

Untersuchungen zum Replikationszyklus des
Tomato bushy stunt virus in einem *Nicotiana tabacum*-
basierten, zellfreien *in vitro*-System

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Beate Schulz

geb. am 04.02.1978 in Berlin

1. Gutachter: Prof. Dr. Behrens, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Gutachter: Prof. Dr. Deising, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Gutachter: Prof. Dr. Maiss, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.03.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Plusstrang-RNA-Viren – ein Überblick	1
1.2 Der Infektionszyklus von Plusstrang-RNA-Viren in der Pflanze	2
1.2.1 Eintritt des Virus in die Zelle und <i>uncoating</i>	3
1.2.2 Translation viraler Proteine	4
1.2.3 Replikation	6
1.2.4 Verpackung der RNA in Viruspartikel und Verbreitung	8
1.3 Das Modellvirus <i>Tomato bushy stunt virus</i>	8
1.4 Untersuchungssysteme für Pflanzenviren	12
1.5 Zielstellung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	15
2.1.2 Geräte	17
2.1.3 Bakterienstämme und Pflanzenmaterial	19
2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide	19
2.2 Anzucht von Bakterien und Kultivierung des pflanzlichen Versuchsmaterials	22
2.2.1 Anzucht von <i>E. coli</i> und Bestimmung der optischen Dichte	22
2.2.2 Fermentation von <i>E. coli</i>	22
2.2.3 Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	23
2.2.4 Kultivierung der pflanzlichen Suspensionkulturen	24
2.2.5 Anzucht und Haltung der <i>Nicotiana benthamiana</i> Pflanzen	25
2.3 Molekularbiologische Standard-Methoden	25
2.3.1 DNA-Methodik	25
2.3.1.1 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	25
2.3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	25
2.3.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA	26
2.3.1.4 Auftrennung von DNA per Gelelektrophorese	26
2.3.1.5 Reinigung von DNA	27
2.3.1.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
2.3.1.7 Dephosphorylierung von DNA	27
2.3.1.8 <i>blunt end</i> -Erzeugung an DNA-Fragmenten	28
2.3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten	28
2.3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion	28
2.3.1.11 Einführung von Mutationen in DNA – zielgerichtete Mutagenese	30
2.3.1.12 Sequenzierungen	30
2.3.2 RNA-Methodik	30
2.3.2.1 Phenol-Chloroform Extraktion von RNA und Fällung	30
2.3.2.2 RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial – Trizol-Methode	31
2.3.2.3 RNA-Isolierung aus Viruspartikeln	31
2.3.2.4 Konzentrationsbestimmung von RNA	31
2.3.2.5 Auftrennung von RNA per Gelelektrophorese	32

2.3.2.6	<i>in vitro</i> -Transkription.....	32
2.3.2.7	Phosphorylierung von RNA zur 5'-End-Markierung	33
2.3.2.8	radioaktive Markierung von RNA per <i>in vitro</i> -Transkription.....	33
2.3.2.9	3'-End Oxidation von Transkripten.....	34
2.3.2.10	Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung	34
2.3.2.11	RNase H-Behandlung	34
2.3.2.12	c-DNA-Synthese.....	35
2.3.2.13	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	35
2.3.2.14	Northern Blot.....	36
2.3.2.15	Auswertung von Autoradiogrammen.....	37
2.4	Arbeiten mit Pflanzen, pflanzlicher Zellkultur und Lysat.....	37
2.4.1	Präparation zytoplasmatischer Extrakte aus pflanzlicher Suspensionkultur	37
2.4.1.1	Präparation von BYL und LeL	37
2.4.1.2	Präparation von AtL.....	39
2.4.2	<i>in vitro</i> -Translation und Luciferase-Assay	39
2.4.3	gekoppelte <i>in vitro</i> -Translations-/ Replikationsreaktion	40
2.4.4	Infektion von <i>Nicotiana benthamiana</i> Pflanzen mit viraler RNA bzw. Viruspartikeln	41
2.4.5	Präparation von Viruspartikeln.....	41
2.5	Proteinbiochemische Methoden	41
2.5.1	Konzentrationsbestimmung nach Bradford	41
2.5.2	SDS-PAGE	42
2.5.3	Färbung von Proteinen in SDS-Gelen	43
2.5.3.1	Coomassie- Färbung von SDS-Gelen.....	43
2.5.3.2	Silberfärbung von SDS-Gelen.....	43
2.5.4	Western Blot	44
2.5.5	Testexpression des TBSV-p92 und -p33 in <i>E. coli</i>	45
2.5.6	Löslichkeitstest der in <i>E. coli</i> exprimierten p92- und p33-Fusionsproteine	45
2.5.7	Zellaufschluss nach der Fermentation	46
2.5.8	Isolierung und Solubilisierung der <i>inclusion bodies</i>	46
2.5.9	Dialyse von Proteinlösungen – Rückfaltung von Proteinen	47
2.5.10	Streptomycinsulfatfällung von Nukleinsäuren aus Proteinlösungen	47
2.5.11	Affinitätschromatographie- Reinigung des rekombinanten p92 und p33.....	47
2.5.12	SUMO-Protease-Behandlung des SUMO_p92 und SUMO_p33.....	49
2.5.13	<i>in vitro</i> -Polymerase-Assay mit rekombinatem p92	49
2.6	Elektronenmikroskopie.....	50
2.7	Statistische Auswertung	51
3.	Ergebnisse	52
3.1	Präparation von Lysaten aus verschiedenen Plusstrang-RNA-Virus Wirten	52
3.2	<i>in vitro</i> -Translation und -Replikation von TBSV.....	54
3.2.1	<i>in vitro</i> -Translation – Synthese viraler Proteine in BYL	54
3.2.2	Replikation viraler RNA im BYL.....	58
3.2.2.1	Replikation von TBSV-DI-RNA in BYL	59
3.2.2.2	<i>Template</i> -Spezifität des TBSV-Replikase-Komplexes in BYL	62
3.2.2.3	Die Bedeutung des <i>replication silencer element</i> für den TBSV-RNA Replikationsprozess in BYL.....	64
3.2.2.4	Die TBSV-Translation und Replikation sind nicht funktionell gekoppelt.....	68
3.2.2.5	Replikation von gesamtgenomischer TBSV-RNA in BYL	70

3.3 Untersuchungen zur Viruspartikel-Assemblierung im <i>in vitro</i> -Translations- /Replikationssystem.....	73
3.3.1 Detektion von Viruspartikeln per Elektronenmikroskopie	74
3.3.2 Hüll-Protein-vermittelte Nukleaseresistenz der TBSV-RNA - Nachweisversuch per RT-PCR	76
3.3.3 Infektion von <i>Nicotiana benthamiana</i> -Pflanzen als sensitives Testsystem für Viruspartikel	78
3.4 Reinigung und <i>in vitro</i> -Aktivität des rekombinanten p92	83
4. Diskussion	88
4.1 Eignung verschiedener Suspensionskulturen für die Präparation translations- / und replikationsaktiver Extrakte.....	88
4.2 Der Replikationszyklus des TBSV im Tabakzell-Extrakt BYL	89
4.2.1 Translation im BYL	89
4.2.2 Charakteristika des TBSV-Replikationszyklus im BYL	90
4.2.2.1 Replikation der TBSV-RNA in BYL.....	90
4.2.2.2 Der TBSV-Replikase-Komplex zeigt eine hohe Matrizen-Spezifität im BYL ..	92
4.2.2.3 Die Rolle des RSE für die Replikation des TBSV im BYL	94
4.2.2.4 Die TBSV-Replikation benötigt keine simultane Proteinsynthese.....	98
4.2.3 Eignung des BYL zur Untersuchung der TBSV-Viruspartikel Assemblierung	100
4.3 Aktivität der heterolog exprimierten TBSV RNA-abhängigen RNA Polymerase.....	104
5. Zusammenfassung	107
6. Literaturverzeichnis	108
7. Anhang	116

Abkürzungsverzeichnis

Englische und lateinische Begriffe sind im Folgenden kursiv geschrieben. Namen der Viren sind kursiv geschrieben, wenn damit eine taxonomische Einheit gemeint ist (van Regenmortel & Mahy, 2004) und wenn der englische Name verwendet wird. Trivialnamen der Viren werden dagegen nicht kursiv geschrieben.

A	Adenin, bzw. Adenosin
Abb.	Abbildung
ad	bis zu, bis auf
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AtL	<i>Arabidopsis thaliana</i> Lysat
as	<i>antisense</i> . dem Minus-Strang entsprechend
ATP	Adenosin 5'triphosphat
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BY-2	<i>Nicotiana tabacum bright yellow-2</i>
BYL	Tabak BY2 –Lysat
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin bzw. Cytidin
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA, copy DNA</i>
Ci	Curie
CNV	<i>Cucumber necrosis virus</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CTP	Cytidin 5'triphosphat
2,4 D	2,4 Dichlorphenoxyessigsäure
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DI	<i>defective interfering</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	<i>days post inoculation</i> , Tage nach der Inokulation
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiations-Faktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae</i> , und andere
FF	<i>firefly</i> , Glühwürmchen
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Fallbeschleunigung (bzw. Gramm)
G	Guanin bzw. Guanosin
GDA	Glycin-Asparaginsäure-Alanin
GDD	Glycin-Asparaginsäure-Asparaginsäure
GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid / Guanidiniumchlorid
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (Grün-floureszierendes Protein)
Gln	Glutamin
gPR	<i>genomic promoter</i> , TBSV-Promotor für die Minusstrang-Synthese

gTBSV	Gesamtgenom des TBSV/ Genom des TBSV in voller Länge
GTP	Guanosin 5'triphosphat
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i> (Metallaffinitätschromatographie)
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
kDa	Kilo Dalton
LeL	<i>Lycopersicon esculentum</i> Lysat
Luc	Luciferase
min	Minute
MN	Mikrokokkus Nuklease
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA, hier: Protein-codierende RNA
mu	Mutante
NaOAc	Natrium-Acetat
nt	Nukleotide
NTP	Ribonucleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , Offenes Leseraster
pI	isoelektrischer Punkt
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> PCR, quantitative Echtzeit-PCR
RdRP	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RLU/s	Relative Light Units pro Sekunde
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase / reverse Transkription
RSE	<i>replication silencer element</i>
s.	siehe
s.a.	siehe auch
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
se	<i>sense</i> , dem Plus-Strang entsprechend
sec	Sekunde
sgRNA	subgenomische RNA
s.o.	siehe oben
ssRNA	einzelsträngige RNA
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffer saline</i> , Tris-gepufferte Saline
TBST	<i>Tris buffer saline</i> mit Tween/ Triton

TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TCEP	Tris(2-Carboxyethyl)phosphin
TCV	<i>Turnip crinkle virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Tyr	Tyrosin
U	<i>unit</i> (Einheit) bzw. Uracil bzw. Uridin
UTP	Uridin 5'triphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
VPg	<i>virus protein genome-linked</i>
v/v	Volumen je Volumen
WT	Wildtyp
w/v	<i>weights per volume</i> (Gewicht je Volumen)
×	-fach, Mal
z.T.	zum Teil

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**Abbildungen:**

Abb. 1-1.: Übersicht über den Infektionszyklus eines Plusstrang-RNA-Virus	3
Abb. 1-2: Schematische Abbildung des TBSV-Genoms und einer typischen <i>defective interfering</i> RNA (DI-RNA).....	9
Abb. 1-3: Domänen des TBSV-Hüll-Proteins p41 und Struktur eines TBSV-Viruspartikels	12
Abb. 3-1: Translation Virus-codierter- und nicht-viraler Proteine im BYL	55
Abb. 3-2: Einfluss der Kotranslation des Hüll-Proteins auf die Translation des p33 und p92 von gTBSV-RNA	56
Abb. 3-3: Quantifizierung der im BYL gebildeten Proteinmenge	57
Abb. 3-4: Autoradiogramm einer Translations-/Replikationsreaktion in BYL mit TCV-RNA	57
Abb. 3-5: Charakterisierung der DI-RNA Replikationsprodukte	60
Abb. 3-6: relative Menge an Replikationsprodukt in Abhängigkeit von der Zeit.....	61
Abb. 3-7: Erhöhung der Replikationsprodukt-Menge durch EDTA.....	62
Abb. 3-8: Überprüfung der <i>template</i> -Spezifität der Translations-/Replikationsreaktionen im BYL mit der p33RE-Mutante (DImuA) und der DI(-)-RNA	63
Abb. 3-9: Translations-/Replikationsreaktion mit TBSV-DI-RNA mit deletierter Region I.....	64
Abb. 3-10: Replikationsversuch der DI(-)-RNA mit der DIARI-RNA als potentielle Replikase-assembly-Plattform	64
Abb. 3-11: Übersicht über die Mutanten des RSE und gPR.....	65
Abb. 3-12: Translations-/Replikationsreaktion mit Mutanten des RSE und gPR.....	66
Abb. 3-13: Charakterisierung der Replikationsprodukte der RSE-bzw-gPR-Mutanten	67
Abb. 3-14: relative Menge an (-)-Strang-Bildung bei der Replikation der DI-Mutanten	64
Abb. 3-15: Stabilität der DI-Mutanten im BYL.....	68
Abb. 3-16: Inhibition der Translation im BYL durch Puromycin.....	69
Abb. 3-17: Replikation der TBSV-DI-RNA in Anwesenheit von Puromycin.....	70
Abb. 3-18: Translations-/Replikationsreaktion mit der TBSV-DI-RNA und gTBSV-RNA	71
Abb. 3-19: Translations-/Replikationsreaktion mit gTBSV-RNA und kotranslatierter Hsc70-mRNA	72
Abb. 3-20: Test auf Bildung subgenomischer TBSV-RNA im BYL mittels Northern Blot	73
Abb. 3-21: Symptomausprägung in infizierten <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen und elektronenmikroskopische Aufnahmen gereinigter Viruspartikel	75
Abb. 3-22: Elektronenmikroskopische Analyse von Translations-Reaktionen zur Viruspartikel-Detektion mittels Immunogold-Markierung.....	76
Abb. 3-23: RT-PCR mit Nuklease-behandelten Viruspartikeln und TBSV-Transkripten.....	77
Abb. 3-24: Autoradiogramm und RT-PCR zur Prüfung der Nuklease-Resistenz viraler RNA in Translationsreaktionen.....	78
Abb. 3-25: <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen zehn Tage nach der Inokulierung mit verdünnten Viruspartikeln-Suspensionen.....	79
Abb. 3-26: Übersicht über die infektiösen Mengen an Viruspartikeln und Transkript-RNA.....	80

Abb. 3-27: RT-PCR–Nachweis von TBSV-RNA in infizierten Pflanzen (A) und Replikationskontrolle (B)	82
Abb. 3-28: <i>N. benthamiana</i> - Pflanzen inokuliert mit verdünnten und unverdünnten Translations- /Replikationsansätzen	83
Abb.: 3-29: Reinigung des SUMO_p92 und Spaltung des Fusionsproteins	84
Abb.: 3-30: Reinigung des p92 und Dialyse gegen alternative Puffer	85
Abb.: 3-31: Reinigung des p33 und Dialyse gegen TR-Puffer	86
Abb. 3-32: Aktivität des rekombinanten p92 im <i>in vitro</i> -Polymerase-assay	87

Tabellen:

Tab. 1-1: Die Klassifizierung der Plusstrang-RNA-Viren und ihr vielfältiges Wirtsspektrum	1
Tab. 2-1: Übersicht über die verwendeten <i>E. coli</i> -Stämme	19
Tab. 2-2: Übersicht über das verwendete Pflanzenmaterial	19
Tab. 2-3: Übersicht über die verwendeten Plasmide	19
Tab. 2-4: Übersicht über die eingesetzten Oligonukleotide	21
Tab. 2-5: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes	29
Tab. 2-6: Übersicht über den Programmablauf einer PCR-Reaktion	29
Tab. 3-1: Optimierungen und Modifikationen des Protokolls für die Präparation des BYL	52
Tab. 3-2: Relative Translationsaktivität der Lysate aus <i>N. tabacum</i> BY-2- und <i>A. thaliana</i> -Zellkultur	53
Tab. 3-3: Relative Translationsaktivität der Lysate aus <i>N. tabacum</i> BY-2- und <i>Lycopersicon esculentum</i> - Zellkultur	54
Tab. 3-4: Translationsansätze für den elektronenmikroskopischen Nachweis von Viruspartikeln im BYL	75
Tab. 3-5: Translationsansätze zur Überprüfung der Mikrokokkus-Nuklease-Resistenz von TBSV- RNA bei Kotranslation mit p41-mRNA	77
Tab. 3-6: Translations-/Replikationsansätze für die Überprüfung der Mikrokokkus-Nuklease-Resistenz von TBSV- RNA bei Kotranslation der p41-mRNA	81
Tab. 4-1: Übersicht über die Experimente zur Viruspartikel-Assemblierung im BYL	102

1. Einleitung

1.1 Plusstrang-RNA-Viren – ein Überblick

Viren sind makromolekulare Strukturen, die zu ihrer Vermehrung auf Wirts-Zellen angewiesen sind. Zu Wirts-Organismen gehören neben Tieren und Pflanzen auch Bakterien und Pilze. So ungleich wie die Wirts-Organismen sind, so verschieden sind auch die Viren selbst. Um der Vielfalt der Viren beizukommen, wird versucht, eine systematische Einteilung zu schaffen. Die taxonomische Einordnung der Viren erfolgt zum einen nach dem Typ des Genoms. Man unterscheidet DNA- und RNA-Viren. Innerhalb dieser Gruppen kann zwischen einzelsträngigen und doppelsträngigen Genomen unterschieden werden. Viren, deren Genom aus einzelsträngiger RNA besteht, können darüber hinaus nach der Orientierung ihrer RNA klassifiziert werden: Plusstrang-Orientierung bzw. Minusstrang-Orientierung. Weitere Kriterien der Einteilung sind die Anzahl der RNA-Segmente, die Symmetrieart des Capsids, welches das Genom umhüllt, und das Vorhandensein einer Membranhülle. (Fauquet *et al.*, 2005)

Von den pflanzenpathogenen Viren werden die meisten zu den Plusstrang-RNA-Viren gruppiert. Die Klassifizierung dieser Gruppe und das Wirtsspektrum zeigt Tabelle 1-1 in grober Übersicht. Bisher konnte die überwiegende Zahl der Plusstrang-RNA-Viren keiner Ordnung zugeteilt werden. Die detailliertere Einteilung, wie sie vom Internationalen Komitee für Virus-Taxonomie (ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*) vorgenommen wurde, findet sich im Anhang.

Tab. 1-1: Die Klassifizierung der Plusstrang-RNA-Viren und ihr vielfältiges Wirtsspektrum

Ordnung	Anzahl der Familien	Wirt
<i>Nidovirales</i>	3	Vertebraten, Invertebraten
<i>Picornavirales</i>	5	Pflanzen, Vertebraten, Invertebraten
<i>Tymovirales</i>	4	Pflanzen, eukaryotische Mikroorganismen
n.k.	16	Pflanzen, Vertebraten, Invertebraten, eukaryotische Mikroorganismen, Bakterien

n.k. = nicht klassifiziert

Das Genom der Plusstrang-RNA-Viren besteht aus ein bis drei einzelsträngigen RNA-Molekülen mit Plusstrang-Polarität. Dies bedeutet, dass die genomische RNA-Sequenz der Protein-codierenden Sequenz entspricht, sie also direkt als mRNA fungiert. Die codierende Sequenz ist am 5'-Ende und am 3'-Ende von Untranslatierten Regionen (UTR) eingefasst.

Die UTRs können mit z.B. *stem loop*- (Haarnadel-) bzw. *pseudoknot*-Strukturen komplexe Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen ausbilden und regulatorische Funktionen ausüben. Im Zuge ihres Vermehrungszyklus (Replikationszyklus bzw. Infektionszyklus) erzeugen viele Plusstrang-RNA-Viren subgenomische RNAs (sgRNAs), die als mRNAs agieren und entsprechend für Proteine codieren. (Ball, 2007)

Ein wichtiges Protein, das von Plusstrang-RNA-Viren gebildet wird, ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP). Die bisher aufgeklärten Strukturen der RdRPs ähneln, wie bei allen Polymerasen, der Form einer rechten Hand, mit *palm*-, *finger*- und *thumb*-Domäne. Diese Domänen enthalten jeweils konservierte Motive, die an der RNA-Synthese, ausgehend von einer RNA-Matrize, beteiligt sind. (van Dijk *et al.*, 2004)

Die genomische RNA ist in Teilen des Infektionszyklus mit dem viral kodierten Hüll-Protein (*coat*-Protein) assoziiert, das einen Spezies-typischen Viruspartikel mit der viralen RNA bildet. Weitere Proteine, die von Plusstrang-RNA-Viren gebildet werden können, sind RNA-*silencing* Suppressoren und Proteine mit Methyltransferase- und Helikase-Funktion. Pflanzen-Viren können zudem ein *movement*-Protein codieren, das eine Verbreitung des Virus von Zelle zu Zelle erleichtert. (Hull, 2009)

Obwohl das Wirtsspektrum der (+)-Strang-RNA-Viren so breit ist, bedingt die ähnliche Genomstruktur Gemeinsamkeiten im Replikationszyklus. Im Folgenden wird der Infektionszyklus pflanzenpathogener Plusstrang-RNA-Viren und das Zusammenspiel mit der Wirtszelle näher beschrieben.

1.2 Der Infektionszyklus von Plusstrang-RNA-Viren in der Pflanze

Der Infektionszyklus von Plusstrang-RNA-Viren kann in sechs Schritte unterteilt werden: Eintritt in die Zelle, Entlassung der viralen RNA aus der Virushülle, Synthese viraler Proteine (Translation), Replikation zur Amplifikation der viralen RNA und schließlich Assemblierung neuer Viruspartikel und deren Freisetzung aus der infizierten Zelle (Hull, 2009). Abbildung 1-1 zeigt ein vereinfachtes Schema des Infektionszyklus eines Plusstrang-RNA-Virus in einer pflanzlichen Wirtszelle.

Aufgrund der geringen Genomgröße von Viren ist die Kapazität, Proteine zu codieren, begrenzt. Zwar wurden verschiedene Strategien evolviert, um diese Restriktion zu minimieren, dennoch sind Viren auf Faktoren (z.B. Proteine und Membranen) des Wirtes angewiesen.

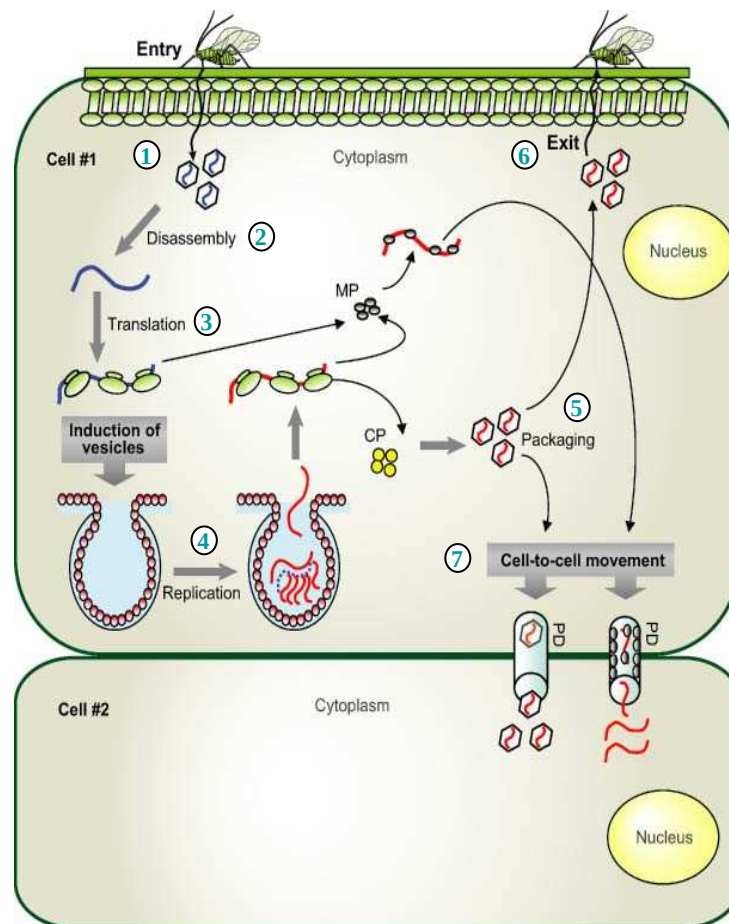


Abb. 1-1: Übersicht über den Infektionszyklus eines Plusstrang-RNA-Virus

Pflanzenviren gelangen über Insekten (1) oder durch Verwundung in die Zelle. Die virale RNA wird aus dem Viruspartikel freigesetzt (2). Das virale Genom dient als Matrize sowohl für die Translation (3) als auch die Replikation (4). Der Ort der Replikation sind zelluläre Membranen, die Virus-induzierte Vesikel bilden. Das aus der Translation hervorgegangene Hüll-Protein (CP) verpackt die neu synthetisierte RNA in Viruspartikel (5). Die Viruspartikel treten über Insekten oder Verletzungen aus der Zelle aus (6). Die virale RNA kann zudem mit Hilfe des Virus-codierten *movement*-Proteins (MP) über Plasmodesmata (PD) in Nachbarzellen gelangen (7).

(adaptiert nach Rao, 2006)

1.2.1 Eintritt des Virus in die Zelle und *uncoating*

Der Infektionszyklus eines Virus beginnt mit dem Eintritt in die Zelle. Im Gegensatz zu animalen Viren ist den pflanzlichen Viren der Zugang zu der Zelle aufgrund der Zellwand erschwert. Sie werden daher über Insekten, die als „Vektoren“ bezeichnet werden, in das Zytoplasma „injiziert“ oder sie gelangen über eine Verwundungsstelle in die Zelle. Daneben gibt es Pflanzen-Viren, die über Pollen oder Samen verbreitet werden.

