA 880
TATAACATAT CACATGGATA ATTACAGTTT GATTGACAAT CATGATGAAG TTACTGAAGA TCTTCTAAAT TCCACTGATG 960
ACCTAACACA GTATTGCAAC GATTTGTATG ATGAGTTCCT GGATCATAGT CAATCTTACT CCAGACAAGG TAAGTATGGT 1040
AAGACAATAC TGAGGAATTC AGGTCTTGAT AACATAATTG ACAAAAAAAA CAGATCGAAG TACACCATAA CTTCAAAGCT 1120
GAAACCTAGT GTTTATATAC CAATAACAAA AACCATAAAA CTGGACACTT ATGGTGGTTC AAGGTTGAAA TTTTACAAAG 1200
ATGCCTTCAT TAATATAAAG TGCACTGGTG ATTCTTATTC AAGGTCTGCA TACAATCTGG TTGATAATGT TTTTAACACT 1280
AGTAGCATAG ACCTGCTTAT GACCAAAGAT GATAAAATTG ATCCTAGTTT ATACTATGAG GTGCTAGATC CAGGCTTTAT 1360
TGCTCATTTC CATGATGATC AAGTCAAATA TAAGAAGATT GCAAAGGTGA CAAATATCAC AAGTGACATG ACTATTCTTG 1440
CAAATAATTC ATTCTCAATC CATTGTCATA CTGATCAACG GTTGAAAGAC AACATTTGCG GTTACGATAA AAAACATTAT 1520
GACTCCACAC AAAAAGCTAA GGAGTGCTTA GATTTTTCCT ACAGCTCTCT TCTGTTACCA TCACTGGGCG TACACCTTTC 1600
TGCAATATTT AAATCTGAAC ACCATGCAGG AGTTTATTGG AATGACCTTG TTACATTGGG AACTGATAAT CTTAATCACA 1680
TGACATCAGA CATCCCAGAA GAAGCACAAA CAAAATTTT GGAGCATCTG TATAATTCAC ACATAATATT TAAAGCGATT 1760
ATTTCACTGA ATACAATAAA CTCACACAAA TTTCTGTTAT TACAATCACC AGATCCAGGA ACCATAATAA TACTACTTCC 1840
AAATTCTGAT GGGTTGAAAAG GTGCCCCATT AAGGTATTTT GTTGTTTCCA TATTACAAA ACAGGACAAT GATTCAATTG 1920
AAGCTAACAA GCTACTTGGG ATCTATCATT CTCATACAGA GTCAAAAAAA TACAAGATTA TGTGTGCCAA AGTTATTTCA 2000
TTAGATATAA CCAGGTTAAA GTTGCTTTCA AATTCATTTC TAAAATACTC ACTTTTGATA TCATATTATT CACAGTTTAA 2080
AAAAAGCTA AAATTGACA CTCATATGCT ATCATGGATG CTTTCACAAG TTACAACATAT AGCTTCACTT TCAATAACTG 2160
ATGTGTACAA AAATTTTCAT ATGGCCATAT ATTCAAGATTA TTCAAACATA GATGACCTAA TTAATGACAA GCTTGAATGT 2240
CGACCAAGAA CATTGGGTCA TGTGTTTGTT ATGAAGCATC TGTTTCAGGG AATAACTAGT GCAGTTGAAC AGTTAGGTAA 2320
AATAACAAG AACAGCTGA TAGCAGATGT TAATGATGAA GGTGAAGTGA TATCTACTGG TTTTGATCCA AATCTTAGAC 2400
TGAAGTTGCC AATAAGTCAA CTTAGCACGA ATAATCCCAA AGAGATCATA CATGAGTCCT TCATATTGTT TTAATCTTGA 2480
AATAAAGGTT TACATGGTTC ACCACAAGAG CTGTTAAATC TGTATTACAC ACCAATGCAA TTTGAGTCTG AGTACACAAA 2560
AATGATGACT GACTGTGGAC TCTATTGTCA GGAATTAGGA AATAATGGTA ATCTATCATT CTCATTTCAA GCAATGTTTT 2640
TAACTTCCAA AGTGGCATAT GCAAAGTTAT TGAACAACAC TGATGAAATA AGGAGGTCAC TAGTTAAAGA GATGAAAATG 2720
GATGAACCAA TAATGTCAAT AAAACAGTTT TCATCAACAA AATCTATGGT TTCAAATAGT GTTCCTGATA TGCTATTAA 2800
AGATTGCAAT CTGAACAAAA ACATTGATGT TATTCAGCTT GAAAGGTATA TTGACACCAG TTTAATCTCA GACCCAATGA 2880
AGTATATCAC TTTAATGAAC AATTCTATTG AGTCAATAAA TCAAGAAAGA TTATTGATAT ATAAAGACAA ATTGAACAAA 2960
