

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.