Dem Eintritt in die Wirtszelle folgt das *uncoating*: Die virale RNA wird aus dem Viruspartikel freigesetzt und wird somit für die folgenden Prozesse wie Translation und

Replikation zugänglich. Das *uncoating* ist ein wenig verstandener und untersuchter Prozess. Für *Tobacco mosaic virus* (TMV) wird eine bidirektionale Disassemblierung vorgeschlagen, die kotranslational und vermutlich parallel zur Replikation abläuft (Wilson, 1984; Wu & Shaw, 1996). Auch eine pH-Wert-abhängige Konformationsänderung der Viruspartikel-Komponenten, wie es für *Alfalfa mosaic virus* (AMV) *in vitro* gezeigt wurde (Verhagen & Bol, 1972), könnte *in vivo* eine Möglichkeit sein, die RNA aus dem Viruspartikel zu entlassen.

1.2.2 Translation viraler Proteine

Von der viralen RNA werden im Zytoplasma Proteine translatiert. Die RNA-Matrize wird dabei in 5'-3'-Richtung abgelesen. Wie auch bei zellulären mRNAs sind Beginn und Ende eines *open reading frame* (ORF) durch ein Translations-Start- und Stop-Codon gekennzeichnet. Verschiedene Mechanismen gestatten den Viren jedoch, auch dem Stop-Codon nachfolgende ORFs zu translatieren oder aus einem ORF mehrere Proteine zu synthetisieren und zudem die Menge an Translationsprodukt zu regulieren. *Plum pox virus* (PPV) bildet beispielsweise ein Polyprotein, das durch viral codierte Proteasen prozessiert wird, sodass aus einem ORF mindestens zehn Proteine entstehen. PPV nutzt außerdem das *leaky scanning*, bei dem ein Start-Codon aufgrund seines spezifischen RNA-Kontextes überlesen werden kann (Salvador *et al.*, 2006). Darüber hinaus sind das Überlesen von Stop-Codons sowie die Translation mittels *ribosomal frameshift*, z.B. *-1 ribosomal frameshift*, bekannt. Letzteres wird beispielsweise von Vertretern der Familie *Luteoviridae* und der Gattung *Sobemovirus* genutzt. Dafür sind eine sogenannte Heptanukleotid-Shifty-Sequenz und eine nachfolgende *pseudoknot*-Struktur bzw. Sekundärstruktur der RNA nötig. Beide führen dazu, dass das Ribosom während der Translation anhält. Die tRNAs der A- und P-Stelle des Ribosoms binden, ermöglicht durch die *wobble*-Position eines Codons, je ein Nukleotid versetzt stromaufwärts in 5'-Richtung. Die Folge ist, dass die Translation in einem neuen Leseraster fortgesetzt wird. Die *ribosomal frameshift*-Rate beläuft sich, z.B. für *Cocksfoot mottle virus*, auf 10% in Weizenkeim-Extrakt. Es entsteht folglich ein Gemisch aus zwei Proteinen, eines aus dem ursprünglichen ORF und eines aus dem versetzten ORF, der für die putative RdRP codiert. (Miller & Giedrock, 2010; Lucchesi *et al.*, 2000).

Wie bereits erwähnt, werden von etlichen Plusstrang-RNA-Viren der Pflanzen während der Replikation subgenomische RNAs gebildet. Sie verhelfen einem ORF, der auf der

polycistronischen, genomischen RNA hinter einem Stop-Codon liegt, zu einer eigenen mRNA (s.a. Abschnitt 1.3).

Viren haben zudem Strategien entwickelt, um die zelluläre Translationsmaschinerie effizient zu nutzen und die Translation der viralen RNA gegenüber der Translation der zellulären mRNAs zu behaupten. Im Gegensatz zu zellulären mRNAs haben viele pflanzliche Plusstrang-RNA-Viren kein 5'm⁷GpppN *cap*, über das die Translations-Initiationsfaktoren der Wirtszelle rekrutiert werden und die notwendige Zirkularisierung der mRNA mit dem 3'-poly-A ermöglicht wird. Die Bindung der ribosomalen 40S-Untereinheit kann stattdessen über eine komplexe Sekundärstruktur, die interne Ribosomen-Bindestelle (*internal ribosomal entry site*, IRES), erfolgen, mit der das Ribosom in unmittelbarer Nähe zum Start-Codon positioniert wird. Für *Tobacco etch virus* konnte eine IRES-Aktivität der 5'UTR belegt werden. Die Aktivität ist dabei bestimmt durch den zellulären Translations-Initiationsfaktor eIF4G (Gallie, 2001; Ray *et al.*, 2006).

Eine ebenfalls in der 5'UTR lokalisierte Sekundärstruktur mit translationsverstärkender Wirkung ist die *pseudoknot*-Struktur des *Tobacco mosaic virus*. Diese sogenannte 5'*leader*-Region wird von dem zellulären Hitzeschockprotein HSP101 gebunden. In Abhängigkeit von den eukaryotischen Translations-Initiationsfaktoren eIF4G und eIF3 stimuliert HSP101 die virale Translation (Wells *et al.*, 1998).

Nicht nur in der 5'UTR sind RNA-Elemente zu finden, die die Translationsrate erhöhen. *Satellite tobacco necrosis virus* beispielsweise beherbergt in der 3'UTR eine *Translation Enhancer Domain* (TED). Diese bindet *in vitro* den zellulären Translations-Initiationsfaktor eIF4F und, wenn auch mit geringerer Affinität, dessen Untereinheiten eIF4E und eIF4G sowie die jeweiligen Iso-Formen (Gazo *et al.*, 2004). Das Luteovirus *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) rekrutiert die Translationsmaschinerie ebenfalls über ein in der 3'UTR gelegenes Element, das *BYDV-like cap-independent translation element* (BTE). Basenpaarungen zwischen 5'- und 3'-Ende der RNA ermöglichen den Translationsstart am 5'-Ende (Miller *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2001).

Brome mosaic virus, ein Vertreter der Familie *Bromoviridae* mit dreiteiligem Genom mit *cap* und ohne Poly-A-Ende, enthält eine tRNA-ähnliche Struktur (TLS) in der 3'UTR. Diese bindet den zellulären Lsm1-7/Pat1-Proteinkomplex und vermittelt so eine Stimulation der Translation der viralen RNA (Noueiry *et al.*, 2003; Galañ *et al.*, 2010).

Bei Vertretern der Familie *Potyviridae* ist ein viral kodiertes Protein, das *viral protein genome-linked* (VPg), kovalent an das 5'-Ende der RNA gebunden. Für das VPg des Potyvirus *Turnip mosaic virus* konnte eine Bindung des Translations-Initiationsfaktors eIF4E gezeigt werden (Wittmann *et al.*, 1997; Leonard *et al.*, 2000). Für ein anderes

Potyvirus, *Potato virus A*, konnte schließlich eine stimulierende Wirkung des VPg mit eIF4E auf die virale Translation belegt werden (Eskelin *et al.*, 2011).

1.2.3 Replikation

Das RNA-Molekül, das als Matrize für die Translation dient, ist in einem späteren Stadium des Infektionsszyklus *template* für die Replikation. Die Synthese neuer Plusstrang-RNA-Moleküle erfolgt in 5' – 3'-Richtung. Beides bedingt, dass zunächst ein komplementärer RNA-Strang, die Minusstrang-RNA, als Intermediat gebildet wird. Dieses Minusstrang-Intermediat dient als Matrize für die Plusstrang-Synthese. Der Replikationsprozess ist asymmetrisch. Das bedeutet, dass, mit Beteiligung von Wirtsfaktoren (siehe auch Abschnitt 1.3), ein Überschuss an Plusstrang gebildet wird.

Während der Minusstrang-Synthese können verkürzte Minusstrang-Intermediate entstehen. Die bereits erwähnten subgenomischen RNAs werden von solchen verkürzten Minusstrang-Intermediaten transkribiert. Sie werden nicht repliziert, d.h. sie selbst stellen keine Matrize für eine Minusstrang-Synthese dar (Miller & Koev, 2000).

Die neuen RNA-Moleküle werden durch den Replikase-Komplex synthetisiert. Dieser besteht u.a. aus der von viraler RNA translatierten RdRP und Faktoren der Wirtszelle. Die RdRP wird gezielt von der viralen RNA rekrutiert, sodass der Replikase-Komplex spezifisch die virale RNA amplifiziert. Jeweils am 3'-Ende der Plus- bzw. Minusstrang-RNA liegen die Promotorsequenzen, von denen die RNA-Synthese ausgeht. Für *Brome mosaic virus* (BMV) wurden solche Promotorregionen in den 3'UTRs der (+) und (-)-Strang-RNA als Bindestellen für die Komponenten des Replikase-Komplexes bestimmt (Choi *et al.*, 2004). Darüber hinaus können weitere Elemente, in *cis* agierend, die Replikation beeinflussen. Beispielsweise begünstigt eine *stem-loop*-Struktur (H4 genannt) der *Turnip crinkle virus*-RNA die Bindung der RdRP. H4 liegt in der 3'UTR des Plusstranges, ist aber auch im (-)-Strang aktiv (Sun & Simon, 2006). Für *Satellite tobacco necrosis virus* konnten *stem-loop*-Strukturen in der 3'UTR bzw. 5'UTR gefunden werden, die die Akkumulation der viralen RNA positiv beeinflussen (Bringloe *et al.*, 1999). Ebenso können RNA-RNA-Interaktionen wichtig sein, die auf einer komplementären Basenpaarung zwischen Sequenzen in der 3'UTR und mehr als 800 nt in 5'-Richtung gelegenen Sequenzen basieren, wie für *Potato virus X* beschrieben (Hu *et al.*, 2007).

Neben Abschnitten der viralen RNA spielen Wirtsfaktoren eine wichtige Rolle für die Replikation. Jedes Virus nutzt ein unterschiedliches Set an spezifischen Wirtsfaktoren, bedient sich aber auch Faktoren, die in Eukaryoten konserviert sind. So sind beispielsweise

zelluläre Chaperone involviert. Wirtsfaktoren sind zudem an der Assemblierung der Replikase-Komplexe und deren Insertion in Membranen beteiligt. Auch an Modifikationen zellulärer Membranen im Zuge einer Virusinfektion wirken zelluläre Proteine mit. (Nagy & Pogany, 2012 und siehe unten)

Einigen an der zellulären Translation beteiligten Faktoren kommt eine Bedeutung für die Virus-Replikation zu. Untereinheiten des Translations-Initiationsfaktors eIF3 binden die RdRP und stimulieren die (-)-Strang-Synthese von *Brome mosaic virus* bzw. *Tobacco mosaic virus* (Quadt et al., 1993; Osman & Buck, 1997). Der eukaryotische Translations-Elongationsfaktor eEF1A kann ebenfalls regulierend in die Replikation bestimmter Viren eingreifen. Dieses Protein interagiert als Komplex mit GTP mit der aminoacylierten tRNA-ähnlichen Struktur (TLS) am 3'-Ende des *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV). Die Translation der TYMV-RNA wird dadurch verstärkt, die Minusstrang-Synthese dagegen *in vitro* inhibiert. Deshalb wird für eEF1A eine Rolle beim Wechsel von der Translation zur Replikation vermutet. (Matsuda et al., 2004; Matsuda & Dreher, 2004)

Für die Vervielfältigung der viralen RNA sind zelluläre Membranen als Ort der Replikation unabdingbar. Für die entsprechende Lokalisierung des Replikase-Komplexes sind wiederum Proteine des Wirtes nötig. Die in der Vakuolenmembran lokalisierten *Arabidopsis thaliana* – Proteine TOM1 und TOM3 führen bei Mutation zu einem Totalverlust der Replikationsfähigkeit des Tobamovirus *Tobacco mosaic virus* (TMV). Zumindest für TOM1 ist die Bindung eines viralen Replikase-Komplex-Proteins des TMV gezeigt. (Yamanaka et al., 2002, Nishikiori et al., 2006)

Entscheidend für eine erfolgreiche Replikation sind neben Proteinen des Virus sowie des Wirtes und Sequenzen bzw. Strukturen der viralen RNA auch die Membranstrukturen selbst. Für die Replikationsfähigkeit des *Brome mosaic virus* sind die zellulären Proteine Delta9-Fettsäure-Desaturase und *Reticulon Homology*-Protein wichtig, da die von ihnen bewirkten Modifikationen der ER-Membran die Bildung des schützenden Replikationskompartimentes ermöglichen (Lee & Ahlquist, 2003; Diaz et al., 2010). In diesen, vom Zytoplasma nahezu abgeschlossenen Räumen, amplifiziert der Replikase-Komplex die virale RNA. Die neu gebildeten RNA-Moleküle werden aus den Replikationskompartimenten in das Zytoplasma entlassen und können als Matrize für die Translation (v.a. sgRNAs) oder Replikation zur Verfügung stehen oder in Viruspartikel verpackt werden.

1.2.4 Verpackung der RNA in Viruspartikel und Verbreitung

Die Assemblierung der Viruspartikel (Virion) erfolgt im Zytoplasma. Ein Virion setzt sich aus der viralen RNA und einer definierten Anzahl an Hüll-Protein-Untereinheiten zusammen. Je nach Genomstruktur des Virus werden die unterschiedlichen Genomsegmente einzeln in getrennte Viruspartikel verpackt, die dann auch eine unterschiedliche Größe haben können, oder, es tritt nur eine Art von Partikeln auf, die ein oder mehrere verschiedene Segment(e) des Genoms enthalten können (Rao, 2006). Sowohl auf der Seite des Hüll-Proteins als auch auf der Seite der zu verpackenden RNA gibt es Signale, die eine spezifische Verpackung der viralen RNA aus dem in der infizierten Zelle vorhandenen Pool an RNAs gewährleisten. In Abhängigkeit von der Art der Wechselwirkung, auf der die Stabilität der Viruspartikel beruht (Protein-Protein- oder Protein-RNA-Wechselwirkung), kann die virale RNA als Ausgangspunkt für die Assemblierung dienen. Für die Bindung des Hüll-Proteins können spezifische RNA-Sequenzen oder -Strukturen nötig sein. Für TCV konnte eine solche Region bereits bestimmt werden: eine *hairpin-loop*-Struktur, die in der für das Hüll-Protein codierenden Sequenz liegt (Qu & Morris, 1997).

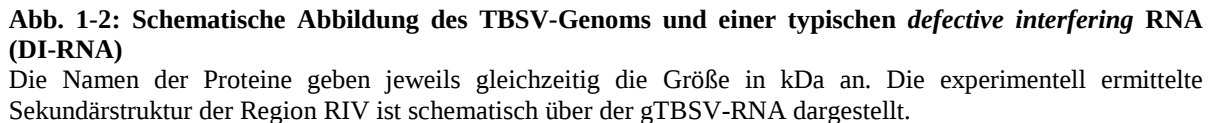
Für BMV liegen Hinweise darauf vor, dass neben dem Hüll-Protein weitere Proteine an der Assemblierung beteiligt sein könnten. Bei BMV wird die Spezifität der Verpackung durch die Replikase erhöht, die zeitweise mit dem Hüll-Protein im Komplex vorliegt (Annamalai & Rao, 2005).

Die Übertragung des Virus auf andere Pflanzen erfolgt durch Vektoren wie Insekten, Pilze oder Wasser. Zur Verbreitung innerhalb der Pflanze sind vollständig ausgebildete Viruspartikel nicht obligat. So kann die virale RNA mit Hilfe des *movement*-Proteins als Nucleoprotein-Komplex über Plasmodesmata in benachbarte Zellen gelangen und schließlich über die Leitgewebe in nachwachsende Gewebe (Lucas, 2006). Dies resultiert in einer systemischen Infektion der Wirtspflanze.

1.3 Das Modellvirus *Tomato bushy stunt virus*

Tomato bushy stunt virus (TBSV) ist der namensgebende Vertreter der Gattung *Tombusvirus* aus der Familie der *Tombusviridae*. Die natürlichen Wirte dieses Virus gehören beispielsweise zur Familie der *Solanaceae*, wie *Lycopersicon esculentum* (*Solanum lycopersicum*, Tomate), *Capsicum annuum* (Paprika) und *Solanum melongena* (Aubergine). Als susceptible Wirtspflanzen, d.h. nicht-resistente Pflanzen, sind auch *Nicotiana*-Arten (Tabak) experimentell nutzbar. Infizierte Pflanzen zeigen ein reduziertes Wachstum,

Als nicht-natürlicher Wirt kann auch Hefe genutzt werden. TBSV repliziert in Hefe-Zellen, die mit TBSV-RNA transformiert wurden (Panavas & Nagy, 2003).



9

2003; Rajendran & Nagy, 2003). Das p92 enthält mit dem GDD-Motiv das für RNA-abhängige RNA-Polymerasen typische katalytische Zentrum mit den Aminosäuren Glycin und zwei Asparaginsäuren (Koonin, 1991).

Während des Replikationszyklus entstehen zwei subgenomische RNAs. Sie werden durch vorzeitigen Abbruch der Minusstrang-Synthese vom Gesamt-Genom gebildet. Diese verkürzten Minusstrang-Moleküle dienen als Matrize für die Plusstrang-Synthese der sgRNAs. Die Transkription der sgRNAs benötigt RNA-RNA-Interaktionen zwischen Sequenzen in Transkriptionsstart-Nähe und Sequenzen, die mehr als 1000 nt entfernt in 5'-Richtung liegen (Lin & White, 2004; Choi & White, 2002). Die Proteine p19, p22 und p41 werden von diesen subgenomischen RNAs translatiert. p19 fungiert als *silencing suppressor*. Für p22 konnte eine Funktion als *movement protein* gezeigt werden. Das Protein gewährleistet die Verbreitung des Virus von Zelle zu Zelle und die systemische Ausbreitung in der Pflanze. p41 ist das Hüll-Protein des TBSV (Yamamura & Scholthof, 2005).

Für TBSV sind neben der genomischen RNA und sgRNAs auch sogenannte *defective interfering* RNAs (DI-RNAs) bekannt. Dies sind aus verschiedenen Regionen des Gesamtgenoms zusammengesetzte RNAs. Sie enthalten keinen vollständigen ORF und sind deshalb für eine Replikation auf die gesamtgenomische RNA angewiesen, welche die Replikase-Komplex-Komponenten liefert. Treten DI-RNAs im Zuge einer TBSV-Infektion auf, können sie die Schwere der Symptome vermindern (Hillmann *et al.*, 1987). Für TBSV-DI-RNAs wird angenommen, dass sie durch einen Replikase-abhängigen *template-switch*-Mechanismus entstehen, bei dem es zur Rekombination zwischen RNA-Molekülen kommt (Pathak & Nagy, 2009 und White & Morris, 1994).

Die in Abbildung 1-2 gezeigte DI-RNA enthält Sequenzen der genomischen RNA, die als Regionen I, II, III und IV bezeichnet werden. Sie enthält damit alle *cis*-agierenden Elemente, die für die Replikation nötig sind. Demnach kann die DI-RNA repliziert werden, sofern der Replikase-Komplex zur Verfügung steht. DI-RNAs sind folglich sehr gut geeignet, um replikationsaktive Elemente des Virus zu untersuchen.

Ist TBSV-RNA in die Zelle gelangt, beginnt zunächst die Translation. Dabei spielen Sekundärstrukturen der RNA eine wichtige Rolle. Die 3'UTR bildet im Plusstrang Sekundärstrukturen aus, die als *cap independent translational enhancer* (3'CITE) wirken. Die translationsverstärkende Wirkung konnte mit Reporter-Konstrukten *in vivo* gezeigt werden (Wu & White, 1999). Die 3'CITE interagiert mit einer *stem-loop*-Struktur der *T-shaped domain* (TSD), die Teil der 5'UTR ist. Damit verhilft die 3'CITE zu einer 5'-3'-Interaktion und Zirkularisierung der viralen RNA, die elementar für die Translation ist (Fabian & White, 2004). Auf diese Weise werden wahrscheinlich die Komponenten des

zellulären eIF4F-Komplexes, die an die 3'CITE des TBSV binden, an die 5'UTR gebracht (Nicholson *et al.*, 2013).

Sind die viralen Komponenten des Replikase-Komplexes p33 und p92 translatiert, wird die Replikation initiiert. Dazu bedarf es eines spezifischen RNA-Elementes in der für p92 codierenden Region, um die virale RNA für die Assemblierung des Replikase-Komplexes zu rekrutieren. Dieses, in der Region II lokalisierte, sogenannte p33RE, enthält in einer *stem-loop*-Struktur ein C·C-*mismatch*. p33 bindet daran als Dimer oder Oligomer und interagiert zudem mit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, p92 (Pogany *et al.*, 2005). Eine wichtige Rolle bei der Initiation der Replikation spielt zudem der Wirtsfaktor Hsp70 (Hitzeschockprotein). Das zelluläre Chaperon sorgt dafür, dass die Proteine des Replikase-Komplexes an der Peroxisomen-Membran, dem Ort der Replikation, lokalisiert werden und in die Peroxisomen-Membran integrieren. Das konstitutiv exprimierte Hsp70, Hsc70 (*heat shock cognate*), ist außerdem selbst Teil des Replikase-Komplexes (Wang *et al.*, 2009).

Für die Primer-unabhängige Synthese des Minusstrang-Intermediates ist die 19 nt lange Promotorregion gPR am 3'-Ende des Plusstrang-*templates* bedeutend (Panavas *et al.*, 2002a). Dieser Promotor ist Teil einer Reihe von *stem-loop*-Strukturen der Region RIV, die bestimmend für die Assemblierung des Replikase-Komplexes sind (Panaviene *et al.*, 2005). Arbeiten von Pogany *et al.* (2003) zeigten darüber hinaus, dass die fünf terminalen Nukleotide des Plusstranges mit der *loop*-Region einer Sekundärstruktur des RIV interagieren (RSE, *replication silencer element*). Es wird eine RNA-*pseudoknot*-Struktur gebildet. Als Folge davon wird eine verminderte Zugänglichkeit des 3'-Terminus für den Replikase-Komplex vermutet und dies als Erklärung für die verringerte Minusstrang-Bildung herangezogen.

Am 3'-Terminus der Minusstrang-RNA liegt der 11 nt lange Promotor cPR, von dem aus die Plusstrang-Synthese Primer-unabhängig, *de novo*, erfolgt. (Panavas *et al.*, 2002a).

Die Replikation ist von RNA-Strukturen und RNA-RNA-Interaktionen reguliert. Im Minusstrang befindet sich ein *replication enhancer*-Element in der Region III, das die RNA-Synthese positiv beeinflusst (Ray & White, 2003). In der 5'UTR bildet sich zwischen Sequenzen innerhalb der Region I eine *pseudoknot*-Struktur (PK-TD1) aus, die die Replikation stimuliert (Ray, Wu & White, 2003).

Darüber hinaus sind einige Wirtsfaktoren bekannt, die z.T. als Komponenten des Replikase-Komplexes einen Einfluss auf die RNA-Synthese ausüben. So ist beispielsweise Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) an der asymmetrischen Plusstrang-RNA-Synthese beteiligt. PEX19 konnte als zellulärer Transporter für die Lokalisation des p33 zur peroxisomalen Membran identifiziert werden. Desweiteren sind u.a. eine Helikase (Ded1),

Pyruvat-Decarboxylase und ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym beteiligt. (Nagy & Pogany, 2012). Dies ist nur ein kleiner Teil der Wirtsfaktoren: Versuche in Hefe führten zur Identifizierung von über 100 Genen, die auf die TBSV-Vermehrung wirken (Jiang *et al.*, 2006; Panavas *et al.*, 2005b).

Ein TBSV-Viruspartikel ist Ikosaeder-förmig. 180 einzelne p41-Untereinheiten setzen sich zu einem Partikel mit 25-34 nm Durchmesser zusammen. Innerhalb des 41 kDa großen Hüll-Proteins sind drei Domänen unterscheidbar. Die N-terminale R-Domäne, die aus 70 Aminosäuren besteht, ragt ins Innere des Partikels und interagiert über basische Aminosäurereste mit der RNA. Die R-Domäne ist über eine flexible Region (30 Aminosäuren) mit der S-Domäne (168 Aminosäuren) verbunden. Letztere ist an der Bildung der Viruspartikel-Oberfläche beteiligt (*shell*-Domäne). Über ein „Gelenk“ ist die S-Domäne mit der C-terminalen P-Domäne (110 Aminosäuren) verbunden. Diese sogenannte *projecting*-Domäne ragt dimerisiert aus der Partikel-Oberfläche heraus (Harrison *et al.*, 1978; Aramayo *et al.*, 2005).

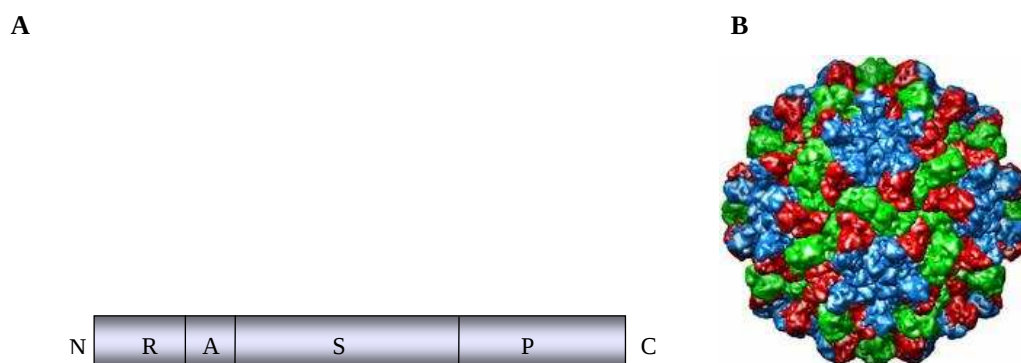


Abb. 1-3: Domänen des TBSV-Hüll-Proteins p41 und Struktur eines TBSV-Viruspartikels

A: p41, dargestellt mit seinen Domänen: RNA-bindende Domäne (R), flexible Region (A = Arm-Region), *shell*-Domäne (S), *projecting*-Domäne (P), N = N-Terminus, C = C-Terminus.