GGTATTGTTT TATTGCCTAA ACTGATATTA ACAACTTTCA AAGGAAAGAG TTTTATTGGT CTGGAAAACC ATTATTACAC 3040
CAAGTTAGTT TCGGGCGATT ACATTAAACA AACCAATACT AAGGTATTCG ATGAGTTTTA TAGATTGACA GATGAAATTC 3120

```

AAGAAGAAAA	ATTAAGAGGG	TTTTATAAAG	GATATATAAC	AGAAGGGGAT	CTTTTGGTAA	GAATCTTTAA	TAAAGATCAA	3200
AGGACCACAG	ATGATCGTGA	AATCTACACA	GGTAATGCAC	AAGTTAGACT	CTGTTTATAC	CCACTTGAAA	TGACATTCAA	3280
ATCGATATGC	AAAAAGATAC	CTGAGGAAGC	TATAACTATT	TCTGGTGATC	AGAAGCAGAG	GAAATTACTT	GAACAACGTC	3360
TTGCATTGAT	AAAAACTAAA	AGACAATTTA	ACAAGTCAGG	TTATAAAACT	GAGATTTATT	CAGTTTCATC	AGATGCATCA	3440
AAATGGTCTG	CTCGAGATTT	GTTACCAAAA	TTCATAATAA	GCATTGCAAC	TAATCCATAC	CTCACATCAG	ATGAGAAATA	3520
TTTCCTTG TG	TATTTATTGG	TTAGGTATTA	TGATAAAAAG	ATAGTGTTAA	CAGATTCTGC	CTTTAGTAAT	GCTTTAAGAT	3600
TTAGTAGAGA	AGATATCAAT	GGTAAATATG	AAGAGATGAC	TAACAATTTT	ACACAAAAC T	GGTTAATGT	TAGATCTAAT	3680
TGGCTACAGG	GCAATCTCAA	CATGACCTCA	TCATTTGTTT	ATCATTGTAG	TACAATTATG	ACTGATACGC	TTTTATCAAT	3760
TAGTGCTAAA	CACAATGGAT	TTGAGGCTGT	CATGACATCT	ATGGTACACT	CTGATGATTC	CACCTATGAT	TTCTTAATTG	3840
CTAAAAATTC	AAAAACAAGT	TCATATATAA	ACAATGAAGC	CAATATGGGT	AGATTTATAA	TTTCGCTGAT	AACATACTCA	3920
AACAAGAAAC	ACTGTATAAC	TTTAAATGAA	AAGAAAACCT	ATATAAGCAC	ATTTTATAAA	GAATTCTTAT	CAACAACCAT	4000
AGTTAGTAAT	GAGCTATTTT	TCTTTTACAT	GGCTGATCTT	ATGCCCATAT	CTAGCGACAC	TAGTTACAAG	TCTCCATTAG	4080
AAGATTTGGC	ATCTTACACA	GGATACATAA	ACAATCATT	CTCACATGCA	TGTCCTATTC	AAATTTTGAA	ATGTGCAATC	4160
ACTCTCTTAA	ATCATCTAAC	ATTATCAACA	TATAACATGC	AATATACTTC	TGAGAAGAAT	CCTAGATGTA	ATATACCAA	4240
TTCTACTGAT	TTGCCTATAC	AGATTTATCC	AAGATATAAA	TTACCATTAT	CATTAGCTGG	TTGTATTCCA	TATTATTCAT	4320
CAGACGCATA	TAACATATTA	GATGATATCA	TCAAACTTTT	AGAAAAAAC	AAGGTTATTA	AAAATTCATT	GCTTGAAGAT	4400
GTTATAGACG	ATGAAACCTT	TGATGAATAT	ATAACACTTG	TGAATAAGCA	AAAGCCTGAA	TATGCCAAAT	ATATTCAGC	4480
TTGCCTATTG	ACTATGGATT	ATACTCAGTA	TGAGAGAGAT	GACGAAGACC	CATATAATAT	AGTTGATTAT	GACCTAAGCC	4560
AAAAAAGTAT	AATAAATGTA	GCATCAATTA	ATAAGGGTTC	TAGAATTAAT	AAGACTTATA	CTTATAAAAA	ATATTTAGAA	4640
AATGAAACAG	ATATTAGATT	GACTAGCTGT	GTAATATCCCA	TGTGGTG CAT	ATCAAAGCCC	AAAGATGAAG	TCTTGATAAA	4720
AAATCCGATT	TTGGCAAATT	ACATGAATCC	AACTTTTAAA	GATTCATAA	TATTTTCGAA	ATCTGCACTT	GATTATGGCA	4800
GAAGAATAAT	TGGATCAAAAT	AAATCAATGG	ATACACTAAG	TTCACATGCA	TTTGAAAAAG	AAAAGAAACA	GGGTATAAAA	4880
ACTATCTATA	AGAAGCTTGA	TGATAAAAATA	TCTACTGTTG	AAATTAGTAA	ACAATCCCTA	CAAAGATTCT	TAGAGTGTAT	4960