B: Darstellung eines TBSV-Viruspartikels in seiner Quartärstruktur. Die Abbildung ist der Datenbank <http://viperdb.scripps.edu/> entnommen (Shepherd *et al.*, 2006).

1.4 Untersuchungssysteme für Pflanzenviren

Wie in den vorigen Abschnitten beispielhaft angegeben, bestehen komplexe Wechselwirkungen zwischen Virus und Wirt. Wesentliche Aspekte des Infektionszyklus sind jedoch noch nicht im Detail bekannt.

Viele der Versuche mit Pflanzenviren wurden *in vivo*, d.h. in Pflanzen oder Protoplasten, durchgeführt. Pflanzen sind besonders für Studien zur systemischen Ausbreitung geeignet. Protoplasten wurden dagegen hauptsächlich für Untersuchungen an Elementen der viralen

RNA, die die Translation und Replikation beeinflussen, genutzt. Einschränkend für diese beiden Systeme ist jedoch, dass die Translation und Replikation nicht synchronisiert ablaufen. Der Einfluss von Wirtsfaktoren auf einzelne Teilschritte des viralen Infektionszyklus ist damit nur begrenzt zu untersuchen. Zudem ist die Untersuchung von Wirtsfaktoren problematisch, wenn der Faktor essentiell für die Wirtszelle ist und der Verlust eines solchen Wirtsfaktors schon die grundlegenden Funktionen der Zelle selbst beeinträchtigt. *In vitro*-Systeme sind in dieser Hinsicht von Vorteil. Zudem können damit Translation und Replikation direkt über den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren bzw. Nukleotide verfolgt werden.

Für das animale Virus *Poliovirus* konnten in einem Hela-Zellextrakt Translation, Replikation und sogar die Bildung von Viruspartikeln gezeigt werden (Molla *et al.*, 1991). Für Pflanzenviren ist bisher kein derart universelles *in vitro*-System bekannt, in dem alle Schritte des Infektionszyklus untersucht werden können, obwohl beispielsweise für das Modellvirus der *Tombusviridae*, TBSV, diverse Untersuchungssysteme beschrieben wurden.

Komoda *et al.* (2004) gelang erstmals die Entwicklung eines Pflanzen-basierten, zellfreien Systems, in dem *Brome mosaic virus*, *Tomato mosaic virus* und *Turnip crinkle virus* replizieren konnten. Das System kam bisher jedoch nicht für Vertreter der *Tombusviridae* und intensivere Charakterisierungen der Pflanzenviren zur Anwendung. Einflüsse von RNA-Elementen auf die Translation oder Replikation wurden z.B. für TBSV z.T. in unterschiedlichen Systemen wie Weizenkeimextrakt und Hefe analysiert (Wu *et al.*, 2009).

Für Versuche mit definierteren Bedingungen, als sie mit *in vivo*-Untersuchungssystemen möglich sind, wurde auf aus infizierten Pflanzen gereinigte Replikase-Komplexe zurückgegriffen. Aktive Replikase-Komplexe, die mit der Synthese von (+)- und (-)-Strang-RNA zu einem kompletten Replikationszyklus fähig sind, konnten aus *Cucumber mosaic virus*-infizierten Pflanzen gewonnen werden (Hayes & Buck, 1990). Versuche zur TBSV-Replikation wurden, in Ermangelung des authentischen Replikase-Komplexes, mit *Cucumber necrosis virus*-Replikase-Komplexen, die aus infizierten Pflanzen, bzw. Hefe, partiell gereinigt wurden, unternommen (Nagy & Pogany, 2000; Panaviene *et al.*, 2004). Diese vorassemblierten Replikase-Komplexe zeigten aber wenig Spezifität bei der Matrizen-Wahl und konnten lediglich einen zur Matrize komplementären Strang synthetisieren (Panaviene *et al.*, 2004). Erst 2008 wurde ein vollständiger Replikationszyklus des TBSV *in vitro* mit zellfreien Extrakten aus Hefe möglich (Pogany & Nagy, 2008). Untersuchungen zur Beteiligung von Wirtsfaktoren an der Replikation wurden für TBSV v.a. in diesem System durchgeführt (Nagy & Pogany, 2012). Hefe ist jedoch kein natürlicher Wirt des TBSV. Aussagen über Wirtsfaktoren hängen von der Homologie des Faktors in Hefe mit

dem Faktor aus der Wirtspflanze ab. Solche Vergleiche können jedoch problematisch sein. So unterschied sich beispielsweise der translationsverstärkende Effekt des HSP101 aus *Nicotiana tabacum* und *Triticum aestivum* bei Versuchen in Hefe mit der TMV 5'leader-Region (Wells *et al.*, 1998).

Die heterologe Expression einer aktiven RNA-abhängigen RNA-Polymerase in *E. coli* ist bisher nur für wenige Viren, wie z.B. *Turnip crinkle virus*, gelungen (Rajendran *et al.*, 2002). Für TBSV konnte dies bisher nicht gezeigt werden.

1.5 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit war in ein Projekt eingebunden, dessen Ziel es ist, Wirtsfaktoren zu identifizieren, die in verschiedenen Stadien des Infektionszyklus von Plusstrang-RNA-Viren eine Rolle spielen. Darüber hinaus sollte mit der antiviralen Immunantwort ein weiterer Teil der Virus-Wirt-Interaktion untersucht werden. Der Vergleich zwischen animalen und pflanzlichen Plusstrang-RNA-Viren könnte mit interessanten Aspekten zur Aufklärung allgemeiner Pathogenese-Mechanismen beitragen.

Um dies zu ermöglichen, sollte mit dieser Arbeit die Untersuchung von pflanzlichen Plusstrang-RNA-Viren in der Arbeitsgruppe begonnen werden. Dafür war es erforderlich, ein Wirts-authentisches System, in dem Translation und Replikation unter definierten Bedingungen ablaufen, zur Hand zu haben. Ein solches System sollte als zellfreies *in vitro*-System für das Modellvirus eines pflanzenpathogenen Plusstrang-RNA-Virus der Familie *Tombusviridae*, *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), etabliert werden. Anhand dieses Virus sollte das System im Hinblick auf seine Eignungen und Grenzen evaluiert werden.

Zum einen sollte geklärt werden, inwieweit damit die Charakterisierung von replikationsregulatorischen RNA-Elementen möglich ist. Zum anderen sollte der Frage nachgegangen werden, ob ein weiterer Schritt des viralen „Lebenszyklus“, die Viruspartikel-Assemblierung, mit diesem System rekonstituiert werden kann. So ist für das TBSV bisher nicht bekannt, welche RNA-Motive für die Formierung eines Viruspartikels nötig sind.

In Ergänzung zu Versuchen im pflanzlichen Extrakt sollte ein noch definierterer Assay etabliert werden, der gezielte Studien mit einzelnen Proteinen und deren Zusammenspiel mit der viralen RNA und der RNA-abhängigen RNA-Polymerase erlaubt. Dazu sollte die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase des TBSV als rekombinantes Protein gereinigt werden und die Aktivität in einem assay, der unabhängig von pflanzlichem Extrakt ist, getestet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien, Kits, Enzyme und Verbrauchsmaterialien wurden von den im Text angegebenen oder hier aufgeführten Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf), Corning (Corning, NY, USA), DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig), Diagonal (Münster), Duchefa (Niederlande), Fermentas (St. Leon-Rot), Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Jena Bioscience (Jena), Macherey-Nagel (Düren), Merck (Darmstadt), New England Biolabs GmbH (NEB, Ipswich, MA, USA), Novagen (Merck, Darmstadt), Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), Promega (Madison, WI, USA), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sartorius (Göttingen), Schubert (Leipzig), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Stratagene (Santa Clara, CA, USA), VWR (Darmstadt).

Die genannten Orte liegen in Deutschland, wenn nicht anders angegeben.

Spezielle Chemikalien und Materialien sind im Folgenden gesondert aufgelistet:

Chemikalien:

Agarose low EEO	AppliChem (Darmstadt)
Aminosäuremix, <i>complete</i>	Promega (Madison, WI, USA)
Carborundum (Siliziumcarbid)	Sigma (Taufkirchen)
Coomassie Brilliant Blau R-250	Roth (Karlsruhe)
2,4-D (2,4 Di-Chlorphenoxyessigsäure)	Serva (Heidelberg)
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem (Darmstadt)
Guanidinhydrochlorid	Roth (Karlsruhe)
Harnstoff	AppliChem (Darmstadt)
HEPES	AppliChem (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Murashige & Skoog Medium Basal Salt mixture	Duchefa (Niederlande)
Murashige & Skoog Medium mit Gamborg B5 Vitaminen	Duchefa (Niederlande)

Myo-Inositol	Duchefa (Niederlande)
N-Octyl- β -D Glucopyranosid	Calbiochem (Darmstadt)
Percoll	Sigma (Taufkirchen)
Phenol, wassergesättigt, stabilisiert, pH 4	AppliChem (Darmstadt)
Phenol, equilibriert, stabilisiert pH 7,8-8,2	AppliChem (Darmstadt)
Phosphorsäure 85%	chemsolute (Th.Geyer), (Renningen)
PMSF	Sigma (Taufkirchen)
Puromycin Dihydrochlorid	AppliChem (Darmstadt)
Protease-Inhibitor (Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Protease-Inhibitor (Complete Mini)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Quinacrine Dihydrochlorid	Calbiochem (Darmstadt)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva (Heidelberg)
Super Signal West Pico Luminol Enhancer Solution	Pierce, Rockford, IL (USA)
Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution	Pierce (Rockford, IL, USA)
TCEP	Sigma (Taufkirchen)
Thiamin-HCL	Sigma (Taufkirchen)
Thioglycolsäure	AppliChem (Darmstadt)
Triton X-100	Merck (Darmstadt)

Radiochemikalien

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig)
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-CTP}$	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig)
L- $[\text{}^{35}\text{S}]\text{-Methionin}$	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig)
Rainbow $[\text{}^{14}\text{C}]$ methylated protein molecular weight marker	Amersham, GE Healthcare (Freiburg)
$[\text{}^{14}\text{C}]$ methylated protein molecular weight marker	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)

Enzyme

Cellulase Onozuka RS	Duchefa (Niederlande)
Cellulase (from <i>Trichoderma viridae</i>)	Serva (Heidelberg)
Macerozym	Serva (Heidelberg)

Mikrokokkus-Nuklease	Roche Diagnostics (Mannheim)
Pectolyase Y23	Duchefa (Niederlande)

Verbrauchsmaterialien:

Cellulose Nitrate Filter CN Membran 0,45 µm 47mm	Sartorius (Göttingen)
Centrifuge tubes Ultra clear, 14 ml	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
CL-Xposure Film 5×7 inches	Pierce (Rockford, IL, USA)
HisTrap FF crude, 5 ml CV	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
Ionenaustauschpapier DE81 (DEAE Cellulosepapier)	Whatman (Maidstone, UK)
LightCycler capillaries (20 µl)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Microfuge Tubes Polyallomer 1,5 ml	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
Nylon-Membran (Immobilon-NY ⁺)	Millipore (Billerica, MA, USA)
Protran Nitrocellulose transfer membrane	Whatman GmbH (Dassel)
Visking dialyse tubing MW 12.000-14.000 16 mm, RC	Serva (Heidelberg)
Visking dialyse tubing 36/32 MW 12.000-14.000 28 mm, RC	Serva (Heidelberg)

2.1.2 Geräte

Geräte der im Text genannten, der unten aufgeführten und der folgenden Hersteller wurden genutzt: Binder (Tuttlingen), Eppendorf (Hamburg), Fisherbrand (Waltham, MA, USA), IKA-Werke GmbH & Co KG (Staufen), New Brunswick Scientific (Enfield, CT, USA), Schott Instruments (Mainz).

Äkta Purifier, P-900, UV-900 (FPLC) (Unicorn Software 5.11)	GE Healthcare, Uppsala (Schweden)
BioPhotometer	Eppendorf AG (Hamburg)
Biostat C-DCU mit digitalem Mess- und Regelsystem und Prozessleitsystem MCFSwi	Sartorius BBI Systems GmbH (Melsungen)
BioView transilluminator UXT-30M-8E	Biostep GmbH (Jahnsdorf)
Dounce Homogenizer (tight fit)	Wheaton Science Products (Millville, NJ, USA)

Gaulin Homogenisator, Micron LAB 40	APV (Lübeck)
Hybridization Incubator Isotemp	Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Image Eraser	Molecular Dynamics GmbH (Krefeld)
Inkubator	Binder (Tuttlingen)
Inkubationsschüttler Multitron	Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Kodak EDAS-290 (Electrophoresis Documentation and Analysis System)	Kodak (Stuttgart)
LightCycler 1.5	Roche Diagnostics (Mannheim)
Mastercycler personal	Eppendorf AG (Hamburg)
Percival Pflanzenzuchtkammer E41L2	CLF PlantClimatics GmbH (Emersacker)
Sirius Luminometer	Berthold detection systems (Pforzheim)
Storm 860 Molecular Imager	Molecular Dynamics GmbH (Krefeld)
Storage Phosphor Screen	Fujifilm Life Science (Stamford, CT, USA) und Amersham Biosciences (Freiburg)
Tischthermostat/ Thermomixer	Eppendorf AG (Hamburg)
Trans Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Ultraschall-Prozessor 200S	Hielscher Ultrasonics GmbH (Teltow)
Uni geldryer 3545 D	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

Zentrifugen und Rotoren:

Rotina 38R	Hettich (Tuttlingen)
Mikro 200	Hettich (Tuttlingen)
Mikro 200R	Hettich (Tuttlingen)
Optima TLX Ultracentrifuge	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
Beckmann L8-60M	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
Avanti J-25	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
SW 40Ti	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
TLA-100.3	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
45 Ti	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
Rotor JLA 8.1000	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)

2.1.3 Bakterienstämme und Pflanzenmaterial

Die *Escherichia coli*-Stämme (*E. coli*), Pflanzen und Suspensionskulturen, auf die in dieser Arbeit zurückgegriffen wurden, sind im Folgenden aufgelistet (Tab. 2-1 und 2-2).

Tab. 2-1: Übersicht über die verwendeten *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp (Eigenschaft)	Referenz
Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str^r) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen
HB101	F ⁻ <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>recA13 supE44 ara14 galK2 proA2 lacY1 rpsL20</i> (Sm ^r) <i>xyl5</i> λ ⁻ <i>leu mtl1</i>	Invitrogen
BL21-CodonPlus (DE3)-RP	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU proL Cam</i> ^r]	Stratagene
BL21-AI	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm araB::T7RNAP-tetA</i>	Invitrogen
C43(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Miroux & Walker (1996)

λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*])

Tab. 2-2: Übersicht über das verwendete Pflanzenmaterial

Name	Bezugsquelle
<i>Nicotiana tabacum</i> BY-2 Suspensionskultur	Dr. B. Hause, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle
<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 WT Suspensionskultur	Dr. J. Lee, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (SFB 648)
<i>Lycopersicon esculentum</i> Suspensionskultur	Dr. M. Köck, MLU Halle-Wittenberg, Biozentrum
<i>Nicotiana benthamiana</i> WT-Pflanzen	MLU Halle-Wittenberg, AG Bonas (SFB 648)

2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab. 2-3 aufgeführt, die genutzten Oligonukleotide in Tab. 2-4.

Tab. 2-3: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Name	relevante Merkmale	Referenz
pUC18	Amp ^R , <i>lacZ</i>	Fermentas
pSP- <i>luc</i> +	Amp ^R , <i>luc</i> (Firefly Luciferase-ORF), SP6-RNA-Polymerase-Promotor	Promega
pMAL-c4E	Amp ^R , <i>malE</i> , Enterokinase Spaltstelle, IPTG induzierbarer Promotor	NEB
pGEM®-T Easy	Amp ^R , T7 RNA-Polymerase-Promotor	Promega, Madison WI, USA
pLuc_GEMTeasy	pGEM®-T Easy Vektor mit Firefly Luciferase-Insert	diese Arbeit

pTBSV-100	cDNA-Klon des Gesamtgenom des <i>Tomato bushy stunt virus</i> (TBSV)	Hearne <i>et al.</i> , 2009
pTBSV-100 mu2	Variante des pTBSV-100 mit Mutation des RdRP-GDD-Motivs in GDA, TBSV gRNAmu2	Dr. Gursinsky, MLU Halle-Wittenberg (Gursinsky <i>et al.</i> , 2009)
pTBSV DI B10	cDNA-Klon der TBSV <i>defective interfering</i> RNA, Isolat B10	Knorr <i>et al.</i> , 1991
pTVDI _{muA}	Punktmutation in TBSV DI B10: p33RE C→G	Dr. Gursinsky, MLU Halle-Wittenberg (Gursinsky <i>et al.</i> , 2009)
pTVDI _{muB}	Punktmutation in TBSV DI B10: SL3 (RSE) C→G	diese Arbeit
pTVDI _{muC}	Punktmutation in TBSV DI B10: gPR G→C	diese Arbeit
pTVDI _{muE}	Punktmutation in der TBSV DI B10: gPR AG → GA	diese Arbeit
pTVDI _{muD}	zwei Punktmutationen in TBSV DI B10: SL3 (RSE) C→ G und gPR G→ C	diese Arbeit
pTVDIARI	Deletion der RegionI in TBSV DI B10	diese Arbeit
pTBSV-DI-mi	(-)-Strang-Sequenz des TBSV DI B10	Dr. Gursinsky, MLU Halle-Wittenberg
pTCV	cDNA-Klon des Gesamtgenoms des <i>Turnip crinkle virus</i>	Dr. Anne Simon, University of Maryland, USA
pTCVmu2	Variante des pTCV mit Mutation des RdRP-GDD-Motivs in GDA	Dr. Gursinsky, MLU Halle-Wittenberg
pSPTVP92Y	FF-Luciferase-ORF in pSP- <i>luc</i> ⁺ durch TBSV p92 ORF ersetzt	Dr. Gursinsky, MLU Halle-Wittenberg (Gursinsky <i>et al.</i> , 2009)
pSPTVP33	FF-Luciferase-ORF in pSP- <i>luc</i> ⁺ durch TBSV p33 ORF ersetzt	Dr. Gursinsky, MLU Halle-Wittenberg (Gursinsky <i>et al.</i> , 2009)
pSP _{luc} _At1	FF-Luciferase-ORF in pSP- <i>luc</i> ⁺ durch <i>Arabidopsis thaliana</i> Hsc70.1-ORF ersetzt	Penzel, 2009
pSP-p41	pSP- <i>luc</i> ⁺ -Derivat, FF-Luciferase-ORF durch TBSV p41 ORF ersetzt;	diese Arbeit
pSP-p41stop	pSP- <i>luc</i> ⁺ -Derivat, FF-Luciferase-ORF durch TBSV p41 ORF mit Punktmutation für vorzeitiges Stop-Codon ersetzt	diese Arbeit
pTVsgRNA1	puc18 mit TBSV-sgRNA1-Sequenz als Insert	diese Arbeit
pMALp92	TBSV p92 als Insert in pMAL-c4E für die Expression als Fusionsprotein	diese Arbeit
pET_SUMO_p92	TBSV p92 als Insert in adaptiertem pET_SUMO-Vektor zur Expression als SUMO-Fusionsprotein mit His ₆ -tag (His ₆ _SUMO_p92)	Penzel, 2009
pET_SUMO_p33	TBSV p33 als Insert in adaptiertem pET_SUMO-Vektor zur Expression als SUMO-Fusionsprotein mit His ₆ -tag (His ₆ _SUMO_p33)	Penzel, 2009
pMS2 MBP	ORF des Hüll-Proteins des MS2-Virus, Maltose-Binde-Protein-ORF	MLU Halle-Wittenberg

Die Oligonukleotide wurden von eurofins MWG operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tab. 2-4: Übersicht über die eingesetzten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' – 3')
Einführung von Punktmutationen in TBSV-DI cDNA-Klon	
RSE_C-G_s	CCTTCGGGGGGGGTACAGAGATCGC
RSE_C-G_as	GCGATCTCTGTACCCCCCCCGAAGG
3'CSS_G-C-s	GGAACATTGCAGAAATGCACCCCGGGCATG
3'CSS_G-C-as	CATGCCCCGGGGTGCATTTCTGCAATGTTCC
3'CSS_AG-GA_s	CGGAACATTGCAGAAATGCGACCCGGGCATGCAAGC
3'CSS_AG-GA_as	GCTTGCATGCCCCGGGTCGCATTTCTGCAATGTTCCG
Mutagenese des p41 – Einführung eines Stop-Codons	
TVp41qc-stop-s	CCCGGTGAGTACAAAGTAATTACTGGCATTGGGTGC
TVp41qc-stop-as	GCACCCAATGCCAGTAATTACTTTGTACTCACCGGG
Klonierung der TBSV sgRNA1	
T7TVsgRNA1-fw1	CCCTAATACGACTCACTATAGACCAAGAATACACACACGCAGG
gTBSV+Sma1/2-rev	GGGCTGCATTTCTGCAATGTTCCGGTTGTCCGG
Northern Blot Sonde für TBSV (602 nt des 3'Endes)	
TVsgRNA1-np-fw-2	GCAGCATCTCGATTTTTTCGGTTTCGACC
TVsgRNA1-np-rev	TAATACGACTCACTATAGGGCTGCATTTCTGCAATGTTCCGG
Klonierung von p92 in pMAL-c4E	
TVp92-fw	ATGGAGACCATCAAGAGAATGATTTGGCC
TVp92-XbaI-rev	TGCTCTAGATTAAGCTACGGCGGAGTCG
Klonierung des TBSV-p42-ORF in pSP-luc+	
TVp41Exp1f	CATGCCATGGCAATGGTAAAGAGAAACAAC
TVp41Exp1r	GCTCTAGAATTAAATTAGAGAAACATCATTCTGTC
Klonierung des Firefly-Luciferase-ORF in pGEM®-T Easy	
Luc-fir-fw-neu	CGGAATTCAGATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG
Luc-fir-rev	CGGAATTCTTACACGGCGATCTTTCCGCCCTTC
qRT-PCR und RT-PCR	
TVGMQRTP1s	CATGAAGAGACGGCAGAGG
TVGM RTP1a	CTAGGCACCCTGACATTGAAC
TVGM RTP5s	GTGCGGAGAAGAGGAGGTAAG
TVGM RTP5a	CGCCAACTCAACTCTATCAGC
18sRNAs	AAACGGCTACCACATCCAAG
18sRNAa	CCTCCAATGGATCCTCGTTA

2.2 Anzucht von Bakterien und Kultivierung des pflanzlichen Versuchsmaterials

2.2.1 Anzucht von *E. coli* und Bestimmung der optischen Dichte

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte stets aus transformierten *E. coli*-Zellen (s.u.). Einzelkolonien wurden gegebenenfalls durch einen Verdünnungsausstrich auf LB-Agar-Platten, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurden, gewonnen. Zur längeren Lagerung von *E. coli*-Kolonien (für etwa 4 Wochen) wurden solche LB-Agar-Platten bei 4°C aufbewahrt. *E. coli*-Zellen wurden als Flüssigkultur in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika im Maßstab von 1,5 ml (Übernachtskultur) bis zu 200 ml bei 37°C und 250 rpm für 8 bis 16 Stunden angezogen. Das LB-Medium wurde dazu mit aus einer Einzelkolonie stammenden *E. coli*-Zellen angeimpft.

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch (Eppendorf BioPhotometer) anhand der OD bei 600 nm bestimmt.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium): 1% (w/v) Bacto-Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
1% (w/v) NaCl
pH 7 (mit NaOH)

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar

Die Medien wurden zur Verwendung autoklaviert.

2.2.2 Fermentation von *E. coli*

Zur Gewinnung größerer Proteinmengen wurden mit pET_SUMO_p92 transformierte *E. coli* CodonPlus(DE3)-RP-Zellen in einem Bioreaktor Biostat C-DCU mit digitalem Mess- und Regelsystem und dem Prozessleitsystem MCFSwin im *Fed batch*-Verfahren kultiviert.

Der Bioreaktor wurde mit Medium 1 (5 l) autoklaviert und das Volumen anschließend mit sterilem ddH₂O auf 5 l aufgefüllt. Anschließend wurden je 250 ml autoklavierter Glukose-Lösung (12% w/v), Magnesiumsulfat-Lösung (1,63% w/v), di-Kaliumhydrogenphosphat-Lösung (26,4% w/v) und Antibiotika für 8 l (40 mg/l Chloramphenicol, 50 mg/l Kanamycin) zugegeben. Das Animpfen des Bioreaktors erfolgte mit Zellen, die aus drei 200 ml-Kulturen 20 min bei 6000 rpm steril abzentrifugiert wurden. Die 200 ml-Vorkulturen wurden ihrerseits mit je einer 3 ml Vorkultur angeimpft, in denen eine Einzelkolonie ca. 8 h bei 37°C angezogen wurde. Nach der Inokulation wurde die Temperatur zunächst für 12 h bei 30°C gehalten. Bei einer OD₆₀₀ von 80 im Fermenter wurde die Proteinexpression durch die

Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Temperatur wurde im Folgenden innerhalb einer Stunde auf 16°C abgesenkt und für die Expressionszeit über Nacht beibehalten.

Zur kontinuierlichen Einstellung des pH-Wertes im Fermenter auf pH 7 waren je 500 ml 10% Phosphorsäure und 10% NaOH an den Bioreaktor angeschlossen. Während der Kultivierung der Zellen wurde nach Verbrauch der Glukose-Lösung im Fermenter stetig *feeding*-Lösung automatisch zugeführt. Der Sauerstoffgehalt wurde ebenfalls automatisch auf etwa 30% gehalten.

Nach Beendigung der Expression wurden die Zellen aus dem Fermenter abgelassen und 20 min bei 6000 rpm (Beckmann Avanti J-25, Rotor JLA 8.1000) abzentrifugiert, portionsweise in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -40°C gelagert.

Medium 1: 6% (w/v) Hefeextrakt
 0,06% (w/v) Ammoniumchlorid
 0,02% (v/v) Antifoam
 in ddH₂O

feeding-Lösung: 50% (w/v) Hefeextrakt in ddH₂O (1,2 l)
 31,25% (w/v) Glukose in ddH₂O (0,8 l)

Beide Lösungen wurden getrennt voneinander autoklaviert und anschließend steril vereinigt.

weitere Lösungen: 12% (w/v) Glukose in ddH₂O (250 ml);
 1,63% (w/v) Magnesiumsulfat in ddH₂O (250 ml);
 26,4% (w/v) di-Kaliumhydrogenphosphat in ddH₂O (250 ml)

Die Lösungen wurden zur Verwendung autoklaviert.

2.2.3 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen wurden chemisch kompetente Zellen genutzt. Dazu wurde eine Übernachtskultur steril mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C bei 250 rpm angezogen. 1 ml der Übernachtskultur wurde steril in 100 ml LB⁺⁺-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,55 bei 37°C angezogen. Die Kultur wurde auf Eis unter gelegentlichem Schütteln abgekühlt. Die Zellen wurden anschließend für 10 min bei 4°C und 3000 rpm pelletiert (Hettich Rotina 38R). Das Zellpellet wurde in 30 ml kaltem TfBI gelöst, 10 min auf Eis inkubiert, für 10 min bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert und in 4 ml TfBII gelöst. Die resuspendierten Zellen wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren bevor sie bis zur weiteren Nutzung bei -80°C gelagert wurden.

LB⁺⁺-Medium: LB-Medium mit 20 mM MgSO₄ und 10 mM KCl

TfBI: 30 mM KOAc	TfBII: 10 mM MOPS
100 mM RbCl	75 mM CaCl ₂
10 mM CaCl ₂	10 mM RbCl
50 mM MnCl ₂	15% Glycerin
15% Glycerin	pH 6,5 mit KOH
pH 5,8 mit Essigsäure	
Der Puffer wurde sterilfiltriert.	Der Puffer wurde sterilfiltriert.

2.2.4 Kultivierung der pflanzlichen Suspensionkulturen

Nicotiana tabacum BY-2- und *Lycopersicon esculentum*-Suspensionskulturen wurden steril in 250 ml Erlenmeyerkolben in 50 ml BY-2-Medium angezogen. *Arabidopsis thaliana*-Suspensionskulturen wurden steril in 250 ml Erlenmeyerkolben in 30 ml modifiziertem MS-Medium angezogen. Die Kultivierung erfolgte bei 23°C in Dunkelheit bei leichtem Schütteln (120 rpm, Infors Multitron).

Zur Erhaltung der *Nicotiana tabacum* BY-2- und *Lycopersicon esculentum*-Suspensionskulturen wurden 3-5 ml einer 7 Tage alten Kultur unter sterilen Bedingungen in 45-47 ml frisches Medium überführt. Eine Erhaltungskultur von *Arabidopsis thaliana* wurde durch Überführung von 7 – 10 ml einer 7 Tage alten Kultur in frisches Medium weitergeführt. Die Kolben wurden jeweils mit Aluminiumfolie verschlossen und wie oben angegeben inkubiert.

Für die Präparation von zytoplasmatischem Extrakt vorgesehene Kulturansätze wurden, wie die Erhaltungskultur, in frisches Medium umgesetzt und für 4-5 Tage angezogen.

BY-2-Medium: 1x Murashige & Skoog Basal Medium
 3% (w/v) Saccharose
 1 µg/ml Thiamin-HCL
 0,2 µg/ml 2,4-D
 100 µg/ml Myo-Inositol
 200 µg/ml KH₂PO₄
 pH 5,8 (mit KOH)

modifiziertes MS-Medium: 1 x Murashige & Skoog-Medium mit Gamborg B5-Vitaminen
 1 mg/l 2,4 D
 30 g/l Saccharose
 pH 5,7 (mit KOH)

2.2.5 Anzucht und Haltung der *Nicotiana benthamiana* Pflanzen

N. benthamiana Pflanzen wurden freundlicherweise im Rahmen des SFB 648 zur Verfügung gestellt und von Frau B. Rosinsky bis zum Alter von 4 bis 5 Wochen im Gewächshaus angezogen (Lichtperiode: 5:00-21:00 Uhr; Tag: 25°C, 60% relative Luftfeuchte; Nacht: 19°C, 40% relative Luftfeuchte).

Für Infektionsversuche wurden die Pflanzen in eine Percival Pflanzenzuchtkammer (E41L2, CLF PlantClimatics GmbH) überführt und bei 25°C und einer Lichtperiode von 14 h (ca. 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) gehalten (Desvoyes & Scholthof, 2002).

2.3 Molekularbiologische Standard-Methoden

Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden, soweit möglich und nötig, durch Sterilfiltration oder Autoklavieren sterilisiert.

2.3.1 DNA-Methodik

2.3.1.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock. Ein 100 μl -Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden dazu von -80°C für 10 min auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden 10 μl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA zugegeben und nach vorsichtigem Mischen 20 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock für 2 min bei 42°C wurden die Zellen weitere 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 μl LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. 100 μl der transformierten Zellen wurden auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

Für Konstrukte mit dem Gesamtgenom eines Virus wurden HB101-Zellen genutzt. Andere Plasmid-Konstrukte wurden in Top10-Zellen bzw. Expressionsstämme gebracht.

2.3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Präparation von Plasmiden im kleineren Maßstab (Miniprep) wurden Übernachtskulturen 1 min bei RT und 13000 rpm (Hettich Mikro 200) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μl Lösung I resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 200 μl frisch hergestellter Lösung II zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 μl kalter Lösung III zugeetzt. Das Lysat wurde durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und nach

kurzer Inkubationszeit auf Eis zur Abtrennung der Zelltrümmer 15 min bei 4°C und 13000 rpm (Hettich Mikro 200R) zentrifugiert. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde abgenommen, in 10-minütiger Inkubation mit 315 µl Isopropanol gefällt und 15 min bei RT und 13000 rpm (Hettich Mikro 200) pelletiert. Daran schloss sich ein Waschschriff mit 500 µl 70% Ethanol an, bevor das DNA-Pellet getrocknet und in 30 µl ddH₂O mit 20 µg/ml RNase A gelöst wurde.

Zur Gewinnung sehr reiner Plasmid-DNA, z.B. für Sequenzierreaktionen, wurde die DNA per Kit (peqGOLD Plasmid Miniprep I (Peqlab) nach Herstellerangaben isoliert.

<u>Lösung I (autoklaviert)</u>	<u>Lösung II</u>	<u>Lösung III (autoklaviert)</u>
25 mM Tris/HCl pH 7,9 - 8	0,2 N NaOH	2,55 M KAc pH 4,8
50 mM Glucose	1% (w/v) SDS	
10 mM EDTA		

Zur Präparation im größeren Maßstab wurde Plasmid-DNA aus 50-100 ml Flüssigkultur mit Qiagen-tip 100 (Qiagen) oder mit PureYield Plasmid Midiprep System (Promega) den Herstellerangaben entsprechend isoliert.

2.3.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde photometrisch (Eppendorf Bio photometer) anhand des OD₂₆₀-Wertes bestimmt. Für dsDNA gilt: OD₂₆₀ von 1 = 50 µg/ml. Zur Überprüfung der Reinheit einer DNA-Lösung wurde der Quotient aus dem OD₂₆₀-Wert und dem OD₂₈₀-Wert herangezogen.

2.3.1.4 Auftrennung von DNA per Gelelektrophorese

DNA-Fragmente, wie z.B. PCR-Produkte, wurden Sambrook & Russel (2001) entsprechend in 1-2% Agarose-Gelen (mit 0,3 mg/ml Ethidiumbromid) in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetate, pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgetrennt. Vor der Beladung des Gels wurden die Proben mit 1/5 des Volumens mit Ladepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,03% Bromphenolblau, 0,03% Xylencyanol, 60% Glycerol, 60 mM EDTA) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 80 - 120 V. Unter UV-Licht (BioView transilluminator UXT-30M-8E) wurde die DNA durch den Zusatz von Ethidiumbromid im Gel sichtbar und konnte mittels Kodak-EDAS-Software dokumentiert werden.

Als Größenstandards für DNA dienten folgende Marker: Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas), Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas), Quick-Load™ 1 kb DNA Ladder (NEB) oder Quick-Load™ 100 bp DNA Ladder (NEB).

2.3.1.5 Reinigung von DNA

Die Isolierung bzw. Reinigung von DNA, z.B. aus Reaktionsansätzen wie Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen, erfolgte wie die Phenol/Chloroform-Extraktion von RNA (siehe unten). Jedoch wurde Phenol mit pH 7,8 – 8,2 eingesetzt. Die Fällung erfolgte mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2) sowie 2,5 Volumen Ethanol (reinst, 96%) für mindestens 20 min. Bei Fällung geringer Mengen wurde die Inkubation bei -20°C durchgeführt. Anschließend wurde 30 min bei 4°C und 13000 rpm (Hettich Mikro 200R) zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Trocknen des Pellets wurde dieses in mindestens 30 µl ddH₂O gelöst.

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das gewünschte Fragment unter UV-Licht (BioView transilluminator UXT-30M-8E) identifiziert und mit Hilfe eines Skalpells mit dem Agarose-Gel-Stück ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Agarose-Gel-Stück erfolgte mittels Gel Extraction Kit (Pqclab).

2.3.1.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Linearisierung von DNA für *in vitro* Transkriptionen und für Klonierungen wurde DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Reaktionsansätze mit Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkten wurden dazu unter Reaktionsbedingungen wie vom Hersteller des Enzyms empfohlen, angesetzt. Die Ansätze wurden mindestens die empfohlene Zeit oder über Nacht inkubiert. Das Ergebnis der Spaltungen wurde stets per Gelelektrophorese analysiert. Sollten weitere Reaktionen, wie z.B. Ligation, folgen, wurde die DNA per Phenol/Chloroform-Extraktion oder Kit (Gel Extraction Kit, Pqclab) gereinigt.

2.3.1.7 Dephosphorylierung von DNA

Zur Vorbereitung eines Vektors für Klonierungsschritte wurde DNA mittels Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Promega bzw. NEB oder FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas). Im 20 µl Reaktionsansatz wurde die DNA mit Reaktionspuffer des Enzym-Herstellers und 1-2 U des Enzyms für 1 h

bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde per Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung aus dem Reaktionsansatz gereinigt.

2.3.1.8 blunt end-Erzeugung an DNA-Fragmenten

Für Klonierungszwecke war z.T. die Erzeugung von glatten Enden (*blunt ends*) von zuvor gespaltener DNA gewünscht. Zum Abbau überhängender Enden von DNA wurde die Mung Bean Nuclease (Promega) genutzt, zum Auffüllen überhängender Enden das Klenow-Fragment (Fermentas). Die Enzyme wurden den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt.

2.3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde mit der T4 DNA Ligase (Fermentas) mit 1 bis 5 U des Enzyms weitgehend nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Ligation eines Inserts in einen Vektor wurde das Insert im 3-fachen molaren Überschuss gegenüber dem Vektor eingesetzt. Die Inkubation eines Reaktionsansatzes erfolgte mindestens 1 h bei 22°C oder über Nacht bei 16°C. Das Enzym wurde anschließend durch 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert und 10 µl eines Ansatzes zur Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet.

2.3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden verschiedene DNA-Polymerasen genutzt. Für *in vitro*-Transkriptionen oder Klonierungen genutzte PCR-Produkte wurden von DNA-Polymerasen mit *proofreading*-Aktivität (Pwo-DNA-Polymerase von Peqlab und Phusion-DNA-Polymerase von Biozym) synthetisiert. Dienten die PCR-Produkte zur Analyse, wie z.B. nach einer Reversen Transkription, wurde die Taq-DNA-Polymerase (DreamTaqTM-DNA-Polymerase, Fermentas) eingesetzt.

Die Zusammensetzung typischer Reaktionsansätze ist in Tabelle 2-5 aufgeführt.

Tab. 2-5: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Komponente	Endkonzentration		
	Pwo-DNA-Polymerase	Phusion-DNA-Polymerase	Taq-DNA-Polymerase
Reaktions-Puffer	1 x (mit 2 mM MgCl ₂)	1 x (Phusion HF Puffer, mit 1,5 mM MgCl ₂)	1 x (mit 2 mM MgCl ₂)
dNTP-Mix	200 µM	200 µM	200 µM
Primer <i>forward</i>	0,3 µM	0,5 µM	0,26 µM
Primer <i>reverse</i>	0,3 µM	0,5 µM	0,26 µM
DNA-Polymerase	0,03 U/µl	0,02 U/µl	0,04 U/µl
DNA-Matrize	100 ng	10 ng	≤ 1 µg
ddH ₂ O	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 30 µl

Die Reaktionen wurden im Eppendorf Mastercycler personal ausgeführt. Die *Annealing*-Temperatur richtete sich nach den verwendeten Primern. Für die Pwo-DNA-Polymerase sowie die Taq-DNA-Polymerase-Reaktion lag die *Annealing*-Temperatur 2-10°C niedriger als die geringere der beiden Primer-Schmelztemperaturen. Diese wurde den Herstellerangaben entnommen. Für die Phusion-DNA-Polymerase-Reaktion lag die *Annealing*-Temperatur 3°C über der geringeren der beiden Primer-Schmelztemperaturen. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes. Tabelle 2-6 zeigt die Reaktionsparameter.

Tab. 2-6: Übersicht über den Programmablauf einer PCR-Reaktion

Schritt	Pwo-DNA-Polymerase		Phusion-DNA-Polymerase		Taq-DNA-Polymerase	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
1. initiale Denaturierung	94°C	2 min	98°C	30 sec	95°C	1 min
2. Denaturierung	94°C	45 sec	98°C	10 sec	95°C	30 sec
3. <i>Annealing</i>	je nach Primer	45 sec	je nach Primer	20 sec	je nach Primer	30 sec
4. Elongation	72°C	45 sec/ 1 kb	72°C	15– 30 sec/ 1 kb	72°C	1 min/ 1 kb
5. abschließende Elongation	72°C	10 min	72°C	10 min	72°C	10 min

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 15 bis 30 Zyklen wiederholt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze auf 14°C gekühlt. Aliquots der PCR-Ansätze wurden per Gelelektrophorese analysiert und/oder gegebenenfalls für den Einsatz in Folgereaktionen per Kit (Gel Extraction Kit, Peqlab) gereinigt.

2.3.1.11 Einführung von Mutationen in DNA – zielgerichtete Mutagenese

Die Einführung von Punktmutationen oder mehrfachen Basenaustauschen in DNA wurde mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt. Dabei wird eine PCR-Reaktion mit zwei Oligonukleotiden angesetzt, die neben der Mutation jeweils komplementäre Bereiche zur Zielsequenz haben. Nach der PCR-Reaktion wird die nicht-mutierte Matrize durch *DpnI*, ein häufig spaltendes Restriktionsenzym, das nur methylierte DNA erkennt, abgebaut. Die mutierte Plasmid-DNA kann anschließend zur Transformation von *E. coli* genutzt werden.

Die Reaktionen wurden nach Empfehlungen des Herstellers angesetzt. Die PCR-Reaktion wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

- 1.) 95°C 30 sec
 - 2.) 95°C 30 sec
 - 3.) 55°C 1 min
 - 4.) 68°C 1 min / kb Plasmid-Größe
- abkühlen auf 37°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 12 bzw. 17 Zyklen wiederholt.

2.3.1.12 Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden von eurofins MWG operon durchgeführt.

2.3.2 RNA-Methodik

2.3.2.1 Phenol-Chloroform Extraktion von RNA und Fällung

Zur Reinigung von RNA, z.B. aus *in vitro*-Transkriptionsansätzen wurde das Volumen des Ansatzes auf 200 µl mit ddH₂O aufgefüllt und 1 Volumen eines Gemisches aus Phenol (pH 4), Chloroform und Isoamylalkohol (im Verhältnis 25:24:1 (v/v)) zugesetzt. Nach sorgfältiger Mischung (Vortex) wurde zur Phasentrennung 2- 3 min bei RT und 13000 rpm (Hettich Mikro 200) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde, möglichst ohne Störung der Interphase und organischen Phase, abgenommen und mit 1 Volumen Chloroform versetzt. Die Lösung wurde wiederum gründlich gemischt (Vortex) und 2-3 min bei RT und 13000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde abgenommen und mit 1/5 Volumen 6 M Ammoniumacetat (NH₄CH₃COO) und 2,5 Volumen Ethanol (reinst, 96%) versetzt. Der Einsatz von NH₄CH₃COO verhinderte dabei weitgehend die Kopräzipitation freier Nukleotide. Bei Fällung geringer RNA-Mengen wurden 20 µg Glycogen zugesetzt. Zur Präzipitation der RNA wurde der Ansatz mindestens 20 min bei RT

inkubiert und anschließend 30 min bei 4°C (oder 20°C) und 13000 rpm (Hettich Mikro 200R) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in mindestens 15 µl ddH₂O gelöst, gegebenenfalls durch 5-minütige Inkubation bei 50°C.

2.3.2.2 RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial – Trizol-Methode

Etwa 0,1 g Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff mit vorgekühltem Mörser und Pistill zu feinem Pulver zerkleinert und mit gekühltem Spatel in 1 ml Trizol gegeben. Die Probe wurde 1 min gründlich gemischt (Vortex) und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wurde 30 sec gründlich gemischt (Vortex) und erneut 5 min bei RT inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm (Hettich Mikro 200R) wurde der wässrige Überstand abgenommen und zur Fällung der RNA mit 1 Volumen Isopropanol versetzt. Die Probe wurde 10 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in ddH₂O gelöst.

Trizol: 0,8 M Guanidinthiocyanat
0,4 M Ammoniumthiocyanat
0,1 M NaAc, pH 5
5% (v/v) Glycerin
38% (v/v) Phenol
komplettiert mit ddH₂O

2.3.2.3 RNA-Isolierung aus Viruspartikeln

Für die Isolierung der viralen RNA aus Viruspartikeln wurden zu 100 µl einer Viruspartikel-Suspension 5 µl Proteinase K (19,6 mg/ml, Fermentas) zugegeben. Die Enzymaktivität wurde mit 1 M Harnstoff gesteigert. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 37°C, die Inaktivierung des Enzyms für 15 min bei 50°C. Anschließend folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung. Das RNA-Pellet wurde in 15 µl ddH₂O gelöst.

2.3.2.4 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration einer RNA-Lösung wurde photometrisch (Eppendorf Bio photometer) anhand des OD₂₆₀-Wertes bestimmt. Für RNA wird bei einer OD₂₆₀ von 1 mit einer Konzentration von 40 µg/ml gerechnet. Zur Überprüfung der Reinheit einer RNA-Lösung wurde der Quotient aus dem OD₂₆₀-Wert und dem OD₂₈₀-Wert herangezogen. Der Wert sollte bei 2,0 liegen.

2.3.2.5 Auftrennung von RNA per Gelelektrophorese

RNA wurde entweder im denaturierenden 1%-2%igen Formaldehyd-Agarose-Gel oder im denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

Formaldehyd-Agarose-Gele wurden in FA-Gel-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,0) mit 1% Formaldehyd angefertigt. Die Proben wurden nach Mischen mit 1 Volumen Ladepuffer (95% Formamid; 0,025% SDS, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylencyanol, 0,025% Ethidiumbromid, 0,5 M EDTA) 5 min bei 70°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Nach Beladung des Gels wurde die RNA in 1× FA-Gel-Puffer bei 100 V aufgetrennt.

Polyacrylamid-Harnstoff-Gele wurden 1,5 mm dick gegossen und enthielten 4% Polyacrylamid (19:1) sowie 8 M Harnstoff in 1× TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, pH 8,3; 2 mM EDTA). Die Proben wurden mit 1 Volumen Ladepuffer (90% (v/v) Formamid, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 2 mM EDTA, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol) gemischt, 5 min bei 95°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden bei einer angelegten Spannung von 300 V, in vertikaler Orientierung des Gels in der Kammer, aufgetrennt.

Als Größenstandard für RNA dienten Ribo Ruler™ RNA Ladder, High Range (Fermentas) oder Ribo Ruler™ RNA Ladder, Low Range (Fermentas). Die RNA-Marker wurden für Autoradiogramme mit [γ -³²P]ATP in einer Phosphorylierungsreaktion radioaktiv markiert.

Agarose-Gele die mit radioaktiv markierter RNA beladen waren, wurden für die Erstellung eines Autoradiogrammes auf Chromatographiepapier (Ionenaustauschpapier DE81) gelegt und unter Gewichten mit Hilfe eines Stapels aus saugfähigem Papier vorgetrocknet, um dem Reißen des Gels vorzubeugen. Die weitere Trocknung erfolgte unter Vakuum auf einem Uni geldryer 3545 D bei 50°C.

Polyacrylamid-Harnstoff-Gele, die für die Exposition eines *Storage-Phosphor-Screens* vorgesehen waren, wurden auf Chromatographiepapier (3MM Whatman) gelegt und bei 60°C unter Vakuum mittels Uni geldryer 3545 D getrocknet.

2.3.2.6 *in vitro*-Transkription

Zur Synthese von RNA wurden 50 -100 µl Reaktionen wie folgt angesetzt:

Reaktionspuffer (Stratagene)	1×
DTT	10 mM
ATP, GTP, CTP, UTP	1 mM
RiboLock (Fermentas)	1 U/µl
RNA-Polymerase	1,5 U/µl
DNA	500 ng -2 µg

Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf 50 µl bis 100 µl aufgefüllt. Als Matrize wurde vom Plasmid linearisierte, gereinigte DNA (bis zu 2 µg) oder 500 ng gereinigtes PCR-Produkt eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 37°C (T7-RNA-Polymerase, Stratagene) bzw. 40°C (SP6-RNA-Polymerase, Fermentas) bis zu 3 h inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Matrize in einstündiger Inkubation bei 37°C mit bis zu 75 U DNaseI (Roche Diagnostics) und bis zu 37 U DpnI abgebaut. Die Transkripte wurden mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und Ammoniumacetat-Ethanol-Fällung gereinigt.

Zur Gewinnung von Transkripten mit 5'cap-Analog wurde der GTP-Gehalt der oben beschriebenen Reaktion auf 0,2 mM reduziert und 0,8 mM cap-Analog (m⁷GpppG; NEB) zugesetzt.

2.3.2.7 Phosphorylierung von RNA zur 5'-End-Markierung

Zur 5'-End-Markierung von RNA wurde zunächst eine Dephosphorylierung wie für DNA (s.o.) durchgeführt, jedoch wurde zusätzlich RNase-Inhibitor (RiboLock, Fermentas) zugesetzt. Die RNA wurde per Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung aus dem Reaktionsansatz gereinigt.

Dephosphorylierte RNA wurde mit 10 U T4-Polynukleotid-Kinase (Fermentas), Reaktionspuffer des Enzymherstellers, 40 U RNase-Inhibitor (Ribolock, Fermentas) und 2 µl [γ -³²P]-ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Hartmann Analytic) in einem 10-20 µl Reaktionsansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA zur Entfernung freien ATPs per Kit (Nucleospin RNA II, Macherey-Nagel) oder per Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung gereinigt.

2.3.2.8 radioaktive Markierung von RNA per *in vitro*-Transkription

Zur Markierung von RNA, wie z.B. einer Northern Blot-Sonde, wurde eine *in vitro*-Transkription wie oben beschrieben angesetzt. Jedoch wurde die Menge des CTP auf 0,1 M reduziert und 2 µl [α -³²P]-CTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Hartmann Analytic) in einem 20 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Die markierte RNA wurde anschließend per Kit (Nucleospin RNA II, Macherey-Nagel) oder per Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung gereinigt.

2.3.2.9 3'-End Oxidation von Transkripten

Mittels 3'-End Oxidation einer RNA durch Na-Periodat (NaIO_4) können die 3'-OH-Gruppen in Aldehyde umgewandelt werden. Die Veresterung mit weiteren Nukleotiden wird dadurch inhibiert. Für eine solche Reaktion wurden 10 µg einer RNA auf ein Volumen von 140 µl mit ddH₂O eingestellt. Nach der Zugabe von 50 µl 0,1 M NaIO_4 und 10 µl 1 M NaOAc wurde der Ansatz 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte eine Reinigung der RNA per Kit (Nucleospin RNA II, Macherey-Nagel) und gegebenenfalls eine Fällung der RNA, um eine höher konzentrierte Lösung zu erhalten.

2.3.2.10 Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung

Zur Hydrolyse endogener RNAs im Pflanzen-Lysat oder zur Überprüfung der RNase-Resistenz von Viruspartikeln wurden entsprechende Proben mit Mikrokokkus-Nuklease behandelt. Diese Endo-Exo-Nuklease spaltet ssRNA und wird durch Ca-Ionen aktiviert.

Lysat wurde mit 0,5 mM CaCl_2 und 75 U/ml Mikrokokkus-Nuklease (Roche Diagnostics) 15 min bei 20°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden 2 mM EGTA zugesetzt.

Viruspartikel-Suspensionen wurden mit 0,1 U/µl Mikrokokkus-Nuklease versetzt und 15 min bei 20°C inkubiert. Das Enzym wurde dabei durch die Zugabe von bis zu 3,5 mM CaCl_2 aktiviert und durch Zugabe einer äquimolaren Menge an EGTA nach der Reaktionszeit inaktiviert.

Weitere bzw. davon abweichende Bedingungen sind im Ergebnisteil erwähnt.

2.3.2.11 RNase H-Behandlung

Die Endonuklease RNase H hydrolysiert Phosphodiester-Bindungen in RNA-DNA-Hybriden.

15 µl RNA wurden mit 50 pmol Oligonukleotid 3 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde RNase H-Puffer (NEB), 1,3 U/µl RNase-Inhibitor (RiboLock, Fermentas) und 3 U RNase H (Promega) in 10 µl Volumen (ad 10 µl mit ddH₂O) zugegeben und 2 h bei 37°C inkubiert. Ein solcher Ansatz wurde auf ein Volumen von 50 µl mit ddH₂O eingestellt und mit 50 µl Chloroform ausgeschüttelt. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus) wurde die wässrige, obere Phase abgenommen und per Gelelektrophorese analysiert.