TTATTACAGT	ATAAAAAAT	CTCTGGTCGC	ACTTCAAGTA	TACTATAGCA	AAGTACAGGT	ATTAGTTAAA	ACTCGACCTG	5040
AATTTACAAA	GGTTATTATG	CCAAGAAGTG	TATATGCTGA	AGAATATGGT	AAAAATTCCA	ACACATCTAT	GGTTGAAAAT	5120
TTATTGGTGG	AACAGTACTG	TGAGATAGAG	CAAGTTGATT	CAAAGGTTGA	AAAATTCATA	TCATTCTGCA	AACATGTTCT	5200
GCAGCGGTGT	GGTGATATTA	AGATCTATAG	AGATCCTGAA	GATATTGATG	ATGATTT CAG	GAAATATATT	GAATTTAAAT	5280
ACACATTTAA	AGATGCAACC	ATGGGTCTAA	TTCAACCTCA	TCAACATTTG	GCAGAATATG	CATTTGATGT	GTACAATAAC	5360
AAGCTAATAT	TCCAAGGATT	AATGGTCAGG	TATTATATTG	ACATCTGTGA	AACAATATCA	AATCCAAGTT	ATAACATACC	5440
TAGCTATACT	TCTCCAAATT	CCATCATAAT	GACATTAGAT	TCTTTAATGA	AGAGAGATGA	AATATCATCA	AAAATATACA	5520
TATCACATAT	AAGAACCAAC	AGGTTTGATG	AATATTGGTT	GTCAAGATTT	GGTATGTATG	TGTATGAAAA	CTATTTTGTA	5600
AAGTACAAGT	TGGGATATAG	AATTAAAAATA	GCCGCAAATG	AAAAACTAAT	GCCAACAATG	AAGAAAGTAA	GGAATTTACG	5680
TGAACCATTT	AAATTCATTT	GTTCTCTAGT	TGCAAAATGAT	CCTAGTTTAT	TCATCCAAAT	GACTGAATCA	CCTGATTTCC	5760
AGATTTTCAGG	TTGGAAATAC	TCTGATATAA	TTGCTGAAAT	GAAGAGCACA	ACAGATTTCA	GCTACAATCT	ATTTCTTTAC	5840
ATGATGAATG	AAATAAATTT	CCAAACATTA	ATGAGAGTCA	TGAATCTGAA	CAGGCGTGTC	TGGAATCATT	GGTTGATGAA	5920
AACTGACAGT	GAACCTTCAG	ATCCAAATGC	TTCAATTGCA	CTTTATATGT	ATCAATCAAC	AGTTGTTAAA	GTCCAGACCA	6000
AAACGATTGG	TGGTGGTGTC	ACTTTTTCGA	TGCTATTATT	GAGACATGGC	ATGCAACATA	GACAGGCATT	TGATGAGATC	6080
TCTAAAAAAA	TAGCTTCTGA	TTATGCCCCA	CAGTTGAGGA	TTGCAAACAT	CACTCCTCAA	ACTTCTTTTG	GTCGTTTACA	6160
ATTTTGCGTG	AATGAGTATG	GAAGAACAGT	TAAACCAGGA	TCTTATAGAT	CTTCGTGTAT	TTGTAATGTT	AATATAGCAG	6240
CTTTAACTGA	TCTTAAACCA	GACATTGCCT	ATAAAGAAAA	CACCATAAAT	CAGATCGTAA	CTATAATCAG	TCCCACATTT	6320
GAAGGAGAAT	TTGTATTCAA	GTTGAATACA	TATTGTGATA	GCGAATACTA	TACCTGTGTT	ATGTTAGAGA	ACTTAGATTT	6400
AAACAGGGTA	ATGATATTGG	ACCATCTGTG	CAGAGGGAAG	TATTTGATCG	AAAACCCAGA	ATATTTCACT	GAGATATCAG	6480
ATCAAATAAC	ACCTGGAGCA	TGCTTAGCAC	TATTTTCAAA	CAATGTAAAT	AACAAATTGT	GGTCAAACAC	AATAGATACA	6560
TCTAAATTTG	CAAAGCTTGT	TCATATTGGC	AATTATCTCA	AACTGAACA	TGAAGCCAGT	ATTGTGACGA	AGTTATGTGA	6640
TTCATTGGTT	GCTATCTGTG	CTCTGAATGG	TATAGATCAC	ACTCTCAGTC	TGAAACCTGA	CAATTTCAAT	AAATCATTTA	6720
GACAATACAA	GCTTAGCTAT	GGCTTTCATG	AAGAATTTTA	TAATAATTAC	AAGAAGAACG	AACGTGAACC	ATATACTGAA	6800
CTAATTATGG	CTATTGCATC	AACAGCTGGT	GACCCATTTT	AGAAAGTCAT	TTTAGCAATT	ATAACAATCT	TTAAAGCATA	6880
TACAGATTTA	TTCATTTTAT	ATAAACTGA	CGAGGTGAA	TTT TAA ACTC	ATGTGATTTA	TTTGATTCTA	ATTAAGAACG	6960
CACTTAATGG	TGTGACTATC	CTTATATTTT	GAAATTTAAA	GTATTTTGCT	GATTTGATTT	AATTAAGGGA	GAACACTACT	7040

p1