2.3.2.12 c-DNA-Synthese

RNA-Mengen in Proben wie z.B. Viruspartikeln oder Pflanzenmaterial wurden mittels reverser Transkription bestimmt. Dazu wurde zuerst eine der RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Durch die Wahl des Oligonucleotids für diese Erststrang-Synthese konnte die RNA-Region bestimmt werden, deren cDNA in einer anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert werden sollte.

RNA-Proben aus Pflanzenmaterial wurden auf die gleiche Konzentration an Gesamt-RNA verdünnt. Für die cDNA-Synthese wurde die RNA in einem Volumen von 12 µl (ad 12 µl mit ddH₂O) mit 15 pmol Oligonucleotid 5 min bei 70°C inkubiert. Für aus Pflanzenmaterial isolierte RNA wurden zusätzlich 15 pmol Oligonukleotid für die cDNA-Synthese von 18S rRNA eingesetzt.

Anschließend wurde ein Reaktionsmix wie unten aufgeführt, zugegeben.

RT-Reaktionsmix:	5 × Reaktionspuffer (Fermentas)	4 µl
	RNase-Inhibitor (RiboLock, Fermentas)	0,5 µl (20 U)
	dNTP-Mix (20 mM je Nukleotid)	1 µl
	RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas)	100 U
	ddH ₂ O	ad 7,5 µl

Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 45°C, dann 10 min bei 70°C inkubiert und schließlich auf 4°C abgekühlt. Dieser reversen Transkription folgte eine PCR bzw. qRT-PCR.

2.3.2.13 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Mittels qRT-PCR wurde die TBSV-Viruspartikel-Menge indirekt über die Menge an viraler RNA bestimmt. Dies war möglich, da stets nur ein TBSV-RNA-Molekül im Viruspartikel vorliegt. Von aus Viruspartikeln isolierter RNA wurde cDNA synthetisiert. 2 µl des cDNA-Reaktionsansatzes wurden wie folgt eingesetzt:

<u>Reaktionsansatz:</u>	<u>PCR-Programm:</u>
5 µl Master Mix (QuantiTect SYBR Green PCR Kit)	1. 15 min 95°C
0,5 µM Primer forward (TVGMQRTP1s)	2. 30 sec 94°C
0,5 µM Primer reverse (TVGMRTP1a)	3. 30 sec 50°C
2 µl H ₂ O	4. 30 sec 72°C
2 µl cDNA	Die Schritte 2 bis 4 wurden in insgesamt 45 Zyklen wiederholt.

Für den Programmablauf wurde ein Roche LightCycler 1.5 genutzt. Die Spezifität der Reaktion wurde stets mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse (50°C bis 95°C; 0,1°C/sec) sichergestellt.

Zur Quantifizierung wurde gTBSV-RNA in Verdünnungsstufen (3 bis 6 log-Stufen) mit bekannter Konzentration als externer Standard mitgeführt. Die für den Standard genutzte RNA wurde aus einer *in vitro*-Transkription gewonnen und vor der cDNA-Synthese zusätzlich mit DNase I (Roche Diagnostics) behandelt (15 min Inkubation bei RT mit 1 U Enzym in DNase I-Puffer des Herstellers, Enzym-Inaktivierung 10 min bei 65°C, anschließend Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung).

Aus dem erhaltenen CP-Wert (*crossing point*), der die Zyklenzahl angibt, bei der das Fluoreszenzsignal über der Hintergrund-Fluoreszenz liegt, wurde die RNA-Konzentration anhand des Standards errechnet. Die Effizienz der PCR-Reaktion wurde anhand des Standards bestimmt und lag zwischen 1,8 und 2, wobei ein Wert von 2 eine Verdopplung der DNA-Menge pro PCR-Zyklus anzeigt.

2.3.2.14 Northern Blot

RNA-Proben wurden auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gel (bis zu 2% Agarose) aufgetrennt. Das Gel wurde zweimal 20 min in ddH₂O und 1 × 20 min in Transferpuffer (0,01 N NaOH, 3 M NaCl) gespült. Zum Transfer auf die Nylon-Membran (Immobilon-NY⁺, Millipore) wurde ein Kapillarblot aufgebaut. Dazu wurde auf ein Transferpuffer-Reservoir eine Glasplatte als Träger für das Gel gelegt. Zwischen Glasplatte und Gel wurde ein Gel-breiter Filterpapierstreifen (Whatman 3MM) gelegt, dessen Enden in das Pufferreservoir ragten. Auf das Gel wurde die in Transferpuffer äquilibrierte Membran gelegt, ein Gel-großes Filterpapier (Whatman 3MM) und ein Stapel saugfähigen Papiers. Der Stapel wurde mit einer Glasplatte bedeckt und mit Gewichten beschwert. Der Blot wurde ca. 10 Stunden in dieser Form belassen, sodass die RNA aufgrund der wirkenden Kapillarkräfte auf die Membran gesaugt wurde. Nach Abbau des Blots wurde die RNA durch 2-minütige Inkubation in einer Mikrowelle bei maximaler Leistung irreversibel an die Membran gebunden. Nach Trocknen der Membran wurde diese in einem Hybridisierungsröhrchen mit 25 ml Church-Puffer 2 h bei 62°C, im Hybridisierungssofen (Hybridization Incubator Fisher Scientific Isotemp) rotierend, inkubiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C und sofortiges Abkühlen auf Eis denaturiert und in das Hybridisierungsröhrchen gegeben. Die Bindung der Sonde an die RNA erfolgte über Nacht bei 62°C. Anschließend wurde die Membran zweimal 2 min mit 0,2× SSC (mit 0,1% SDS) und zweimal 30 min mit 0,1× SSC (mit 0,1% SDS) bei 62°C gewaschen. Die Waschschrte orientierten sich an den per Geigerzähler gemessenen cpm-

Werten, da möglichst wenig unspezifischer Hintergrund, bei guter Signalstärke der erwarteten Banden, angestrebt wurde.

Anschließend wurde ein Autoradiogramm erstellt.

Church-Puffer: 0,25 mM Na-Phosphatpuffer (aus Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 , pH7,2)
1 mM EDTA
1% (w/v) BSA
7% (w/v) SDS

20 × SSC 3 M NaCl
 0,3 M Na-Citrat-2H₂O

2.3.2.15 Auswertung von Autoradiogrammen

Zur Detektion radioaktiv markierter RNA- oder Proteinbanden in Agarose- oder Polyacrylamid-Gelen wurden die auf Filterpapier getrockneten Gele auf einen *Storage Phosphor Screen* (Fuji bzw. Amersham Biosciences) gelegt. Die Expositionsdauer lag zwischen 9 Stunden und mehreren Tagen. Die Screens wurden per *Phosphorimager* (Storm 860 Molecular Imager) gescannt und mit Hilfe der ImageQuant 5.0 Software ausgewertet. Ein Screen wurde vor und nach der Exposition gelöscht (Image Eraser).

2.4 Arbeiten mit Pflanzen, pflanzlicher Zellkultur und Lysat

2.4.1 Präparation zytoplasmatischer Extrakte aus pflanzlicher Suspensionkultur

2.4.1.1 Präparation von BYL und LeL

Die zytoplasmatischen Extrakte wurden aus Suspensionskulturen hergestellt. Dazu wurde zunächst die Zellwand enzymatisch abgebaut. Aus den dadurch gewonnenen Protoplasten wurde die Vakuole durch Zentrifugation in einem Percoll-Gradienten entfernt. Die evakuolisierten Miniprotoplasten wurden zur Gewinnung des Lysates aufgeschlossen und schließlich die Zellkerne abzentrifugiert.

Zur Protoplastierung wurden ca. 200 ml 4-5 Tage alter Suspensionkulturen auf 4 Reaktionsgefäße (50 ml) aufgeteilt und bei 800 rpm ohne Bremse (Hettich Rotina 38R, *swing out*-Rotor) bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in je 25 ml Protoplastierungslösung vorsichtig resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden zunächst vereinigt und anschließend auf zwei 250 ml Erlenmeyerkolben aufgeteilt, um sie 3-4 Stunden bei 70-90 rpm in Dunkelheit bei 27°C zu inkubieren. Der Fortschritt der Protoplastierung war lichtmikroskopisch durch Abrundung der Zellen sichtbar.

Die vollständig protoplastierten Zellen wurden mit Protoplasten-Waschpuffer gewaschen. Dazu wurden die Zellen in 50 ml Reaktionsgefäßen bei 800 rpm (Hettich, Rotina 38R, *swing out*-Rotor) ohne Bremse 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt und das Zellpellet vorsichtig erneut in Protoplasten-Waschpuffer aufgenommen. Nach dreimaligem Waschen der Zellen wurden diese in wenig Protoplasten-Waschpuffer aufgenommen und mit einer Pasteurpipette auf 6 Percoll-Gradienten gegeben. Die Percoll-Gradienten wurden stets frisch wie folgt hergestellt: Aus 3 ml 0%iger Percoll-Lösung und 3 ml 30%iger Percoll-Lösung wurde mittels Gradientenmischer ein 0-30% -Percoll-Gradient im Zentrifugenröhrchen (Beckmann) gemischt. Der Gradient wurde mit 2 ml 40%iger Percoll-Lösung unterschichtet. Diese wurde wiederum mit 2 ml 70%iger Percoll-Lösung unterschichtet.

Die mit Protoplasten beladenen Gradienten wurden 60 min bei 25°C bei $10000 \times g$ im SW40Ti-Rotor ohne Bremse zentrifugiert (Erreichen der vollen Beschleunigung langsam, innerhalb von 2 min). Die evakuolisierten Zellen (Miniprotoplasten) wurden anschließend aus der Interphase zwischen der 40% / 70%-Percoll-Lösungen mit einer Pasteurpipette abgenommen und zweimal in 15 ml-Reaktionsgefäßen mit 10 ml Protoplasten-Waschpuffer gewaschen. Zur Pelletierung der Zellen wurden die Reaktionsgefäße bei $100 \times g$ (Hettich, Rotina 38R, *swing out*-Rotor) für 5 min bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Die Miniprotoplasten wurden anschließend in dem 3,75-fachen Volumen TR-Puffer vorsichtig resuspendiert und in einem vorgekühlten *Dounce Homogenizer (tight fit)* mit 70-100 Stößen auf Eis aufgeschlossen. Schließlich wurden die Zellkerne durch Zentrifugation bei 3000 rpm, 4°C für 10 min (Hettich Mikro 200R) entfernt. Das aus den Überständen vereinigte Lysat (BYL, bzw. AtL, bzw. LeL) wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Protoplasten-Waschpuffer: 12,5 mM NaOAc
5 mM CaCl_2
0,37 M Mannitol
pH 5,8

Protoplastierungslösung: 0,312% Cellulase Onozuka RS
0,1% Pectolyase Y23
in Protoplasten- Waschpuffer,
sterilfiltriert (0,45 μm Membranfilter)

Percoll-Lösung: 0,7 M Mannitol
20 mM MgCl_2
5 mM PIPES-KOH, pH 7,0
mit 30% , 40% , 70% Percoll (Sigma) bzw. ohne Percoll

TR-Puffer:	30 mM HEPES-KOH, pH 7,4
	80 mM KOAc
	1,8 mM Mg(OAc) ₂
	2 mM DTT
	1x Protease-Inhibitor (Roche, <i>complete</i> Mini, EDTA free)

Alle verwendeten Lösungen wurden autoklaviert oder aus autoklavierten bzw. sterilfiltrierten Stamm-Lösungen zusammengesetzt. Percoll wurde ausschließlich steril aus dem Originalgefäß entnommen.

2.4.1.2 Präparation von AtL

Zur Präparation eines zytoplasmatischen Extraktes aus *A. thaliana*-Suspensionskultur wurden insgesamt 120 ml einer 5 Tage alten Suspensionskultur bei 100 × g (Hettich, Rotina 38R, *swing out*-Rotor) abzentrifugiert, das Pellet in insgesamt 90 ml einer 0,24 M CaCl₂-Lösung vorsichtig resuspendiert. Zur Protoplastierung wurden je 15 ml der Zellsuspension mit 15 ml Enzymlösung und weiteren 20 ml 0,24 M CaCl₂-Lösung für etwa 6 Stunden bei RT im Dunkeln unter leichtem Schwenken inkubiert.

Die weiteren Schritte wurden nach dem Protokoll für die BYL-Präparation ausgeführt.

Enzymlösung: 2 mg/ml Macerozym (Serva)
 6,7 mg/ml Cellulase (Serva)
 in 0,24 M CaCl₂
 Die Lösung wurde sterilfiltriert.

2.4.2 *in vitro*-Translation und Luciferase-Assay

Eine Translationsreaktion wurde nach Komoda *et al.*, 2004, optimiert. Ein Ansatz zur Translation von RNA in Lysat setzte sich wie folgt zusammen:

BYL (bzw. AtL oder LeL)	10 µl (40% des Reaktionsvolumens)
4× TR-Puffer	2,8 µl
Creatine Phosphokinase (10 mg/ml)	0,5 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
10× Translationsmix	2,5 µl
RNA	bis zu 4 µg, je nach Versuch
ad 25 µl mit ddH ₂ O	

Der Reaktionsansatz wurde bei 23°C - 25°C für 1 Stunde inkubiert. Für einen gekoppelten Translations-/Replikationsansatz wurde ein solcher Reaktionsansatz verdoppelt.

10× Translationsmix: 7,5 mM ATP
 1 mM GTP
 250 mM Creatin Phosphat
 0,5 mM Aminosäuremix (ggf. ohne Methionin)
 0,8 mM Spermin

Für eine Translationsreaktion zur 5'-End-Markierung von Transkripten wurden je Ansatz 0,8 µl L-[³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml) zugesetzt.

Wurde Luciferase-mRNA zur Translation eingesetzt, konnte der Erfolg der Reaktion mit Hilfe eines Luciferase-Assays überprüft werden. Das translatierte Luciferase-Protein kann Luciferin als Substrat zu Oxyluciferin umsetzen, wobei Biolumineszenz entsteht.

Zur Detektion wurden 2 µl einer Translationsreaktion mit 25 µl Luciferase-Assay-Substrat (Luciferase Assay System, Promega) in einem Assay-Röhrchen gemischt. Die Messung erfolgte unverzüglich im Luminometer (Berthold detection systems) mit einer Messverzögerung von 2 sec (um Falschwerte durch einfallendes Licht zu vermeiden) über einen Zeitraum von 20 sec. Die Messwerte wurden vom Gerät als Relative Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) ausgegeben. Von den Messwerten wurde anschließend jeweils der Messwert für eine Leerprobe (Luciferase-Assay-Reagenz ohne Probe) abgezogen.

2.4.3 gekoppelte *in vitro*-Translations-/ Replikationsreaktion

Für eine gekoppelte Translations-/Replikationsreaktion wurde 10 µl 5× RdRP-Mix mit 40 µl eines Translationsansatzes und RNA-Matrize gemischt. Ein solcher Ansatz wurde, wenn nicht anders angegeben, 3 Stunden, bei 25°C inkubiert. Gegebenenfalls wurden 40 µl eines Translationsansatzes vor Zugabe des RdRP-Mixes auf eine Konzentration von 1,25 mM EDTA eingestellt.

5× RdRP-Mix: je 5 mM ATP, GTP und UTP
 125 µM CTP inklusive 20 µCi [α -³²P]CTP/ 10 µl
 50 mM DTT
 500 µg/ml Actinomycin D
 150 mM Creatin Phosphat
 17 mM Mg(OAc)₂

Nach der Inkubationszeit wurde die RNA aus den Ansätzen mittels Nucleospin RNA II-Kit (Macherey-Nagel) den Herstellerangaben entsprechend isoliert und per Gelelektrophorese und Autoradiogramm analysiert.

2.4.4 Infektion von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen mit viraler RNA bzw. Viruspartikeln

N. benthamiana-Pflanzen wurden im Alter von 4 – 5 Wochen ein bis zwei Tage vor der Inokulation aus dem Gewächshaus in einen Klimaschrank (Percival Pflanzenzuchtkammer) überführt und zur Steigerung der Suszeptibilität (Desvoyes & Scholthof, 2002) dunkel, bei 25°C gehalten.

Die Infektion der Pflanzen erfolgte nach der Methode der *rub inoculation*. Den Blattoberseiten wurden dazu auf einer Fläche von ca. 1 cm² durch Auftupfen von Carborundum (Siliziumcarbid) mechanisch Mikroverletzungen zugeführt. In Inokulationspuffer verdünnte RNA bzw. Viruspartikel wurden mit einer Pipette auf die verletzten Stellen aufgetropft (je 10 µl) und mit einem Glasstab vorsichtig verstrichen. Nach 3 min Inkubation wurde die Lösung mit H₂O abgespült und die Pflanzen bei 25°C und einer Lichtperiode von 14 h gehalten.

Inokulationspuffer (adaptiert nach Desvoyes & Scholthof, 2002): 0,05 M K₂HPO₄
0,05 M Glycin
pH 7,9

2.4.5 Präparation von Viruspartikeln

Viruspartikel wurden aus infizierten Blättern nach Ohki *et al.* (2005) isoliert. Das Blattmaterial wurde dazu im 2-3-fachen Volumen 0,1 M Na-Acetat-Puffer (pH 5,5) mit 0,1% Thioglycolsäure gemörsert. Das suspendierte Material wurde mit 1 Volumen Chloroform versetzt und 20 min vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die Suspension 30 min bei 4°C und 14000 rpm (Hettich Mikro 200R) zentrifugiert. Die Viruspartikel wurden anschließend aus dem wässrigen Überstand 60 min bei 50000 rpm und 4°C im TLA 100.3-Rotor (Beckmann) pelletiert (in 1,5 ml Polyallomer *tubes*). Das Pellet wurde über Nacht auf Eis in 10 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,0 (K₂HPO₄ und KH₂PO₄) gelöst.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde mittels Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Dazu wurde ein Protein-Assay-Kit (Bio-Rad) genutzt. 800 µl in ddH₂O verdünnte Probe wurden mit 200 µl 5 × Bradford-Reagenz 10 min bei RT inkubiert. Anschließend

wurde die Absorption bei 595 nm (Eppendorf Bio photometer) gemessen. Zur Berechnung der Konzentration wurde eine Kalibriergerade mit BSA-Lösungen bekannter Konzentration erstellt.

2.5.2 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) genutzt. Ein SDS-Gel, bestehend aus Trenngel und Sammelgel (s.u.) wurde zwischen zwei vertikalen Glasplatten 1 mm dick gegossen. Zur Beladung des Gels wurden die Proben mit 1 Volumen 2× SDS-Probenpuffer (s.u.) versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt.

Der Lauf des Gels erfolgte in 1× Laemmli-Puffer (s.u.) je nach Gel-Größe bei 35 mA bis 45 mA. Die Laufzeit richtete sich nach der gewünschten Auftrennung, die anhand des Markers (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) abschätzbar war.

Ein Gel wurde anschließend entweder zur Coomassie- oder Silber-Färbung oder für einen Western Blot genutzt.

Mit radioaktiv markierten Proteinen beladene Gele wurden auf Filterpapier gelegt und unter Vakuum mittels Uni geldryer 3545 D bei 60°C getrocknet. Als Marker diente dabei Rainbow [¹⁴C] methylated protein molecular weight marker (Amersham, GE Healthcare) oder [¹⁴C] methylated protein molecular weight marker (Perkin Elmer).

Trenngel	Endkonzentration
4× Trenngelpuffer	1×
Acrylamid/Bisacrylamid (30%; 37,5:1)	8%, 10% oder 12% (v/v)
H ₂ O	ad gewünschtes Gelvolumen
APS 10%	0,01%
TEMED	0,2% (v/v)
Sammelgel	Endkonzentration
4× Sammelgelpuffer	1×
Acrylamid/Bisacrylamid (30%; 37,5:1)	4% (v/v)
H ₂ O	ad gewünschtes Gelvolumen
APS 10%	0,01%
TEMED	0,25% (v/v)

4× Trenngelpuffer: 1,5 M Tris pH 8,8
0,4% SDS

4× Sammelgelpuffer: 250 mM Tris pH 6,8
0,2% SDS

2× SDS-Probenpuffer: 10 mM Tris pH 6,8

20% Glycerin

6% SDS

0,01% Bromphenolblau

frisch dazu: 50 µl β-Mercaptoethanol / 950 µl Pufferaliquot

1× Gelelektrophorese-Laufpuffer: 25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1% SDS

2.5.3 Färbung von Proteinen in SDS-Gelen

Zur Färbung von Proteinen im SDS-Gel wurden das Trenngel mit Coomassie oder Silber gefärbt. Die Silberfärbung ist dabei sensitiver, erlaubt jedoch keine Quantifizierung der aufgetragenen Proteinmenge.

2.5.3.1 Coomassie- Färbung von SDS-Gelen

Die Färbung eines Gels erfolgte für etwa 60 min unter leichtem Schütteln in Coomassie-Lösung (40% (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig, 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250 in ddH₂O). Zur Entfernung des unspezifischen Farbüberschusses wurde das Gel anschließend in Entfärb-Lösung (40% (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig in ddH₂O) für 1 bis mehrere Stunden geschwenkt. Zur Aufbewahrung der Gele für einige Tage wurden entfärbte Gele in 5% Essigsäure gelagert.

2.5.3.2 Silberfärbung von SDS-Gelen

SDS-Polyacrylamid-Gele wurden zunächst für 5 min in Fixierlösung (60 ml Aceton, 1,5 ml TCA (50% (w/v) in ddH₂O), 25 µl 37% ige Formaldehyd-Lösung) geschwenkt. Nach Schwenken des Gels in ddH₂O (3 × 5 sec, 1 × 5 min, 3 × 5 sec) erfolgte zur Vorbehandlung das Schwenken in 60 ml Aceton für 5 min und für 1 min in 60 ml Na₂S₂O₃-Lösung (60 ml H₂O mit 100 µl 20% (w/v) Na₂S₂O₃). Anschließend wurde das Gel in ddH₂O gespült (3 × 5 sec). Zur Imprägnierung wurde das Gel in Silbernitrat-Lösung (60 ml ddH₂O, 0,8 ml AgNO₃ (14%), 600 µl 37% ige Formaldehyd-Lösung) für 8 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Spülen mit ddH₂O (3 × 5 sec) erfolgte die Entwicklung unter Einwirkung alkalischer Formaldehydlösung (60 ml ddH₂O, 1,2 g Na₂CO₃, 25 µl 37% ige Formaldehyd-

Lösung, 25 µl 20% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Die zügige Färbung des Gels wurde durch Austausch der Entwicklerlösung gegen 1% Essigsäure gestoppt.

Silbergefärbte Gele wurden unter Vakuum bei nur 50°C auf Filterpapier getrocknet, um ein Nachdunkeln zu vermeiden.

2.5.4 Western Blot

Zur spezifischen Detektion mit Antikörpern wurden per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine im *semi-dry*-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu wurde das Gel auf die zuvor in Transferpuffer (nach Bjerrum & Schafer-Nielsen, 1986) äquilibrierte Membran gelegt und luftblasenfrei zwischen je zwei Transferpuffer-getränkte Filterpapiere (Whatman 3MM) gelegt. Der Transfer erfolgte bei 0,8 -1 mA pro cm^2 Gel für 1 Stunde.

Für die Inkubation mit His-tag® Antibody HRP Conjugate (Novagen) wurde die Membran nach dem Transfer zunächst 2×10 min bei RT in TBS geschwenkt. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für mindestens 1 h in *blocking*-Lösung (1% Casein, 0,1% (v/v) Tween 20 in TBS) geschwenkt, gefolgt von zwei 10-minütigen Waschschritten in TBST und einer weiteren 10-minütigen Inkubation in TBS. Darauf folgend wurde der TBS-Puffer des letzten Waschschrilles durch Antikörper-Lösung (1:1000 verdünnt in *blocking*-Lösung) ersetzt und 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Antikörper-Inkubation folgten Waschschrille: 2×10 min in TBST und 1×10 min in TBS, jeweils bei RT.

Die Membran konnte nun direkt zur Detektion eingesetzt werden. Dabei entsteht bei der Substratumsetzung durch die Antikörper-gekoppelte *horse radish peroxidase* (HRP) Chemilumineszenz, die zur Schwärzung eines Röntgenfilms führt. Dazu wurden Lösung I (Super Signal West Pico Luminol Enhancer Solution) und Lösung II (Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution) zu gleichen Teilen in Membran-benetzender Menge gemischt und 3 min inkubiert. Die Membran wurde, nach Abtropfen der Lösung, im Dunkeln für 1 bis 10 min auf einem Film (CL-Xposure) exponiert, der Film anschließend entwickelt.

Transferpuffer für <i>semi dry</i> -Blot:	39 mM	Glycin
	48 mM	Tris
	1,3 mM	SDS
	20% (v/v)	Methanol

TBS (Tris <i>buffer saline</i>):	20 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,5 (mit HCl)
TBST (TBS-Tween/Triton):	20 mM Tris 500 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween 20 0,2% (v/v) Triton X-100 pH 7,5 (mit HCl)

Die Detektion mit einem gegen das Maltose-Binde-Protein gerichteten Antikörper (*rabbit IgG*) erfolgte wie oben beschrieben. Die Membran wurde jedoch in TBS mit 0,05% Tween 20 und 5% BSA zum Blockieren unspezifischer Bindestellen inkubiert. Der Inkubation mit dem ersten Antikörper folgte nach 3 kurzen Waschschritten in TBS mit 0,05% Tween die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Anti-*rabbit-IgG*_HRP, GE Healthcare) in 1:10000-Verdünnung in *blocking*-Lösung für 1 h bei RT. Nach drei kurzen Waschschritten in TBS mit 0,05% Tween konnte die Detektion erfolgen.