```

MENIRKLEAQ RRKEYLRAET EIRNNNVFEK DILQKFLHIV GKKQRHYTIS SKKKEVQDIF 60
NKCSTNPGFT KDVIDLAERI LYAPPNLNQI DFAMTIVSLI EMQRHDDLIIH KLNELLVRSG 120
MKVISFEFKL CDHFPFTNSI LTPDILFEDP YGSRYILEVK VRNKHTDLEH YYMRYKKVVG 180
VHAKVGVFNL SQSGYMQHGD YKLSEKINLE SDDFDDILLC VELAGKIREK YIQYPQYFLY 240
TLQSEVTNPD SFLDGFKTRL SDLSMFEEIK SGFGDYWNDI TYHMDNYSLI DNHDEVTEDL 300
LNSTDDLTQY CNDLYDEFLD HSQSYSRQ GK YGKTILRNSG LDNIIDKKNR SKYTITSKLG 360
PSVYIPITKT IKLDTYGGSR LKFYKDAFIN IKCTGDSYSR SAYNLVDNVF NTSSIDLMT 420
KDDKIDPSLY YEVLDPGFIA HLHDDQVKYK KIAKVTNITS DMTILANNSF SIHCHTDQRL 480
KDNICGYDKK HYDSTQKAKE CLDFSNSLL LPSLGVLHSA IFKSEHHAGV YWNDLVTLGT 540
DNLNHMTSDI PEEAQTKFLE HLYNSHIIFK AIISLNTINS HKFRLLQSPD PGTIILLPN 600
SDGLKGAPLR YFVVSILQKQ DNDSIEANKL LGIYHSHTES KKYKIMLSKV ISLDITRLKL 660
LSNSFVKYSL LISYYSQFKK SLKFDTHMLS WMLSQVTTIA SLSITDVYKN FIMAIYSDYS 720
NIDDLINDKL ECRPRTLGHV FVMKHLFQGI TSAVEQLGKI NKNKLIADVN DEGELISTGF 780
DPNLRRLKLP I SQLSTNNPKE IIHESFILFY LGNKGLHGSP QELLNLYYTP MQFESEYTKM 840
MTDCGLYCQE LGNNGNLSFS FQAMFLTSKV AYAKLLNNTD EIRRLVKEM KMDEPIMSIK 900
QFSSTKSMVS NSVPDMSIKD CNLNKNIDVI QLERYIDTSL ISDPMKYITL MNNSIESINQ 960
ERLLIYKDKL NKGIVLLPKL ILTTFKGKSF IGLENHYTK LVSGDYIKQT NTKVFDEFYR 1020
LTDEIQEEKL RGFYKGYITE GDLLVRIFNK DQRTTDDREI YTGNAQVRLC LYPLEMTFKS 1080
ICKKIPEEAI TISGDQKQRK LLEQRLALIK TKRQFNKSGY KTEIYSVSSD ASKWSARDLL 1140
PKFIISIATN PYLTSDEKYF LVYLLVRYD KKIVLTDSAF SNALRFSRED INGKYEEMTN 1200
NFTQNWFNVR SNWLQGNLNM TSSFVHHCS IMTDTLLSIS AKHNGFEAVM TSMVHSDST 1260
YDFLIAKNSK TSSYINNEAN MGRFIISLIT YSNKKHCITL NEKKTYISTF YKEFLSTTIV 1320
SNELFFFYMA DLMPISDTS YKSPLEDLAS YTGYNNSFS HACPIQILKC AITLLNHLTL 1380
STYMQYTSE KNPRCNIPNS TDLPIQIYPR YKLPLSLAGC IPYYSSDAYN ILDDIIKTLE 1440
KNKVIKNSL EDVIDDETLD EYITLVNKQK PEYAKYIQAC LLTMDYTQYE RDEDYPYNIV 1500
DYDLSQKSII NVA SINKGR IKKTYTYKKY LENETDIRLT SCVNPMWCIS KPKDEVLIKN 1560
PILANYMNP FKDSLIFSKS ALDYGRRIIG SNKSMDTLSS HAFEKEKKQG IKTIYKKLDD 1620
KISTVEISKQ SLQRFLECIY SVIKKSLVAL QVYYSKVQVL VKTRPEFTKV IMPRSVYAE 1680
YGKNSNTSMV ENLLVEQYCE IEQVDSKVEK FISFCKHVLQ RCGDIKIYRD PEDIDDDFRK 1740
YIEFKYTLKD ATMGLIQPHQ HLAEYAFDVY NNKLIFQGLM VRYIDICET ISNPSYNIPS 1800
YTSPNSIIMT LD SLMKRDEI SSKIYISHIR TNRFDEYWLS RFGMYVYENY FVKYKLG YRI 1860
KIAANEKLMP TMKKVRNLRE PFKFICSLVA NDPSLFIQMT ESPDFQISGW KYSDIAEMK 1920
STTDFSYNLF LYMMNEINFQ TLMRVMNLNR RVWNHWMKKT DSEPSDPNAS IALYMQSTV 1980
VKVQTKTIGG GVTFSMLLLR HGMQHRQAFD EISKKIASDY APQLRIANIT PQTSFGRLQF 2040
CVNEYGRTVK PGSYRSCIC NVNIAALTDL KPDIAYKENT INQIVTIISP TFEGEFVFKL 2100
NTYCDSEYYT CVMLNLDLN RVMILDHLCR GKYLIENPEY FTEISDQITP GACLALFSNN 2160
VNNKLWSNTI DTSKFAKL VH IGNYLKTEHE ASIVTKLCDS LVAICALNGI DHTLSLKP DN 2220
FIKSLRQYKL SYGFHEEFYN NYKKNEREPY TELIMAIAS AGDPFQKVIL AIITIFKAYT 2280
DLFISYKTDE VEF 2293

```

RNA 2