2.5.5 Testexpression des TBSV-p92 und -p33 in *E. coli*

Einzelkolonien der mit pET_SUMO_p92, pMALp92 bzw. pET_SUMO_p33 transformierten *E. coli*-Stämme (siehe unten, pMALp92: *E. coli*-Stämme BL21-AI, C43(DE3) und CodonPlus(DE3)-RP) wurden in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (40 µg/ml Chloramphenicol für die *E. coli*-Stämme, 50 µg/ml Kanamycin für pET_SUMO_p92 bzw. pET_SUMO_p33 und 100 µg/ml Ampicillin für pMALp92) bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1 bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) angezogen. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von ca 1 standardmäßig mit 1 mM IPTG, die Expression für 4 bis 7 Stunden bei 14°C. Für den *E. coli*-Stamm BL21-AI wurde zusätzlich mit 2% Arabinose induziert. Anhand der Bestimmung der OD₆₀₀ wurden anschließend gleiche Zellmengen pelletiert und die Expression per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des Gels bzw. Western Blot überprüft.

2.5.6 Löslichkeitstest der in *E. coli* exprimierten p92- und p33-Fusionsproteine

Zum Test auf Löslichkeit der exprimierten Fusionsproteine wurden Zellen aus einer Testexpression pelletiert, in 1,5 ml PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) mit 1 mg/ml Lysozym und 1× Protease-Inhibitor (Roche Diagnostics)

resuspendiert. Nach 40-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch 2×20 sec Ultraschall-Behandlung (20 sec, Stufe 2, Ultraschall-Prozessor 200S, Hielscher), mit zwischenzeitlicher Abkühlung auf Eis, aufgeschlossen. Anschließend wurde das Material 20 min bei 4°C und 13000 rpm (Hettich Mikro 200R) zentrifugiert. Die Überstände und Pellets wurden jeweils per SDS-PAGE und gegebenenfalls Western Blot analysiert. Lösliches Protein sollte nach der Zentrifugation im Überstand zu detektieren sein.

2.5.7 Zellaufschluss nach der Fermentation

Für Reinigungsversuche des SUMO_p92 wurden per Fermentation gewonnene Zellen, die bei -40°C gelagert waren, genutzt. Die per Fermentation gewonnenen pET_SUMO_p33-Zellen wurden freundlicherweise von Anika Penzel zur Verfügung gestellt (s.a. Penzel, 2009). Für den zunächst erforderlichen Zellaufschluss wurden Zellen mit etwa 1 Volumen Puffer (50 mM Tris pH 8, 0,1 M NaCl, 1 mM PMSF) versetzt und auf Eis ca. 1 h aufgetaut. Nach Zugabe von Lysozym und einstündiger Inkubation unter Rühren erfolgte der Aufschluss in zwei Durchläufen mittels *french press* (Gaulin Homogenisator, Micron LAB 40) bei einem Druck von maximal 800 bar. Anschließend wurde das Lysat zusätzlich per Ultra-Turrax wenige Minuten auf Eis homogenisiert und 30 min bei 4°C und 35000 rpm (Beckmann L8-60M, Rotor 45Ti) zentrifugiert. Das Pellet wurde bis zur weiteren Nutzung auf Eis gelagert.

2.5.8 Isolierung und Solubilisierung der *inclusion bodies*

Ein aus der Fermentation gewonnenes Protein-Pellet wurde zunächst gewaschen. Dazu wurde das Pellet in der etwa 3-fachen Menge an Na-Phosphat-Puffer (Waschpuffer s.u.) resuspendiert, gegebenenfalls mit Hilfe eines *Dounce-Homogenizers*. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 35000 rpm (Rotor 45 Ti) wurde das dabei entstandene Pellet erneut in Waschpuffer aufgenommen und zentrifugiert.

Zur Solubilisierung der *inclusion bodies* wurde ein Protein-Pellet in Na-Phosphat-Puffer mit 6 M Guanidinhydrochlorid (GdmCl) aufgenommen und unter Rühren bei 10°C resuspendiert.

Waschpuffer: 20 mM Phosphorsäure
0,5 M NaCl
pH 7,4 (Einstellung mit NaOH)
0,2 - 0,5% Triton X-100
10 mM DTT

Solubilisierungspuffer: 20 mM Phosphorsäure
0,5 M NaCl
6 M Guanidinhydrochlorid
pH 7,4 (Einstellung mit NaOH)
0,2% Triton X-100
1 mM DTT

2.5.9 Dialyse von Proteinlösungen – Rückfaltung von Proteinen

Zur Änderung der Pufferbedingungen wurde die Protein-Lösung in einen Dialyseschlauch, der in Dialyse-Puffer äquilibriert wurde, gefüllt. Die Protein-Lösung wurde darin unter leichtem Rühren bei 10°C gegen das mindestens 20-fache Volumen des gewünschten Puffers für mindestens 1 h dialysiert. Der Dialysepuffer wurde mindestens zweimal gewechselt, um den vollständigen Pufferaustausch zu gewährleisten.

Um SUMO_p92 bzw. SUMO_p33 aus dem denaturierten Zustand (in Solubilisierungspuffer) in den möglichst natürlichen Faltungszustand zu überführen, wurde Guanidinhydrochlorid über mehrere Dialyseschritte aus der Präparation entfernt. Dazu wurde die Protein-Lösung mit 6 M GdmCl in Na-Phosphat-Puffer (20 mM Phosphorsäure; 0,5 M NaCl; pH-Einstellung mit NaOH auf 7,4; 0,2 – 0,5% Triton X-100; 1 mM DTT) zunächst mittels Dialyse auf 3 M GdmCl in Na-Phosphat-Puffer eingestellt. Anschließend wurde die Protein-Lösung gegen Na-Phosphat-Puffer ohne GdmCl dialysiert. Die während der Dialyse gebildeten Präzipitate wurden gegebenenfalls durch Zentrifugation abgetrennt.

2.5.10 Streptomycinsulfatfällung von Nukleinsäuren aus Proteinlösungen

Zur Entfernung von Nukleinsäuren aus der Proteinpräparation wurde während der Rückfaltung ein Fällungsschritt eingefügt. Zur Protein-Lösung wurde 1% (w/v) Streptomycinsulfat zugegeben und 20 min bei 10°C gerührt. Anschließend wurde die Lösung für weitere 20 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 4°C und 35000 rpm (Rotor 45Ti) abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen.

2.5.11 Affinitätschromatographie- Reinigung des rekombinanten p92 und p33

Die Expression des SUMO_p92 bzw. SUMO_p33 in Fusion mit einem Hexa-Histidin-tag ermöglichte die Reinigung per Affinitätschromatographie durch Bindung der an der Säulenmatrix chelatierten Ni-Ionen (HisTrap FF crude, 5 ml CV, GE Healthcare). Das

Reinigungsprinzip entspricht einer Metallaffinitäts-Chromatographie (IMAC, *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*).

Die Protein-Lösung wurde dazu in Bindepuffer dialysiert und zur Entfernung jeglicher Präzipitate zentrifugiert (30 min, 4°C, 35000 rpm, Rotor 45 Ti). Die Säule wurde mit Hilfe einer Peristaltik-Pumpe bei 10°C mit mindestens 10 Säulenvolumen Bindepuffer äquilibriert und anschließend mit der Protein-Lösung beladen. Zur Elution des Proteins von der Säule wurde eine FPLC-Anlage (Äkta Purifier) genutzt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-70% des Elutionspuffers mit 4 Säulenvolumen. Anschließend wurde 1 Säulenvolumen des Elutionspuffers zur vollständigen Elution eingesetzt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Das Eluat wurde in 1 ml-Fraktionen gesammelt. Nach Überprüfung der Fraktionen per SDS-PAGE wurden Fraktionen, die hauptsächlich SUMO_p92 bzw. SUMO_p33 enthielten, vereinigt und gegen p33/p92-Na-Phosphatpuffer (20 mM Phosphorsäure; 0,5 M NaCl; pH-Einstellung mit NaOH auf 7,4; 0,2 – 0,5% Triton X-100; 1 mM DTT) dialysiert.

Die Affinitätschromatographie wurde z.T. unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden die solubilisierten *inclusion bodies* in GdmCl-haltigem Puffer vor der endgültigen Rückfaltung auf die Säule geladen. Binde- und Elutionspuffer wurden auf eine der Protein-Lösung entsprechende GdmCl-Konzentration eingestellt. Die Rückfaltung wurde im Anschluss mit vereinigten Fraktionen fortgesetzt.

Nach diesem ersten Reinigungsschritt des SUMO_p92 bzw. SUMO_p33 wurde eine SUMO-Protease-Behandlung des Fusions-Proteins angeschlossen (s. Kapitel 2.5.11). Das daraus hervorgehende p92 bzw. p33 wurde, wenn noch nicht geschehen, in Bindepuffer ohne Imidazol (und 1 mM TCEP statt DTT) dialysiert und per Peristaltik-Pumpe auf eine mit Bindepuffer voräquilibrierte HisTrap FF crude-Säule (5 ml CV, GE Healthcare) geladen. Das p92 bzw. p33 wurde mit dem Durchfluss aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung aliquotiert und nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Bindepuffer: 20 mM Phosphorsäure
0,5 M NaCl
30 mM – 50 mM Imidazol
pH 7,4 (Einstellung mit NaOH)
0,2% Triton X-100
1 mM DTT,
entgast und auf 10°C gekühlt

Elutionspuffer: 20 mM Phosphorsäure
0,5 M NaCl
500 mM Imidazol
pH 7,4 (Einstellung mit NaOH)
0,2% Triton X-100
1 mM DTT,
entgast und auf 10°C gekühlt

2.5.12 SUMO-Protease-Behandlung des SUMO_p92 und SUMO_p33

Zur Gewinnung des p92 bzw. p33 aus dem Fusionsprotein wurden geeignete Fraktionen der ersten Affinitätschromatographie-Reinigungsstufe vereinigt und mit SUMO-Protease (*Ulp-1*; freundlicherweise von S. Reich, MLU Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt) behandelt. Die SUMO-Protease wurde dazu etwa 1:100 in der SUMO_p92- bzw. SUMO_p33-Präparation verdünnt, für 3 Stunden bei RT oder über Nacht bei 10°C inkubiert. Gebildetes Präzipitat wurde 30 min bei 4°C und 35000 rpm (Rotor 45 Ti) abzentrifugiert. Die SUMO-Protease wurde teilweise direkt mit einem Dialyseschritt verbunden, d.h. mit in den Dialyseschlauch gegeben. Die Vollständigkeit der p92-Spaltung aus dem Fusionsprotein wurde per SDS-PAGE überprüft.

2.5.13 *in vitro*-Polymerase-Assay mit rekombinatem p92

Die enzymatische Aktivität der rekombinanten TBSV-RdRP (p92) wurde in einem *in vitro*-assay getestet. Dazu wurde eine 50 µl-Reaktion wie folgt pipettiert.

17 µl TR-Puffer (mit 0,2% Triton X-100)
20 µl p92-Präparation (ca. 1,7 ng/µl)
2 µl 50 mM MnCl₂
8 µl 5 x RdRP-Mix
2 µl [α^{32} P]CTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Hartmann Analytic)
1 µl RNA-*template* (2 µg)

Gegebenenfalls wurden 10 µl p33-Präparation (ca. 5 ng/µl) in TR-Puffer eingesetzt. Die TR-Puffer-Menge wurde entsprechend reduziert.

Ein Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 25°C inkubiert, anschließend gereinigt (Nucleospin RNA II, Macherey-Nagel) und per Gelelektrophorese analysiert.

Der Versuch zur Charakterisierung des Produktes eines *in vitro*-Polymerase-assays wurde von Susann Friedrich durchgeführt. Das Produkt des *in vitro*-Polymerase-assays mit DI(-)-RNA als Matrize wurde dazu, nach der Reinigung aus dem Reaktionsansatz, mit 50 U RNase T1 (Roche Diagnostics) in 52,5 mM NaCl und 5,25 mM Na-Citrat für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach erneuter Reinigung wurde die RNA auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

2.6 Elektronenmikroskopie

Die Detektion der Viruspartikel wurde freundlicherweise von Dr. Gerd Hause und Mitarbeitern ausgeführt. Viruspartikel-Präparationen wurden dazu mit Uranylacetat für ein sogenanntes Negativ-Kontrast-*staining* behandelt oder mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Für das Negativ-Kontrast-*staining* wurden 3 µl einer Probe auf einen Netzträger aus Kupfer (*grid*) getropft. Nach kurzer Einwirkzeit wurde die überschüssige Probe mit Hilfe eines Filterpapierstreifens abgesaugt und 30 sec getrocknet. Zum Waschen der Probe wurde das *grid* mit der beschichteten Seite auf einen Wassertropfen platziert und 1-2 min inkubiert. Dieser Schritt wurde 2 Mal wiederholt. Restliches Wasser wurde mit einem Filterpapierstreifen abgesaugt. Anschließend wurde das *grid* mit der beschichteten Seite auf einen Tropfen 1%iger Uranylacetat-Lösung (in H₂O) gelegt und bis zu 1 min inkubiert. Der Netzträger wurde anschließend 5 min mit der beschichteten Seite nach unten auf einen Tropfen 4%ige Phosphorwolframsäure (in H₂O) gelegt, der Tropfen dann vorsichtig entfernt. Das *grid* wurde mindestens 24 h zum Trocknen aufbewahrt.

Für die Detektion von Viruspartikeln mit Immunogold-markiertem Antikörper wurden 3 µl Probe auf Netzträger aus Nickel mit Formvar-Beschichtung getropft. Nach 3-minütiger Inkubation wurde überschüssige Probe abgesaugt und der Netzträger 20 sec an der Luft getrocknet. Zur Fixierung der Probe wurde das *grid* auf einen Tropfen 2% Paraformaldehyd in PBS gelegt und überschüssige Lösung abgesaugt. Es folgten 3 Waschschrte auf Wassertropfen für je 1 min. Anschließend wurde 30 min in *blocking*-Lösung (PBS mit 1% BSA und 0,1% Tween) inkubiert, dann mit dem 1. Antikörper (polyklonaler Antikörper zum Nachweis von TBSV, DSMZ) in 1:200- bzw. 1:500-Verdünnung in *blocking*-Lösung über Nacht bei 4°C. Nach 4-maligem Waschen für je 5 min in *blocking*-Lösung wurde mit dem 2. Antikörper (Anti-*rabbit*-IgG, gekoppelt mit 10 nm Goldpartikeln, Sigma Aldrich) in 1:100-Verdünnung für 90 min inkubiert. Es folgte 4-maliges Waschen mit H₂O für je 5 min. Daran schloss sich eine Negativ-Kontrast-Färbung mit Uranylacetat an.

Es wurde das Transmissionselektronenmikroskop EM 900 von Carl Zeiss NTS (Oberkochen, Deutschland) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV genutzt. Die Aufnahmen entstanden mit einer Variospeed SSCCD Kamera SM-1k-120 (TRS, Moorenweis, Deutschland).

2.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung eines Replikationsversuches wurde eine einfaktorielle ANOVA (Varianzanalyse), gegebenenfalls mit anschließendem Tukey-Test, durchgeführt. Dazu wurden die Rohdaten (abzüglich der Werte für unspezifischen Hintergrund), bzw. $\log_2$ -transformierte Daten, genutzt.

Die Tests wurden mit dem Programm R, mit freundlicher Hilfe durch Dr. C. Delker, bzw. mit dem unter <http://www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html> (November 2012) verfügbaren Programm durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Präparation von Lysaten aus verschiedenen Plusstrang-RNA-Virus Wirten

Ein vielversprechendes *in vitro*-System für Untersuchungen zur Virus-Replikation konnte für das Plusstrang-RNA-Virus *Tomato mosaic virus* (ToMV) etabliert werden (Komoda *et al.* 2004). Ob ein solches System, bestehend aus einem zellfreien, cytoplasmatischen Extrakt, auch für das Modellvirus TBSV nutzbar war und das Potenzial für weiterreichende Untersuchungen zum viralen „Lebenszyklus“ hat, sollte in dieser Arbeit geklärt werden.

Für die Präparation eines Extraktes aus *Nicotiana tabacum* BY-2-Zellen (BYL) wurde prinzipiell das Protokoll von Komoda *et al.* (2004) befolgt. BY-2-Zellen aus einer Suspensionskultur wurden protoplastiert, die Vakuole durch Zentrifugation im Percoll-Gradienten entfernt und die Zellen anschließend homogenisiert. Schließlich wurden die Zellkerne durch Zentrifugation entfernt (s.a. Material und Methoden). In Abwandlung zur veröffentlichten Präparationsweise wurden auf Empfehlung der japanischen Arbeitsgruppe kleinere Änderungen des Protokolls vorgenommen (persönliche Mitteilung, s.a. Material und Methoden und Tab. 3-1). Komoda *et al.* komplementierten den Extrakt mit Aminosäuren, ATP und GTP, einem ATP-regenerierenden System (Kreatinphosphat und Kreatinkinase) sowie Spermidin, um eine Translation zu ermöglichen. Im Zuge der Etablierung des Protokolls für TBSV wurden sowohl für die Extraktpräparation als auch für Translationsreaktionen Modifikationen vorgenommen. In Tabelle 3-1 sind die Änderungen aufgeführt, mit denen für eigene Versuche die besten Ergebnisse erzielt wurden. Ein Unterschied lag beispielsweise in der verringerten Anzuchttemperatur der BY2-Zellkultur. Die dadurch verminderte Wachstumsrate der Zellen erforderte eine verlängerte Kultivierungszeit der Zellen, die für die Lysatpräparation genutzt wurden.

Tab. 3-1: Optimierungen und Modifikationen des Protokolls für die Präparation des BYL

	Protokoll nach Komoda	modifizierte Bedingungen
Kultivierung der BY2-Zellen	26°C-27°C	23°C
Alter der Zellen für die Protoplastierung	3 Tage	4 Tage
Protoplastierung	Rotator 3rpm, 26-30°C, 1,5 -2 h	Infors Incubator, 90 rpm, 27°C, 2 – 3,5 h
Volumen des Percoll-Gradienten 0-30%	7 ml	6 ml
Zentrifugation zur Evakuolisierung	JS24.15 (Beckmann) 10000 × g	SW40Ti (Beckmann) 10000 × g
Extrakt-Gehalt in Translationsreaktionen	50%	40%

Die Qualität der BYL-Präparationen wurde anhand der Translation einer Luciferase-codierenden mRNA eingeschätzt (Tabelle 3-2 und 3-3). Bei einer guten Qualität wurde eine hohe Translationsrate erwartet, die mittels Luciferase-assay gemessen werden konnte. Die Qualität und die Eigenschaften der hier für die Präparation verwendeten BY-2-Zellkultur waren offensichtlich geeignet, um einen translationsfähigen Extrakt herzustellen. Es zeigte sich, dass eine Verringerung des Extraktgehaltes von 50% auf 40% im Ansatz in der Regel eine höhere Translationsrate bewirkte. Für eine Translationsrate, die mit der von kommerziell erhältlichem Weizenkeimextrakt vergleichbar ist, wurden endogene RNAs durch eine Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung des Extraktes abgebaut (Gursinsky *et al.*, 2009).

Nicotiana tabacum ist für eine große Anzahl von (+)-Strang-RNA-Viren suszeptibel, ist jedoch nicht für alle der davon interessanten Pathogene ein natürlicher Wirt. Nachteilig ist außerdem, dass das Genom dieser Pflanze noch nicht vollständig sequenziert ist, wodurch die Identifizierung von Wirtsfaktoren erschwert ist.

Aus diesem Grund sollte versucht werden, einen Extrakt aus einer Suspensionskultur der gut untersuchten Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zu gewinnen. Bei dieser Lysatpräparation (AtL) wurde weitgehend das Protokoll für die BYL-Präparation befolgt: Fünf Tage alte Suspensionkulturen wurden protoplastiert und zur Entfernung der Vakuole im Percoll-Gradienten zentrifugiert. Die daraus hervorgehenden sogenannten Miniprotoplasten waren, wie auch bei der BYL-Präparation, lichtmikroskopisch nachweisbar. Die Ausbeute war jedoch im Vergleich zu *N. tabacum*-Miniprotoplasten sehr gering. Um die Verwendbarkeit des Extraktes zu ermitteln, wurde die Translationsfähigkeit mit einer *firefly*-Luciferase-codierenden mRNA bestimmt (Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Relative Translationsaktivität der Lysate aus *N. tabacum* BY-2- und *A. thaliana*-Zellkultur

Lysat	Proteingehalt [mg/ml]	relative Luciferase-Aktivität [RLU/s]
<i>Nicotiana tabacum</i> BY-2 (BYL)	7	1559696
<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 (AtL)	0,6	12

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mit der Bradford-Methode ermittelt. Beide Lysate wurden mit Mikrokokkus-Nuklease behandelt. Zur Bestimmung der Translationsaktivität der Lysate wurde Luciferase-mRNA in Reaktionsansätzen mit 50% Extraktanteil unter Translations-Bedingungen inkubiert. In BYL wurde Luciferase von 235 ng mRNA des Konstruktes pLuc_GEMTeasy translatiert. In AtL wurde Luciferase von 250 ng Transkript des Konstruktes pLuc_GEMTeasy translatiert. Die Translationsfähigkeit der Lysate wurde anhand der Luciferase-Aktivität mittels Luciferase-assay-System bestimmt. Die Aktivität ist in relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s), nach Abzug der Hintergrund-Lumineszenz, angegeben. Gezeigt sind exemplarisch die Werte eines Versuches.

Wie Tabelle 3-2 zeigt, war kaum Translation im AtL messbar. Der Proteingehalt war wesentlich geringer als im BYL. Die Translationsaktivität bezogen auf den Proteingehalt blieb im AtL um das mehr als 11000-fache hinter der des BYL zurück. Mehrmalige Versuche der Lysatpräparation aus *A. thaliana*-Zellkultur zeigten stets die gleiche geringe Translationsaktivität.

Neben *Nicotiana tabacum* gehört auch *Lycopersicon esculentum* (*Solanum lycopersicum*) zur Familie der *Solanaceae*. Da *L. esculentum* der originäre Wirt für TBSV ist, wurde die Herstellung eines translationsfähigen Extraktes aus Tomaten-Zellkultur versucht. Die Präparation erfolgte ebenfalls nach dem BYL-Protokoll. Auch hier zeigte der Extrakt jedoch keine nutzbare Translationsaktivität (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Relative Translationsaktivität der Lysate aus *N. tabacum* BY-2- und *Lycopersicon esculentum*-Zellkultur

Lysat	relative Luciferase-Aktivität [RLU/s]
<i>Nicotiana tabacum</i> BY-2 (BYL)	22109
<i>Lycopersicon esculentum</i> (LeL)	209

Beide Lysate wurden mit Mikrokokkus-Nuklease behandelt. Zur Bestimmung der Translationsaktivität der Lysate wurde Luciferase-mRNA in Reaktionsansätzen mit 40% Extraktanteil unter Translations-Bedingungen inkubiert. In BYL und LeL wurde Luciferase von 50 ng mRNA des Konstruktes pSP-*luc*⁺ translatiert. Die Translationsaktivität wurde anhand der Luciferase-Aktivität mittels Luciferase-assay-System bestimmt. Die Aktivität ist in relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) abzüglich der Hintergrund-Lumineszenz angegeben. Angegeben sind exemplarisch die Werte eines Versuches.

Da die Translation in AtL und LeL nur sehr ineffizient war, diese aber eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Replikation ist, wurde lediglich BYL für weitere Versuche genutzt.

3.2 *in vitro*-Translation und -Replikation von TBSV

3.2.1 *in vitro*-Translation – Synthese viraler Proteine in BYL

Für die Synthese der viralen Proteine p33 und p92 des TBSV in BYL wurden zunächst *in vitro*-Transkripte von linearisierter Plasmid-DNA erzeugt. Die RNA wurde in den Extrakt mit für die Translation optimierten Bedingungen eingesetzt. Die Zugabe von [³⁵S]-Methionin ermöglichte die Visualisierung der Translationsprodukte im Autoradiogramm.

Zu Beginn der Arbeit war bereits gezeigt, dass die viralen Komponenten des TBSV-Replikase-Komplexes, p33 und p92, sowohl von der genomischen TBSV-RNA, als auch von einzelnen mRNAs im BYL translatiert werden können. Das Stop-Codon (UAG) im ORF der

p92-mRNA, das zur Bildung des p92 überlesen werden muss, wurde dabei zu einem Tyrosin codierenden Triplet mutiert (Gursinsky *et al.*, 2009 und Abb. 3-1 A und C). Auch für den Wirtsfaktor Hsc70 konnte die Translation einer für das *Arabidopsis thaliana* Hsc70-1 codierenden mRNA gezeigt werden (Penzel, 2009). Abbildung 3-1 A zeigt, dass diese Ergebnisse hier reproduziert werden konnten.

Zudem war es für spätere Experimente von Interesse, das Hüll-Protein (p41) des TBSV synthetisieren zu können. Natürlicherweise wird es von subgenomischer RNA (sgRNA1) translatiert, die während der Replikation entsteht. Um der Abhängigkeit der p41-Synthese von der Bildung der sgRNA1 im BYL vorzubeugen, sollte p41 hier ebenfalls von einer mRNA translatiert werden. Der p41-ORF wurde dazu aus dem cDNA-Klon des TBSV amplifiziert und in den pSP_{luc}⁺-Vektor ligiert, aus dem zuvor das Luciferase-Gen durch Restriktionsenzyme entfernt wurde. Als nicht-virale Kontroll-RNA wurde *firefly*-Luciferase-mRNA im BYL translatiert. Abbildung 3-1 A zeigt, dass alle aufgeführten Proteine mit der jeweils erwarteten Größe von den entsprechenden mRNAs synthetisiert werden konnten.