```

AGTAGTGAAC TCCTCAAAGT AATTCAAAAT TGAAAAAAC TCTTTTAATA TCCCAAAAT AT GTTGAGTGTT GCCCAAAGCA 80
GTGCGTTATT TCTTCTTCAA GCCATCTGTA TATTGTATAT TACTAAGCTG ACAATTCCCA CACCAGTTTC AGAAATAAAC 160
CTGGTAAGAC AAAGTGAAGT TGTTTGTGTG CCGATTATAT CTAGATCTGG TACAGATTAC ATAACCTGTT TCAATAATTG 240
CCAAATCGAG CCTATAAATA CCAAGTTATA TAATTCAACA TGCACTAAGA TGGTAAATAT TACATTAGTT CGATGTAATA 320
ATGAAGTGTA TGTGATGACT TTACCTAATT TGGTGTCTAA TAGATCTCAT AGTTGGGAAG TTCTGATTAA TTATTTACTG 400
AGATTTATCT CTGCTATTAT AGTTTATCTC TTGCTGTCTA TATCGAAACA AGGCATATTC TTATTTTTTTT CGATAGTGCA 480
CTATTCTTTC AAGTTCATTA AAAACAAAAA GAGCTGTAAT ATCTGTGGGA ATGATTTTTA TTTTATTCAT ATTGACTGTC 560
CGAAACCAGA TTTTACAAAA AGGAGTGATT TCCACATGAT GTTTTACATT ATCTTATTTT TTTCTTTATT TTTTGTGTGA 640
ACTCATGCTG ATGATAATGT ATATAATTAC TATGAACACG GTGATCTGAC TGAAATACAA TTGTGGACA AAGAACACTA 720
TTCACAAGAC TTTGTTTCAG ATGGATTCTT TTATAATTTT TATGTTGAGA ATTCACATCT TATCTATGAT ATTTCAAATA 800
TCTCAACAAT TACAAGACCA GTCAAACACA ATGAAGTCAC ATCCACATGG TCATGTGATG GTAGTAGTGG TTGTTATAAA 880
GATCATGTGG GTAAATATAA TAAGAAGCCA GATTATGTTC TTAAAAAGT TCATGATGGA TTTAGCTGCT TCTTCACGAC 960
TGCAACCATA TGTGGAACAT GTAAGTCTGA ACATATAGCA ATTGGTGATC ATGTTAGAGT CATTAATGTC AAACCATACA 1040
TACACATTGT GGTCAAAACA GCAAATAAGA CAGATAAAAT AGTGATCGAT GAATTCAATA AATTCATTCA CGAACCATAT 1120
TATATCAAAC CTATCACACA GATCCATATA GATCAGCATG ATTTTCTTGT AACTGGTTCA AAGGTTTATC AAGGAACATT 1200
TTGTGAAAGG CCATCTAAAT CCTGTTTCGG ACCAACTAT ATAACAAGTG ATAAAAACAGT GACTTTACAT GAACCAAAAA 1280
TTAGAGACAC ATTCACACAT GATCGTGAAT ACATCATTGA TTATGTGAT TATCCATCTA ATTCTGATTT GGAATCATTG 1360
GAATTGACTG ATATGGTCCA TCACAGTGAT AAGATTTATT CACCATATGA TTTTGGTTTG ATATCAATTG GTATACCTAA 1440
ATTGGGTTAT TTAGCTGGTG GTTTTTGTGA ATCGCTTGTA TCTGTTAAAA AAATTGAAGT TTATGGCTGC TATGATTGTC 1520
AGAATGGTGT AAAAATTTC A GTCACCTATG AGTCATCTGA CAGTTGCCAC ACATTGATTT GTAAGCATGA TTCAACAACA 1600
CACAGATATT TTGTACAACA ACACACAACA ACATTGAAC T TCACAGCTT CATGAGTAA AAAGATACAA TCATTGAGTG 1680
CAATCAGATG AGGAAAGCTT TAAATCTTGA TGAGTCATCT GAAACATCTG TTTACTTTGA AAGTAATGGC GTCAAAGGTA 1760
GTGCAAAAGA GCCAGTTAAC TTTGATTTC TAAAGAATTT ACTGTATATA GATTATAAAA AAATAATATT TGTTTTTTTG 1840
GTAGCCATTA TAAGCATTGG TATATTTCTT AGATCACCAT ATATGTTATT GTCAAGTATA TTAAATTTA GGAAGAAG 1920
GAAAGTTGTG GCCACAAACA GATCTGAACA GCTTGTCATG GATGATGATG TTGATGTATT CATAGGGCCA CCAAGTTAGA 2000
ATATCTAAT CCAGTTTGCT AGAACTATAA ACTAGTAGTT TGCTAGAACT TTAACTAGT AGTTGGTAAC TTAACCAG 2080
TTGGATCAA CAACTTTAA ATTTGAGCGG GTTGCCCTAG GCTGACAGGA ACTTAGTAAC CATCTACAGT GCCATTTATG 2160
TCATTGGATG GTGAGGATTC GATCTACTGA TGCTGGCATG ATTCGTAAAA CAAGAATCCA GCTCTTTAGG TTTGCCTGTC 2240
TTCATACCCA CGCATCTGTT ACACATCATC TCAATATTTT ATGCATTTT AAAAGATTT GTTAAACGTT TTTGAACTTT 2320
GAGGAGAACA CTA CT 2335

```

p2