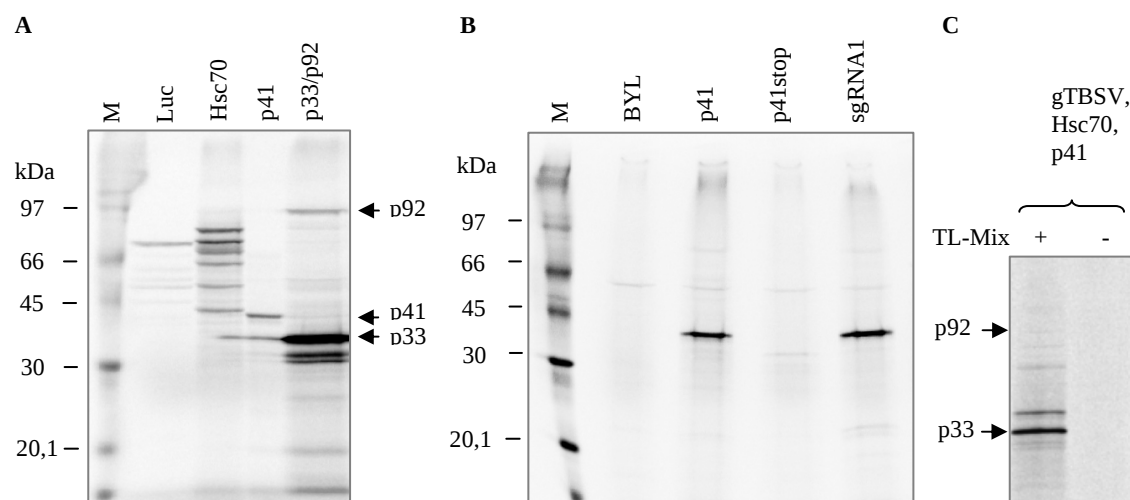


Abb. 3-1: Translation Virus-codierter- und nicht-viraler Proteine im BYL

A: Im Ansatz wurden 500 ng Luciferase-mRNA, Hsc70-mRNA bzw. p41-mRNA translatiert. Von p33 wurden 1897 ng (6,25 pmol) im Gemisch mit 250 ng (0,3 pmol) p92 translatiert.

B: Zur Translation wurden je 1 µg RNA zugegeben, bzw. keine RNA zugesetzt (Spur BYL).

C: 4 µg gTBSVwt-RNA (2,5 pmol), 3 µg Hsc70-mRNA (4,3 pmol) und 750 ng p41-mRNA (1,9 pmol) wurden zu beiden Translationsansätzen zugesetzt. Ein Ansatz enthielt keinen Translations-Mix (TL-Mix).

Die Reaktionen wurden jeweils mit SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Translationsprodukte wurden in einem 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Gezeigt sind jeweils die Autoradiogramme. M = Marker

Die Translation der p33-mRNA resultierte in zusätzlichen Produkten, die als Doppelbande von etwas größerer Laufgeschwindigkeit als das Hauptprodukt im Gel sichtbar waren. Das Hsc70 zeigte ebenfalls stets mehrere Banden. Beides könnte auf interne Initiation oder vorzeitigen Abbruch der Translation oder auch Abbau der Proteine zurückzuführen sein.

Für p41 wurde zusätzlich eine Variante erzeugt, die eine Punktmutation enthielt, mit der ein Stop-Codon im ORF entsteht und somit zu einem verkürzten Translations-Produkt führt. Außerdem wurde ein Plasmid konstruiert, das nach einer *in vitro*-Transkription die p41-codierende sgRNA1 mit der entsprechenden 5'UTR und 3'UTR der natürlichen sgRNA1 aufweisen sollte. Von beiden RNAs entstanden in einer Translationsreaktion die erwarteten Produkte (Abb. 3-1 B).

In Reaktionsansätzen, denen kein Translations-Mix zugefügt wurde, waren keine Translationsprodukte detektierbar (Abb. 3-1 C). Solche Ansätze konnten als Kontrollansätze genutzt werden.

Da das Autoradiogramm eines [35 S]Methionin markierten p33/p92/p41-Translationsansatzes das gleiche Bild zeigte, wenn in dem Ansatz zusätzlich für eine Stunde Replikationsbedingungen eingestellt wurden, konnte eine ausreichend hohe Stabilität der Proteine angenommen werden (Daten nicht gezeigt).

Die p41-mRNA, bzw. als unspezifische Kontrolle *firefly*-Luciferase-mRNA, konnte mit gTBSV im selben Ansatz kotranslatiert werden. Die Auswertung der Bandenintensität des in Abbildung 3-2 gezeigten Autoradiogramms lässt erkennen, dass ein leicht stimulierender Effekt auf die p33- und p92-Translation ausgeübt wurde, wenn weitere RNA im Ansatz kotranslatiert wurde. Ein spezifischer Einfluss des p41 war jedoch nicht festzustellen.

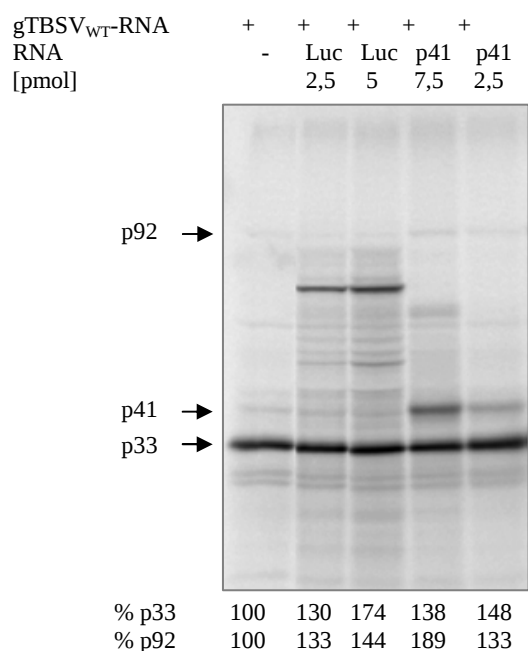


Abb. 3-2: Einfluss der Kotranslation des Hüll-Proteins auf die Translation des p33 und p92 von gTBSV-RNA

In die Translationsreaktion wurden je 2,7 pmol gTBSV-RNA eingesetzt sowie die angegebenen Mengen an mRNAs. Die Translationsreaktion wurde mit SDS-Probenpuffer gestoppt und auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Gezeigt ist das Autoradiogramm. Das Autoradiogramm wurde mittels ImageQuant Software ausgewertet. Die Bandenintensitäten sind relativ zur p33- bzw. p92-Translation ohne weitere mRNA angegeben.

Zur generellen Einschätzung, wie effizient die Translation einer mRNA im BYL war, wurde versucht, die Menge des synthetisierten Proteins per [35 S]-Methionin-Einbau zu

quantifizieren. Dazu wurde zunächst mit Luciferase-mRNA überprüft, ob die Methionin-Konzentration limitierend auf die Translationsrate wirkt. Einem Translationsansatz wurden, dem Protokoll entsprechend, 50 μM jeder Aminosäure zugesetzt. Einem weiteren Ansatz wurden 50 μM der Aminosäuren, jedoch kein Methionin zugesetzt. Zu dem dritten Ansatz wurden keine Aminosäuren zugegeben. Das Diagramm der Abbildung 3-3 zeigt, dass die Translationsaktivität auch ohne den Zusatz von Aminosäuren bei 88 % der Aktivität mit komplettem Aminosäuremix lag. Ohne Methionin-Zusatz lag sie bei knapp 80%. Das heißt, die Translationsaktivität ließ sich durch die Zugabe von Aminosäuren nur um maximal 20% steigern. Dies machte deutlich, dass ein bedeutender Teil des in die synthetisierten Proteine eingebauten Methionins aus dem Lysat stammt. Um dennoch die minimal gebildete Proteinmenge abschätzen zu können, wurden [^{35}S]Methionin-markierte Proteinbanden anhand eines Standards quantifiziert. Um den Standard zu erhalten, wurden vor dem Trocknen des Gels verschiedene Verdünnungen mit bekannter [^{35}S]Methionin-Konzentration auf Whatman-Filterpapier getropft. Aus dem mittels ImageQuant Software ermittelten Schwärzungsgrad wurde eine Eichgerade erstellt. Mit dieser wurde, aus dem Schwärzungsgrad der Proteinbanden, die Menge an detektierbar gebildetem Protein errechnet. Die Anzahl der Methionine in den Proteinen wurde entsprechend berücksichtigt. Die in einem Translationsansatz detektierbare p33-Menge sowie die p41-Mengen lagen im einstelligen fmol-Bereich, bzw. für p92 bei weniger als 1 fmol.

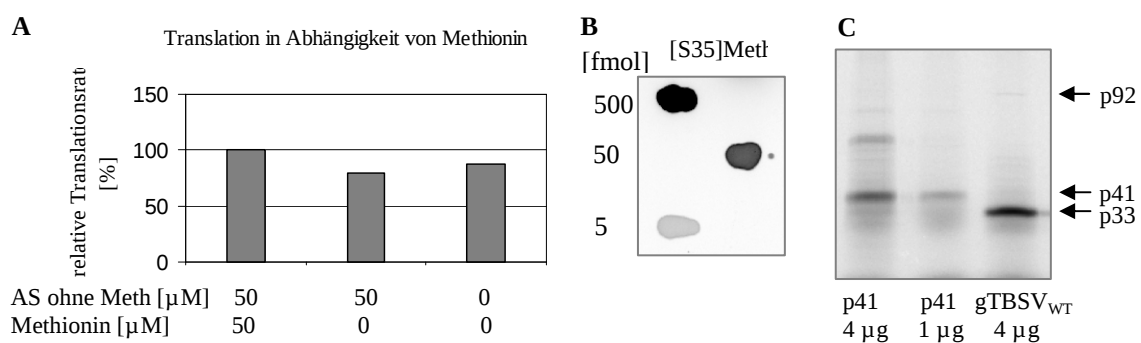


Abb. 3-3: Quantifizierung der im BYL gebildeten Proteinmenge

A: Translation von 1,2 μg (2,2 pmol) Luciferase-mRNA im BYL mit verschiedenen Mengen an Methionin. Die Translationsaktivität wurde mit Hilfe des Luciferase-assay-Systems quantifiziert. Die Ansätze mit verschiedenen Methionin-Mengen sind relativ zum Ansatz mit 50 μM Methionin (100%) dargestellt. **B:** Zur Erstellung einer Eichgerade wurden Verdünnungen bekannter [^{35}S]Methionin-Konzentrationen auf Filterpapier gegeben.

C: Quantifizierung der im BYL gebildeten Proteinmenge mittels [^{35}S]Methionin-Einbau und anhand eines Standards aus 5 – 500 fmol [^{35}S]Methionin. Die Translationsreaktionen mit 4 μg (10 pmol) bzw. 1 μg (2,5 pmol) p41 mRNA bzw. 4 μg (2,5 pmol) TBSV-RNA wurden auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und das gezeigte Autoradiogramm mit der ImageQuant-Software ausgewertet.

Der Versuch wurde für p41 einmal wiederholt und zeigte das gleiche Ergebnis.

3.2.2 Replikation viraler RNA im BYL

Da die Translation viraler Proteine im BYL erfolgreich war, stellte sich nun die Frage, ob im Lysat durch entsprechende Wirtsfaktoren die Voraussetzungen auch für Replikationsaktivität geschaffen sind.

Um die Replikationsaktivität der BYL-Präparationen zu verifizieren, wurde zuerst der TBSV-Verwandte *Turnip crinkle virus* (TCV) untersucht, für das Komoda *et al.* (2004) die Replikation im BYL bereits gezeigt hatten. Die genomische RNA vom TCV-Wildtyp (TCV_{WT}) wurde zunächst unter Translationsbedingungen in BYL inkubiert. Die TCV-RNA mit natürlichem 5'- und 3'-Ende wurde dazu durch *in vitro*-Transkription von *Sma*I linearisierter Plasmid-DNA gewonnen. Nach einer Stunde Inkubation im Extrakt wurden die Reaktionsbedingungen auf die Replikation eingestellt. Dazu wurden dem Translationsansatz Magnesium-Ionen, Nukleotide und Actinomycin D (s.a. Material und Methoden) und erneut TCV-RNA als Matrize zugesetzt. Die Replikation sollte durch den Einbau radioaktiv markierter Nukleotide in neu synthetisierte RNA verfolgt werden.

Abbildung 3-4 zeigt, dass Replikationsprodukte sichtbar waren, deren Größen der genomischen RNA in voller Länge und den subgenomischen RNAs entsprechen. Als Negativ-Kontrolle wurde eine Mutante des TCV als Matrize eingesetzt. Diese enthält eine Punktmutation in der codierenden Sequenz der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP). Der dadurch eingeführte Aminosäureaustausch im GDD-Motiv (zu GDA mutiert) der RdRP resultiert in deren Inaktivität. Abbildung 3-4 zeigt, dass diese Mutante kein radioaktiv markiertes Produkt lieferte und eine unspezifische Markierung im BYL für TCV ausgeschlossen werden konnte.

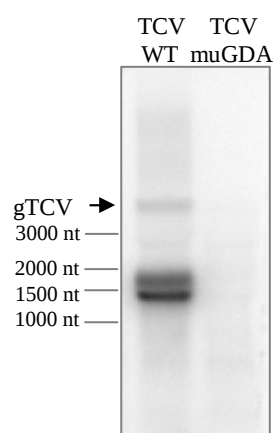


Abb. 3-4: Autoradiogramm einer Translations-/Replikationsreaktion in BYL mit TCV-RNA

2,5 pmol *cap*-TCV-RNA wurden unter Translationsbedingungen im BYL inkubiert. Nach Einstellen der Reaktionsansätze auf Replikationsbedingungen wurden 2,5 pmol *cap*-TCV-RNA zugegeben. Die Synthese der RNA wurde durch Isolierung der Gesamt-RNA gestoppt. Die RNA wurde auf ein denaturierendes 1,5% Agarose-Gel aufgetragen.

Der präparierte BY2-Zellextrakt war sowohl translationsaktiv als auch für TCV replikationsaktiv. Für die weitere Charakterisierung des Extraktes wurde TBSV genutzt.

3.2.2.1 Replikation von TBSV-DI-RNA in BYL

Nachdem die Replikation im Lysat für TCV möglich war und die Translation der TBSV-Proteine p33 und p92 im BYL erfolgreich schien, war die Frage offen, ob die Proteine auch funktionell sind und zusammen mit Wirtsfaktoren einen aktiven Replikase-Komplex *in vitro* bilden können. Als messbarer Indikator dafür sollte die Replikationsaktivität dienen.

Die TBSV-Replikation wurde zunächst mit der *defective interfering*-RNA (DI-RNA) als Matrize versucht. Diese besteht aus Teilstücken der gesamten genomischen TBSV-RNA. Sie codiert keine Proteine, enthält aber die für die Replikation wichtigen RNA-Elemente (siehe Einleitung). Die DI-RNA ist als Untersuchungsobjekt für TBSV etabliert. Wegen der Kürze der RNA wurde eine höhere Stabilität erwartet und eine Replikation schien damit erfolgversprechender. Es war jedoch nicht klar, ob die Strukturelemente der Matrizen-RNA im BYL-Translations-/Replikationssystem „aktiv“ sind.

Diese initialen Fragen konnten durch Dr. Gursinsky geklärt werden. Er ließ p33 und p92 im BYL von mRNAs translatieren. Anschließend wurde der *assay* auf Replikations-Bedingungen eingestellt (s.a. Material und Methoden) und erneut p33 und p92-mRNA zugegeben. Sowohl zur Translation als auch zur Replikation wurde TBSV-DI-RNA als Matrize für den Replikase-Komplex zugesetzt. Das im Autoradiogramm sichtbare Produkt dieser Reaktion hatte die Größe der DI-RNA (Gursinsky *et al.*, 2009 und Abb. 3-5).

Eine RNase H-Behandlung klärte, dass dieses Produkt hauptsächlich RNA mit (+)-Strang-Orientierung war und in seiner vollen Länge markiert wurde, demnach also nicht nur die 3'-End-markierte Matrize war. Es muss somit ein vollständiger Replikationszyklus abgelaufen sein, bei dem über ein (-)-Strang-Intermediat neuer (+)-Strang gebildet wurde (Abb. 3-5). Das (+)/(-) Strang-Verhältnis konnte für die DI-RNA auf 200:1 bestimmt werden. (Gursinsky *et al.*, 2009).

Im Translations-/Replikationssystem mit BYL wurde also ein aktiver Replikase-Komplex gebildet, der beide viralen Replikationsschritte katalysieren kann.

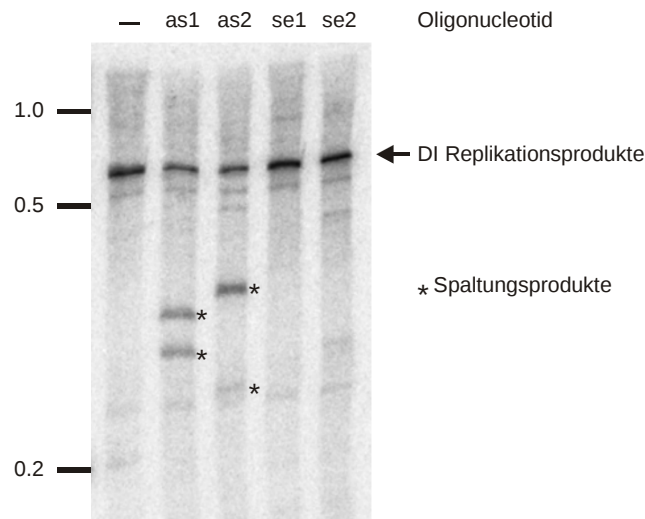


Abb. 3-5: Charakterisierung der DI-RNA Replikationsprodukte

Nach Ablauf der Translations-/Replikationsreaktion wurde die Gesamt-RNA isoliert. (+) bzw. (-)-Strang-bindende Oligonukleotide (as1, as2 bzw. se1, se2) wurden zum *annealing* mit der RNA erhitzt und anschließend mit RNase H inkubiert. Die Entstehung von Spaltprodukten ließ Rückschlüsse auf die (+) bzw. (-)-Strang Orientierung des Replikationsproduktes zu.

(aus Gursinsky *et al.*, 2009)

Da besonders das (-)-Strang-Intermediat in nur geringer Menge gebildet wurde, war es nach den oben erwähnten Experimenten ein dringliches Ziel für eigene Versuche, die Quantität an Replikationsprodukt zu steigern. Dies sollte zum einen durch die Verlängerung der Replikationszeit erreicht werden. Laut Protokoll nach Komoda *et al.* (2004) beträgt die Replikationszeit eine Stunde. Für den in Abbildung 3-6 gezeigten Versuch wurden jeweils gleiche Translations-/Replikationsansätze pipettiert, die dann 0,5 Stunden bis fünf Stunden Reaktionszeit hatten. Die Proteine p33 und p92 wurden durch Translation von der entsprechenden mRNA gewonnen. Die DI-RNA mit authentischem 5'- und 3' Ende wurde per *in vitro* Transkription von *Sma*I linearisierter Plasmid-DNA hergestellt. Je 5 pmol der DI-RNA wurden in die Reaktion eingesetzt.

Schon nach 0,5 Stunden war ein Replikationsprodukt sichtbar, was zeigt, dass die Assemblierung des Replikase-Komplexes schon in der ersten halben Stunde stattgefunden hatte. Bis zum 4-Stunden-Zeitpunkt konnte eine Zunahme an detektierbarem Replikationsprodukt festgestellt werden. Danach verringerte sich die Menge an markiertem Produkt schließlich leicht.

In Abhängigkeit von der Qualität des Lysates war die Replikation jedoch teilweise weniger effizient. Mit Verlängerung der Replikationszeit konnte dann nur geringfügig mehr Replikationsprodukt detektiert werden.

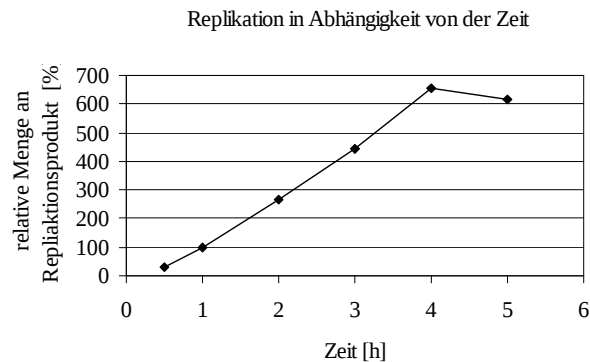


Abb. 3-6: relative Menge an Replikationsprodukt in Abhängigkeit von der Zeit

Die Replikationsreaktion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gestoppt, die Gesamt-RNA isoliert. Die RNA wurde auf einem denaturierenden 4% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und das Autoradiogramm mit der ImageQuant-Software ausgewertet. Im Diagramm sind die erhaltenen Werte relativ zum 1-Stunden-Wert (100%) angegeben. Der Versuch wurde in dieser Form einmal durchgeführt, um einen generellen Eindruck zu gewinnen.

Um die Sättigung des assays mit RNA-Matrize zu überprüfen, wurde ein Translations-/Replikationsversuch mit verschiedenen Quantitäten von DI-RNA unternommen. In dem verwendeten Lysat wurde jedoch mit weiterer Matrizen-RNA nicht mehr Replikationsprodukt gebildet (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass entweder der Replikase-Komplex mit Matrize gesättigt war oder ein anderer Faktor des Ansatzes, z.B. die Membranen oder ein Wirtsfaktor, limitierend war oder sogar mehrere Faktoren die Replikase-Aktivität begrenzten.

Die geringe Replikationsrate in einigen Lysatpräparationen könnte auf die Instabilität der Matrizen-RNA zurückzuführen sein. Die Evakuolisierung der für den Extrakt genutzten Protoplasten sollte zwar die Kontamination mit Nukleasen minimieren, dennoch konnte eine Verunreinigung des Extraktes mit Kation-abhängigen-Nukleasen nicht ausgeschlossen werden. Um den Abbau der RNA durch diese zu verringern, sollte die Konzentration an verfügbaren Kationen gesenkt werden. Dazu wurden vier identische Translationsreaktionen mit p33- und p92-mRNA sowie DI-RNA angesetzt. Mit Zugabe des Replikations-Mixes wurde in zwei der Ansätze eine $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ -Konzentration von 3,55 mM statt der regulären 4,95 mM eingestellt. In je einem der Ansätze wurde zu Beginn der Replikation eine EDTA-Konzentration von 1 mM eingestellt. In der Tat konnte dadurch eine Steigerung der Replikationsprodukte-Menge erreicht werden (Abb. 3-7). Bei Verminderung der $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ -Konzentration im Ansatz auf 3,55 mM stieg die Replikationsrate um das 1,7-fache. Wurde zusätzlich noch EDTA zur Replikation zugesetzt, nahm die Menge an Replikationsprodukt um das knapp 4-fache zu. Die deutlichste Erhöhung der Replikationsprodukt-Menge war in

einem Ansatz mit der regulären $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ -Konzentration von 4,95 mM und dem Zusatz von 1 mM EDTA zu verzeichnen.

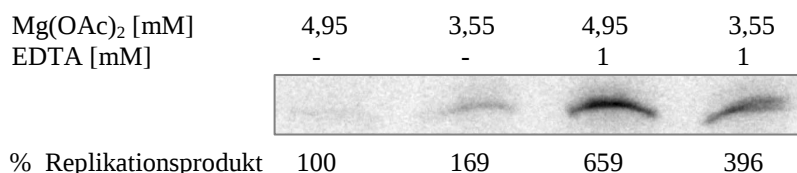


Abb. 3-7: Erhöhung der Replikationsprodukt-Menge durch EDTA

p33 und p92 wurden von mRNAs und mit TBSV-DI-RNA kotranslatiert. Nach der Translation wurden mit dem Replikationsmix entweder 3,4 mM oder 2 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ zugegeben. In der Abbildung ist die resultierende Gesamtkonzentration an Magnesiumionen im Replikationsansatz angegeben. In zwei Ansätzen wurde zu Beginn der Replikation eine Konzentration von 1 mM EDTA eingestellt. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und auf einem denaturierenden 4% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Gezeigt ist der Ausschnitt des Autoradiogramms, der die DI-Replikationsprodukte enthält. Exemplarisch ist einer von drei Versuchen gezeigt.

Die Überprüfung der RNA-Stabilität bestätigte, dass die DI-RNA in Anwesenheit von EDTA in BYL über einen längeren Zeitabschnitt stabil blieb (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.2 Template-Spezifität des TBSV-Replikase-Komplexes in BYL

Für die Nutzung des *in vitro* Translations-/Replikations-assays für genetische Studien an (+)- und (-)-Strang-RNA, für Untersuchungen von RNA-Motiven für die Viruspartikel-Bildung sowie von Wirtsfaktoren, war es entscheidend, zu überprüfen, ob der TBSV-Replikase-Komplex im BYL eine Spezifität bezüglich seiner Matrizen-Wahl zeigt.

Als nicht-replikationsfähige Matrize war die DI-Mutante A (DI_{muA}) bekannt. Die Mutante A enthält eine Punktmutation im sogenannten p33RE in der Region II (RII), die im TBSV-Gesamtgenom in der für p92 codierenden Region liegt. Durch die Punktmutation wird der C·C *mismatch* in ein C-G-Basenpaar geändert. Im Wildtyp ist dieser C·C *mismatch* für die Bindung von p33 entscheidend (Panaviene *et al.*, 2005).

Um die *template*-Spezifität im BYL zu testen, wurde das folgende Experiment mit verschiedenen Matrizen durchgeführt. Die viralen Replikase-Komplex-Komponenten p33 und p92 wurden dafür von mRNAs translatiert. Sowohl in die Translation als auch die Replikation wurde DI-RNA als Replikations-Matrize gegeben. Mit der DI-Wildtyp RNA (DI_{WT}) in Plusstrang-Orientierung war erwartungsgemäß ein Replikationsprodukt im Autoradiogramm sichtbar (Abb. 3-8). Wurde dagegen die DI-Mutante A als *template*

eingesetzt, konnte kein Replikationsprodukt nachgewiesen werden. Auch der DI(-)-Strang wurde als Matrize getestet und lieferte kein Replikationsprodukt (Abb. 3-8).