```

MLSVAQSSAL FLLQAICILY ITKLTIPTPV SEINLVRQSD CVCVPIISRS GTDYITCFNN 60
CQIEPINTKL YNSTCTKMVN ITLVRCNNEV YVMTLPNLVS NRSHSWEVLI NYLLRFISAI 120
IVYLLLSISK QGIFLFFSIV HYSFKFIKNK KSCNICGNDF YFIHIDCPKP DFTKRSD FHM 180
MFYIILFSL FFVVT HADDN VYNYEHGDL TEIQLLDKEH YSQDFVSDGF LYNFYVENSH 240
LIYDISNIST ITRPVKHNEV TSTWSCDGSS GCYKDHVGKY NKKPDYVLKK VHDGFSCFFT 300
TATICGTCKS EHIAIGDHVR VINVKPYIHI VVKTANKTDK IVIDEFNKFI HEPYHIKPIT 360
QIHIDQHDFL VTGSKVYQGT FCERPSKSCF GPNYITSDKT VTLHEPKIRD TFTHDREYII 420
DYCDYPSNSD LESLELDMV HHSDKIYSPY DFGLISIGIP KLGYLGGFC ESLSVKKIE 480
VYGCYDCQNG VKISVITYESS DSCHTLICKH DSTTHRYFVQ QHTTTLN FHS FMSKKDTIIE 540
CNQMRKALNL DESSETSVYF ESNVKGSAK EPVNFDFIKN LLYIDYKKII FVFLVAIISI 600
GIFLRSPYML LSSILKFRKR RKVVATNRSE QLVMDDDVDV FIGPPS 646

```

RNA 3

```

AGTAGTGAAC TCCATAAATT TTGCTAAAAT CAAACTCTTC TTAAAACAAC TGAACATTTT GGATATTCTC CTGATAAAGT 80
GCGTTTGTG TGTGAATAC ATCTTTTCAA GAATTAATCA TGCCATTAT TCCAAAGCCC AAGAGTCAA CCAAGGGTAG 160
TGTGAATCC TCAAAGAAAG AAAGTCGAGT AAAAAAGGAA ACTTCAGATG CTAAATACAT GGTGGCAAT GAAGTTAAGA 240
CAATAAAATT CTTAGACATG AGGGGTAACA TTGCAACTTC AGCTAGGAAT AGTTTGAATA TCAGTCCTGG AGTATTTGCT 320
GTAAATCCAT TTCTTGGTGA GACTTTAGCT GAGGACACAT TTAACATACT CGACTATGCT GGTCTTGGA AC GTTGATGC 400
TTGTGCTTCA CATTTATCCA GGAGTCAAGA ACTTAGAGAA CAAGTCACAG AAAAACTTT GAGAGAAGTT CCAATCTCTG 480
ATAGTTATGT TTTGAAAGTG GTCTCAAATC TGCAAGCTAC AACTGTACAA AATGTTGTAT CTTTCAACAA AGCATGTGCT 560
GTCATGTCAT TTAACATACT CAGGCACACC ACAGATGAAA TGTATGATTG GACCAAGAAT GAATATGTAT CTCTCGGACT 640
GAAAGAGAAA GCTGCCAAAG TGAACCCAAA TATAATCAAT AGACTTGCAG GACAGATCAA TCTAAGCCCA CAAAGTCCTT 720
ATTATTACTT AGTCACACCT GGTTATGAAT TCCTTTATGA TGCATATCCT GCTGAGACTA TTGCAATGAC ACTGGTGAAG 800
ATGGCATATA GGAAAACGAT GAACCTACCA GACTCAATGA AAGATAGTGA TATATGTTCA TCATTAAATG CCAAGATCAA 880
TAAAAGACAC AATTTGGCTG TAAACAACAT TGATGACATA ATCAAGCAAA TTGGTAAGAA GCACATTGAA GACATGTATA 960
ATACATTAAC ACAAACATC GCAATGTCTG GAAAAGAATC AAGAAATGTT GAAACTGCTC AGTCATTCTT GGCTCTCATA 1040
GAAAGCTTCA AAACAACCAC ATAAGAGTGT GGTGTATTTT TTATTCCTGT TCTGTATTTT TTTATATATT CCAATGTTTC 1120
TTTTGATTTA TTTGATTTC CTTTGTGTGT TTCCAGTTTT TTTGAACATG TTTCTATTAA TTTTATAATG TCTCTATTG 1200
TCATTAATG CTTTGAGATG TTTAGTATT TTACAGTTTT ATGAAAATAG AAAATCAAAA AAAATGTCTA TTTCTGGTTT 1280
GTTTTGTTA GTTTTATGTT GATGTCTCTA TTTCCCAATT ATGCTTCATT ATGTTTCTCA TGTGTGTTT G AATTTCTTTA 1360
TAGTTAGTAA ATATAGTATG TACATAAATT CCGAATAGTA AGCAAAGATC TAAGATTTAT GGCAAATATC ATATTTTTTA 1440
TCTATAGTTG ATTATGAGAA TATAGGAATA TAAAGATCGT ATTTATGAGC TTAAAACCAT AGATTTTGAT GTGCTTAAAA 1520
GAGTTGTTGA TTTGTTTTAA ATTATGGGAG AACACTACT 1559

```

p3

```

MPIIPKPKSQ TKGSVESSKK ESRVKMETSD AKYMGVNEVK TIKFLDMRGN IATSARNSLN 60
ISPGVFAVNP FLGETLAEDT FNILDYAGLG NVDACASHLS RSQELREQVT EKTLEVPIS 120
DSYVLKVVS N LQATTVQNVV SFNKACAVMS FNILRHTTDE MYDWTKNEYV SLGLKEKAAK 180
VNPNIINRLA GQINLSPQSP YYLVTPGYE FLYDAYPAET IAMTLVKMAY RKTMLNLPDSM 240
KDSDICSSLN AKINKRHNLA VNNIDDIKQ IGKKHIEDMY NTLTQNIAMS GKESRNVETA 300
QSFLALIESF KTTT 314

```

RNA 4

```

AGTAGTGAAC TCCCTAGACT TACATCTTGC TAAACACTCG AACTTTCAAC AAAAAATCTT CTAGGCTTTC TGTGATAAGC 80
ACGTTGAACA ACAATCTTAA TTTCAATATA TCTTTGAAGA GATTGTGTTA TCTTTCTGAT TTGTGATGGA GTCCAACAAG 160
ATGAAGCTTA TTACAAAAAT GACTGTGAAC AACTACAAA TGGATTCATG CAAAGCTGCT GCTAAAAGAT TCAAAAACGC 240
TACATGGGAA CTCATATCAA ATGATTTCAA TTTGGACATA ATGAATATGT TCTGCATACT CTATTATGCT TGTA CTCTCAC 320
ACGAATTGAA GCTTGATGAA CTTGTCTTTC AAAGTCTCA CAAGTAATC ATGAATGAGG TGTCAGTTTC TATTGGTGAA 400
TCCAGGATGT TCATAAGAAT TTATGTTTCA TTCCATATGC TTATGGGTGA TCTCAATGAG CTTCTACATC ATGGCATATC 480
TAAATTTGAA GGATCACCAA TAAAGACAT GACTTCATAC CTTATTTATG GAGAAGAATA TGTCAGAAAT CTATTTTACA 560
GCATAAATTC TACAAGAGCA ACTCCAGTCT ATCAGTTGTT CATCACAAG GTGCCAAGGC AATCCCAGC AATTACCCAT 640

```

```

GGTGA CT CAG AATACACTTA CATGCTTATG GTTCACA ACT ACTTGTC AAC TCAATCTATT GCTGGAGTAT CTCATACACC 720
TTCAAACAGT GATAATTATG TTATTAGAAC TGCTGAAGAA TATGTTACC ATCACTACGC TCAACTTGAT AGACAAGCTA 800
GTGACAATA GATGAGACCA GAATCATCAG ACCAAATGGA ATGATATGCC AACTTTATG TTTAATTTGG TTAATCTATC 880
TTTATGCAAT ATTTCCAGT TTGTTTTTAA TATGCTCTTA TCTATTTTCT ATTGGTTCTC AAATTTAGTC ACTTGTGTGT 960
TTATTGTCAG TACTTGCACT CTTAGTTGTA TTAATATGCT TTCATTTGTG CTTATGTTGT GAATTCCTGA AAACAGAAAA 1040
AAAACATAA AATTAAAAA CACAAAAAA TAATATTATA TATATAGTAT GTAAATATAG TTCCGTTTTT TACGGTTGTT 1120
TTATGAAATT AACTTTATTA GATTGTACTA TGTCATGATT TCTTTGATTA TATAACACTA TATTTCATCA TTTTGAACA 1200
ATTTAAGATT TCATAATCCT TTGAGTTTGA AGCATTTTGA TTTTCAAGAG ATTTGACAAT AACGCTTCAC TCGGATGGTT 1280
GATCCTATAA TGATTTAATA AAAAAGTCGA TTGTTTTTCG TTTTGGTAAG AATAGGGAGA AACTACT 1348

```

p4

```

MESNKMKSIT KMTVNTLQMD SCKAAAKRFK NATWELISND FNLDIMNMFC ILYYACTSHE 60
LKLDELVFQT AHKVIMNEVS VSIGESRMFI RIYVSFHMLM GDLNELLHHG ISKFEGSPIK 120
DMTSYLIYGE EYVRNLFQSI NSTRATPVYQ LFITKVPRQF PAITHGDSEY TYMLMVHNYL 180
STQSIAGVSH TPSNSDNYVI RTAEYVHHH YAQLDRQASD NKMRPESSDQ ME 232

```

Abb. AI: cDNA-Sequenzen der vier identifizierten kodierenden RNAs 1-4 des mit der Ringfleckigkeit der Eberesche assoziierten Virus sowie die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der ORFs (p1-4). Start- und Stoppcodons sind jeweils in rot dargestellt.

Anhang II – Virusspezifische Klone

Die Tabelle AI gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit erhaltenen virusspezifischen Klone

Tab. AI: Länge und Lage der Klone auf den RNAs 1-4. Zusätzliche rekombinanten Plasmide, die bei einer Klonierung erhalten wurden und das gleiche Insert wie die in der Arbeit aufgeführten Klone enthalten, sind in Klammern aufgeführt.

	Vektor	Länge [bp]	Lage auf der kodierenden RNA
V54 970.3	pCR 2.1 TOPO	962 (271 bp: 16 S rRNA spezifisch)	RNA 1: 6.099-6.750
V60 1495.8 (.13, .18)	pCR 4 TOPO	2.030	RNA 1: 709-2.695
V74 516.6 (.9, .11, .16)	pCR 2.1 TOPO	433	RNA 1: 6.645-7.040
V89.6 (.19)	pCR 4 TOPO	1.007	RNA 1: 1-968
V107.6 (.7, .9, .10, .18, .19, .20, .25, .28)	pCR 4 TOPO	1.429	RNA 2: 922-2.335
V113.2 (.10)	pCR 2.1 TOPO	158	RNA 2: 2.191-2.335
V116.3 (.12, .16)	pCR 2.1 TOPO	762	RNA 2: 1-749
V144.1 (.3, .4)	pGEM T-Easy	961	RNA 2: 1-948
V107.1	pCR 4 TOPO	495	RNA 3: 1.092-1.560
V133.10 (.14)	pGEM T-Easy	1.155	RNA 3: 1-1.147
V130.19 (.21, .35)	pCR 2.1 TOPO	1.356	RNA 4: 'full-length'-Klon

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach für die Betreuung dieser Arbeit. Seine großartige Unterstützung und sein erstklassiges Engagement haben wesentlich zum Gelingen beigetragen.

Frau Prof. Dr. Carmen Büttner möchte ich sehr herzlich für ihr stetiges Interesse und die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Frau Prof. Dr. Elke Pratje und Herrn Dr. Ralf Werner gilt mein Dank für ihre anregenden fachlichen Diskussionen und stetige Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Christina Timmermann für die tolle Zusammenarbeit in den ganzen Jahren bedanken. Dank ihr, wurde es auch in fachlich nicht so erfolgreichen Momenten nie langweilig.

Mein Dank gilt natürlich auch der gesamten Arbeitsgruppe für die tatkräftige Unterstützung und die sehr nette Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin möchte ich mich bei allen, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben, bedanken.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die in jeder Situation für mich da sind.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Bonn finanziert. Titel: DFG Mu 559/8-3 und 8-4.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Nicole Mielke
Anschrift	Silcherstr. 2b, 22761 Hamburg
Geburtsdatum	20.04.1974
Geburtsort	Hamburg
Nationalität	Deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung:

1980-1984	Grundschule Röthmoorweg, Hamburg
1984-1993	Gymnasium Dörpsweg, Hamburg
	Abschluss: Abitur

Berufsausbildung:

1993-1999	Studium der Biologie an der Universität Hamburg Abschluss: Diplom Hauptfach: Genetik/Molekularbiologie Nebenfächer: Mikrobiologie, Pharmazeutische Biologie Diplomarbeit: Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren aus Ebereschen (<i>Sorbus aucuparia</i> L.) mit virusähnlichen Krankheitssymptomen bei Prof. Dr. H.-P. Mühlbach
01-02/2000	Praktikum im Bereich Zellbiologie/Toxikologie, British American Tobacco, Southampton
02-12/2000	Freie Mitarbeiterin bei Prof. Dr. H.-P. Mühlbach, Molekulare Phytopathologie und Genetik, Universität Hamburg
01-12/2001	Sachbearbeiterin Marketing, British American Tobacco, Hamburg
Seit 01.01.2002	Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von H.-P. Mühlbach, Molekulare Phytopathologie und Genetik, Universität Hamburg Thema: Molekulare Charakterisierung eines mit der Ringfleckigkeit der Eberesche (<i>Sorbus aucuparia</i> L.) assoziierten neuen Pflanzenvirus