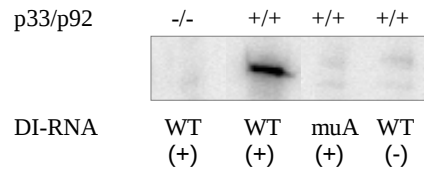


Abb. 3-8: Überprüfung der *template*-Spezifität der Translations-/Replikationsreaktionen im BYL mit der p33RE-Mutante (DImuA) und der DI(-)-RNA

p33 und p92 wurden von mRNAs translatiert. Je 500 ng (2,5 pmol) DI_{WT}(+), DImuA – bzw. DI(-)-RNA wurden in die Replikation eingesetzt. Aus den Replikationsansätzen wurde die Gesamt-RNA isoliert und auf einem denaturierenden 4% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Gezeigt ist der Ausschnitt des Autoradiogramms mit den DI-Replikationsprodukten.

Da die DImuA nicht als Matrize genutzt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die spezifische *template*-Erkennung im BYL tatsächlich über dieses sogenannte p33RE funktioniert. Dessen Sekundärstruktur muss sich dazu im BYL entsprechend ausgebildet haben. Der Replikase-Komplex zeigte damit im *in vitro* Translations-/Replikationssystem eine hohe Spezifität bei der Matrizen-Erkennung.

Bisher ist nicht bekannt, dass der Replikase-Komplex an der DI(-)-Strang-RNA assemblieren kann (Nagy & Pogany, 2000; Panaviene *et al.*, 2004). Um dennoch den DI(-)-Strang bezüglich replikationsregulatorischer Elemente charakterisieren zu können, wurde versucht, eine Replikation zu ermöglichen, indem eine Assemblierungsplattform *in trans* geboten wurde. Dazu diente eine DI(+)-Strang-RNA mit deletierter Region RI (DIΔRI). Diese RNA als *template* ermöglicht die Assemblierung des Replikase-Komplexes (Panaviene *et al.*, 2005) und sollte durch die geringere Größe von dem Replikationsprodukt der DI(-)-RNA im Autoradiogramm unterscheidbar sein. Wie Abbildung 3-9 zeigt, ist ein Produkt der Translations-/Replikationsreaktion mit der DIΔRI-RNA detektierbar, wenn auch nur in geringer Quantität. Die RNA-Strukturelemente waren demnach aktiv, sodass die RNA als Assemblierungsplattform für den Replikase-Komplex geeignet schien.

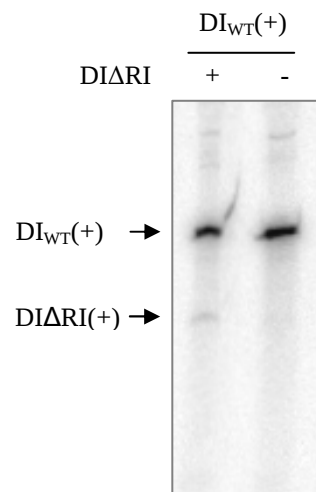


Abb. 3-9: Translations-/Replikationsreaktion mit TBSV-DI-RNA mit deletierter Region I

Translation mit p33, p92 und DIΔRI-RNA bzw. DI_{WT}(+)-RNA. Sowohl für die Translation als auch für die Replikation wurden je 500 ng (3,55 pmol bzw. 2,5 pmol) DI-RNA eingesetzt. Die aus den Ansätzen isolierte Gesamt-RNA wurde auf einem denaturierenden 4% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

Für den nun folgenden Versuch wurde die DIΔRI-RNA zur Translation der p33- und p92-mRNA zugegeben, um den Replikase-Komplex vorassemblieren zu lassen. Erst bei Einstellen der Replikationsbedingungen im *assay* wurde DI(-)-Strang-RNA bzw. DI_{WT}(+)-Strang-RNA zugegeben. Mit der DI_{WT}(+)-Strang-RNA konnte ein Replikationsprodukt nachgewiesen werden. Vom (-)-Strang-*template* aus konnte der RNA-Replikationsprozess nicht initiiert werden (Abb. 3-10).

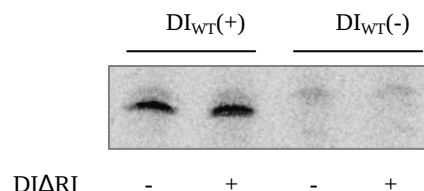


Abb. 3-10: Replikationsversuch der DI(-)-RNA mit der DIΔRI-RNA als potentielle Replikase-assembly-Plattform

Translation mit p33- und p92-mRNA sowie 500 ng (3,55 pmol) DIΔRI-RNA. Replikation mit je 1 µg (5,1 pmol) DI_{WT}(+)- bzw. DI(-)-RNA. Die nach der Replikationsreaktion isolierte Gesamt-RNA wurde auf ein denaturierendes 4% Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Gezeigt ist der Ausschnitt eines repräsentativen Autoradiogramms, der die DI-RNA-Replikationsprodukte enthält. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt, mit gleichem Ergebnis.

3.2.2.3 Die Bedeutung des *replication silencer element* für den TBSV-RNA Replikationsprozess in BYL

Für TBSV wurden zahlreiche Untersuchungen in Protoplasten und in einem zellfreien Hefe-System durchgeführt und damit Elemente der RNA identifiziert, die strukturvermittelt oder sequenzspezifisch einen Einfluss auf die Translation bzw. die Replikation haben. Eine *stem-loop*-Region in der 3'-UTR der (+)-Strang-RNA wurde dabei als *replication silencer element* (RSE) postuliert. Dabei soll der am 3'-Ende der (+)-Strang RNA gelegene Promotor für die

Um die oben erwähnten Ergebnisse neu zu beurteilen und um das Potenzial des Translations-/Replikationssystems mit BYL für die Charakterisierung von RNA-Elementen einschätzen zu können, wurden im Folgenden RSE-Mutanten der DI(+)-RNA untersucht. Abbildung 3-11 gibt eine Übersicht über die im RSE bzw. gPR eingeführten Mutationen. In Mutante B (muB) wurde ein Cytosin des RSE durch ein Guanin ersetzt. In Mutante C (muC) wurde ein Guanin des (-)-Strang-Promotors (gPR) durch Cytosin ersetzt. Mutante D (muD) enthielt die Mutationen B und C kombiniert. Mutante E (muE) enthielt zwei Basenaustausche im gPR: AG wurden hier gegen GA ausgetauscht. Durch die einzelnen Mutationen ist die Ausbildung der RNA-*pseudoknot*-Struktur nicht mehr möglich. In Mutante D sollte die *pseudoknot*-Bildung mit veränderter Sequenz wieder möglich sein, da die beiden mutierten Basen komplementär zueinander sind.



Der doppelseitige Pfeil zeigt die pseudoknot-Bildung des replication silencer element (RSE) mit dem Promotor für die Minusstrang-Synthese (gPR) an. Die komplementären Basen beider Elemente sind blau gekennzeichnet.

65

RNA (Wildtyp bzw. Mutante) zugesetzt. Abbildung 3-12 zeigt das Ergebnis des Versuches. Die DI-Mutanten, die die *pseudoknot*-Bildung einschränken, replizierten auf geringem Niveau (12% bis 14% im Vergleich zur WT-RNA). Die Mutante D, die die Interaktion durch kompensatorische Mutationen ermöglicht, zeigte eine Replikationsrate von 35% der DI_{WT}(+)-RNA.

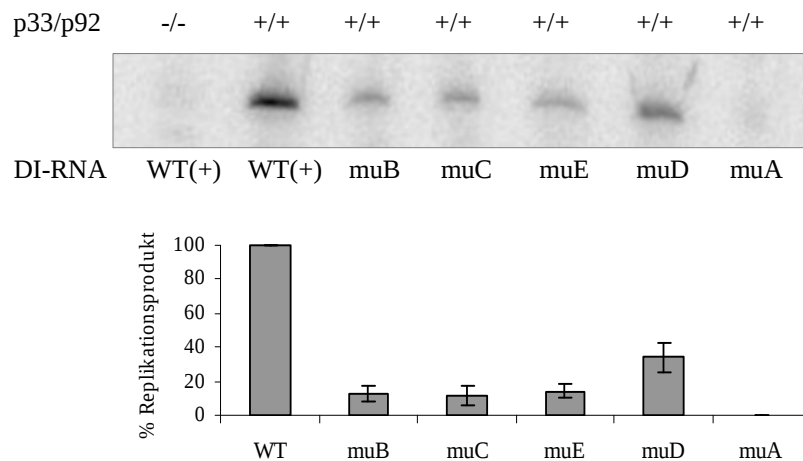


Abb. 3-12: Translations-/Replikationsreaktion mit Mutanten des RSE und gPR

In die Translation und Replikation wurden jeweils 500 ng (2,5 pmol) DI-RNA eingesetzt. Sowohl zur Translation als auch zur Replikation wurden insgesamt 250 ng p92-mRNA und ein 15-facher molarer Überschuss an p33-mRNA gegeben. Dabei wurden 2/3 der Menge in die Translation eingesetzt und 1/3 in die Replikation. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und auf einem denaturierenden 4% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Banden im Autoradiogramm wurden per ImageQuant-Software quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Mittel aus drei unabhängigen Versuchen und die jeweilige Standardabweichung.

Die Identität der Replikationsprodukte wurde mittels RNaseH-Spaltung überprüft. Dazu wurden die entsprechenden Replikationsprodukte dreier Versuche vereinigt und mit einem Oligonucleotid, das an die (+)-Strang-RNA bindet, versetzt. Nach RNaseH-Behandlung entstanden Spaltprodukte der (+)-Strang-RNA in definierter Größe. Abbildung 3-13 zeigt, dass die detektierbaren Replikationsprodukte der DI-Mutanten tatsächlich neu synthetisierte RNA waren und nicht End-markierte Transkripte.

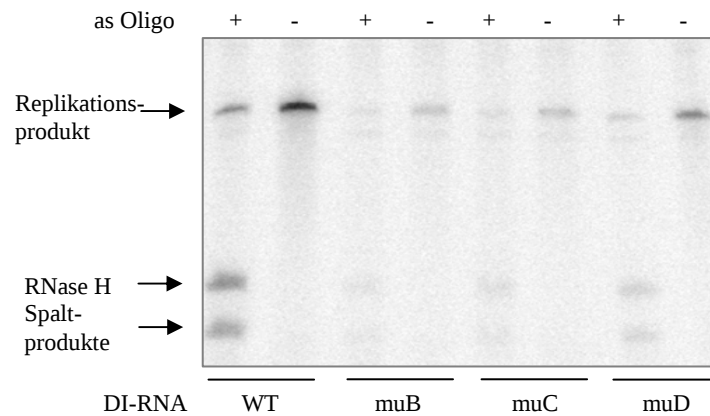


Abb. 3-13: Charakterisierung der Replikationsprodukte der RSE-bzw-gPR-Mutanten

Nach Ablauf der Translations-/Replikationsreaktion wurde die Gesamt-RNA isoliert. (+)-Strang-bindende Oligonucleotide (as Oligo) wurden zum *annealing* mit der RNA erhitzt und anschließend mit RNase H behandelt. Die Spaltprodukte wurden auf einem denaturierenden 4% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Gezeigt ist das Autoradiogramm. Der Versuch wurde einmal wiederholt und zeigte das gleiche Resultat.

Der entstandene (-)-Strang konnte für die DI_{WT}-RNA und die Mutanten B, C und D per qRT-PCR quantifiziert werden (Abb. 3-14). Die Menge an (-)-Strang korrelierte mit der Replikationsrate der Mutanten. Für die Mutante B wurde eine relative Minusstrang-Menge, im Vergleich zum Wildtyp, von 33%, für Mutante C 20% und Mutante D 40% ermittelt (Gursinsky *et al.*, 2009). Eine deutlich erhöhte (-)-Strang-Synthese, wie sie von Pogany *et al.* (2003) gemessen wurde, konnte hier nicht festgestellt werden.

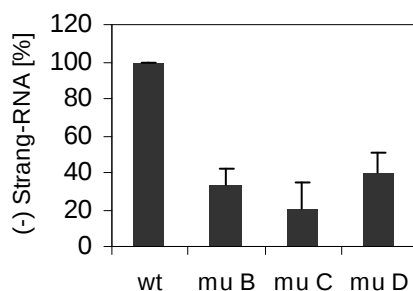


Abb. 3-14: Relative Menge an (-)-Strang-Bildung bei der Replikation der DI-Mutanten

Das Diagramm zeigt das Mittel aus vier unabhängigen qRT-PCR-Versuchen sowie die Standardabweichung. Die Werte für die Mutanten sind relativ zum WT (100%) angegeben. (aus Gursinsky *et al.*, (2009) entnommen)

Um sicherzustellen, dass die gemessenen Effekte nicht auf ungleiche Stabilitäten der mutierten DI-RNAs zurückzuführen waren, wurden die Mutanten B, C und D, sowie die DI_{WT}(+)-RNA mit [³²P] am 5'-Ende markiert und im BYL inkubiert. Nach 30 min, wenn das Replikationsprodukt detektierbar wurde (s.a. Abb. 3-6), war die DI_{WT}-RNA nur geringfügig stabiler als die Mutanten (Abb. 3-15). Die DI_{muD}, die besser replizierte als DI_{muB}, C und E, war ebenso instabil wie diese drei Mutanten. Die ungleichen Replikationsraten waren also nicht durch unterschiedliche RNA-Stabilität zu erklären.

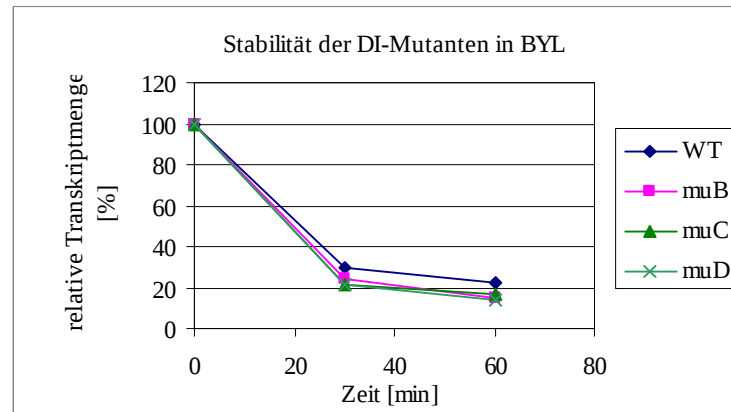


Abb. 3-15: Stabilität der DI-Mutanten im BYL

Zu Beginn (Zeitpunkt Null), nach 30 min und 60 min wurden jeweils Proben der Ansätze genommen, die Gesamt-RNA isoliert und auf einem denaturierenden 4% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die markierten Banden des Autoradiogramms wurden per ImageQuant-Software quantifiziert und die Bandenintensität relativ zum Zeitpunkt Null (100%) berechnet. Der Versuch wurde mit einem größeren Zeitintervall wiederholt und zeigte das gleiche Resultat.

Die Versuche zeigten, dass das *in vitro* Translations-/Replikationssystem ein geeignetes System ist, um genetische Studien an TBSV durchzuführen.

3.2.2.4 TBSV-Translation und Replikation sind nicht funktionell gekoppelt

Um unterscheiden zu können, welche Faktoren Einfluss auf die virale Translation oder Replikation haben, ist es notwendig, dass beide Reaktionen synchronisiert aber zeitlich getrennt voneinander ablaufen. Ob dies mit dem BYL Translations-/Replikationsassay möglich ist, sollte im Folgenden geklärt werden.

Zunächst wurde überprüft, ob die Translation im BYL unterbunden werden kann. Dazu wurden Translationsreaktionen mit p33- und p92-mRNA in Anwesenheit des Translations-Inhibitors Puromycin in Konzentrationen von 0 bis 40 µg/ml durchgeführt. Puromycin ist ein Antibiotikum mit teilweise struktureller Ähnlichkeit zum 3'-Ende aminoacylierter-tRNA. Es wird während der Translation auf die naszierende Peptidkette übertragen, führt dann aber wegen einer nicht-hydrolysierbaren Amid-Bindung zum Kettenabbruch.

Zur Visualisierung der Proteinsynthese mittels Autoradiogramm wurde die Translation der p33- und p92-mRNAs mit [³⁵S]Methionin durchgeführt. Abbildung 3-16 A zeigt, dass die Proteinsynthese schon mit 4 µg/ml Puromycin im Ansatz inhibiert werden konnte.

Die Inhibition der Proteinsynthese wurde zudem mit Luciferase-mRNA überprüft. In Reaktionsansätzen mit 50 ng, 1 µg bzw. 4 µg Luciferase-mRNA wurde eine Puromycin-

Konzentration von 10 µg/ml eingestellt. Auch hier konnte Puromycin die Translationsrate auf unter 0,1% senken (Abb. 3-16 B).

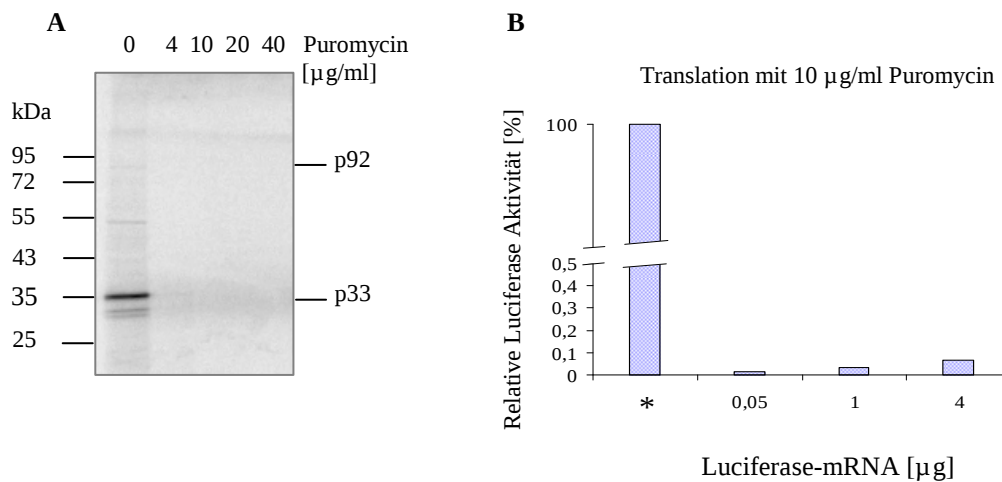


Abb. 3-16: Inhibition der Translation im BYL durch Puromycin

A: Autoradiogramm eines 12% SDS-Polyacrylamid-Gels der Translationsreaktion mit 1,42 µg p33-mRNA und 250 ng p92-mRNA. Puromycin wurde bei Start der Reaktion auf Konzentrationen von 0 – 40 µg/ml eingestellt. Der Versuch wurde zur qualitativen Auswertung ein Mal durchgeführt.

B: Translationsreaktion mit Luciferase-mRNA mit 0 bzw. 10 µg/ml Puromycin im Reaktionsansatz. Der Versuch wurde mit dem Luciferase-Assay-System ausgewertet. Die Angaben sind relativ zur jeweiligen Translationsaktivität ohne Puromycin (100%) angegeben (*). Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Die Möglichkeit, die Translation während der Replikation zu unterbinden, wurde nun in einer gekoppelten Translations-/Replikationsreaktion genutzt. In den im Folgenden beschriebenen Reaktionsansätzen wurden p33- und p92 jeweils von entsprechender mRNA synthetisiert. In einen dieser Reaktionsansätze wurden sowohl zur Translation als auch zur Replikation je 2,5 pmol DI_{WT}(+)-RNA als Matrize gegeben. Diese sollte der Assemblierung des Replikase-Komplexes dienen. Im Vergleich dazu wurden zu zwei Ansätzen je 5 pmol DI_{WT}(+)-RNA nur zur Replikation zugegeben. Einem dieser beiden Ansätze wurde, vor Umstellen der Reaktionsbedingungen auf die Replikation, Puromycin zugegeben. Um von unspezifisch markierten Banden im Hintergrund unterscheiden zu können, wurde als Kontrolle ein Ansatz mitgeführt, dem keine p92-mRNA zur Translation zugesetzt wurde. Wie Abbildung 3-17 zeigt, lieferten die Ansätze, in denen die 5 pmol DI-RNA lediglich zur Replikation zugesetzt wurden, ca. 30% mehr Replikationsprodukt als ein Ansatz, bei dem diese Matrizenmenge auf Translation und Replikation aufgeteilt wurde. Mit Puromycin im Ansatz nahm die Replikationsproduktmenge nur um ca. 10% ab. Die statistische Auswertung der absoluten Werte mittels einfaktorieller Varianzanalyse zeigte, dass die Unterschiede in der Menge an Replikationsprodukt nicht signifikant waren.

Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass während der Synthese von p33 und p92 keine RNA-Matrize als Assemblierungsplattform für den TBSV-Replikase-Komplex benötigt wird. Zudem wird die Replikation durch Puromycin wenig beeinflusst, was auch bedeutet, dass die Replikation keine parallel ablaufende Translation benötigt.

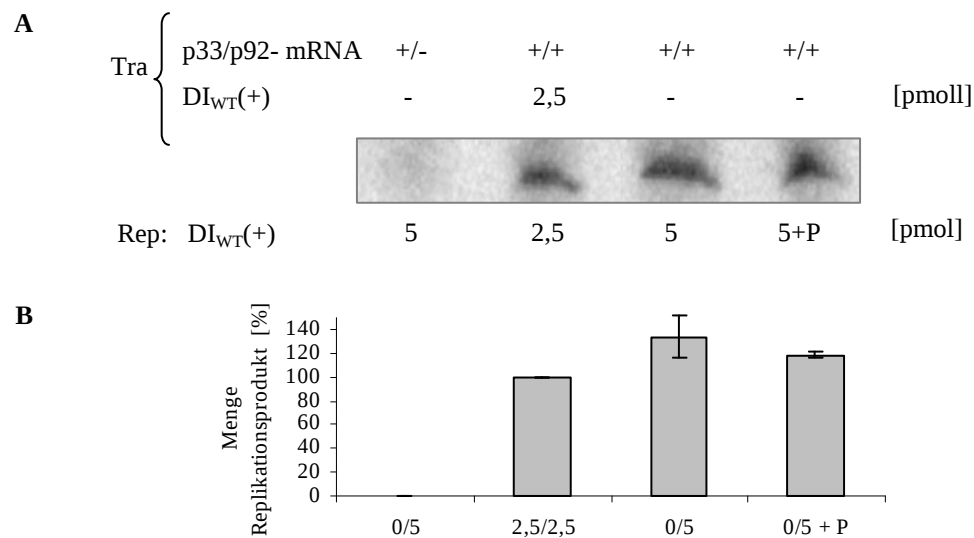


Abb. 3-17: Replikation der TBSV-DI-RNA in Anwesenheit von Puromycin

A: Ausschnitt des Autoradiogramms, der die DI-Replikationsprodukte zeigt. Die DI-RNA-Menge von 5 pmol wurde entweder zu gleichen Teilen auf Translation (Tra) und Replikation (Rep) aufgeteilt oder nur der Replikation zugesetzt. Einer Reaktion wurden 10 µg/ml Puromycin (P) zugesetzt.

B: Die Autoradiogramme von drei unabhängigen Versuchen wurden per ImageQuant-Software ausgewertet. Die Werte sind mit der jeweiligen Standardabweichung relativ zum Ansatz mit je 2,5 pmol DI-RNA in Translation und Replikation angegeben.

3.2.2.5 Replikation von gesamtgenomischer TBSV-RNA in BYL

Da die DI-RNA nur Teilen der TBSV-RNA enthält, ist es denkbar, dass die gesamtgenomische TBSV-RNA (gTBSV), aufgrund ihres möglicherweise veränderten Faltungszustandes und zusätzlicher RNA-Elemente, im BYL andere Replikationseigenschaften aufweist. Die TBSV-RNA sollte folglich in ihrer vollen Länge im BYL zur Replikation eingesetzt werden.

Für eine erste Einschätzung der Replikationsrate wurde die gTBSV_{WT}-RNA parallel zur TBSV-DI_{WT}-RNA repliziert. Um die RNAs als Matrizen vergleichen zu können und gleiche Ausgangsbedingungen zu Beginn der Replikation zu gewährleisten, wurden die Komponenten des Replikase-Komplexes p33 und p92 von den entsprechenden mRNAs translatiert. Als Kontrolle wurde eine gTBSV-RNA mitgeführt, bei der eine Punktmutation einen Basenaustausch im GDD-Motiv der RdRP bewirkt und somit die Polymerase inaktiviert (muGDA). Für diese Matrize wurde lediglich p33-mRNA zur Translation

eingesetzt. Bei Einstellung der Reaktionsbedingungen auf die Replikation wurden je 5 pmol DI-RNA bzw. gTBSV-RNA zugesetzt. Abbildung 3-18 zeigt, dass die gesamtgenomische TBSV-RNA im BYL replizieren konnte. Allerdings wurde weniger Replikationsprodukt als von der DI-RNA-Matrize gebildet. Es stellte sich heraus, dass die Qualität des BYL dabei eine entscheidende Rolle spielte. Die gTBSV-Mutante zeigte kein Replikationsprodukt.

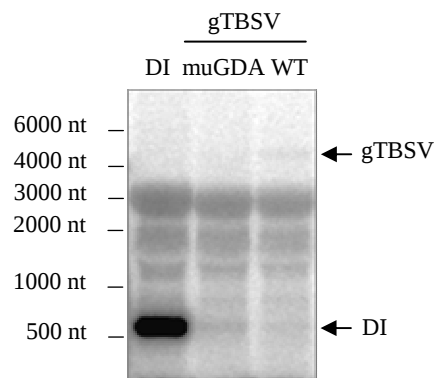


Abb. 3-18: Translations-/Replikationsreaktion mit der TBSV-DI-RNA und gTBSV-RNA

Translationsreaktion mit 1,42 µg (4,6 pmol) p33- und 250 ng (0,3 pmol) p92-mRNA, bzw. ohne p92-mRNA für die muGDA. Replikation mit je 5 pmol DI- bzw. gTBSV-RNA. Aus den Ansätzen wurde nach der Replikation die Gesamt-RNA isoliert und auf einem 2% denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt. Gezeigt ist das Autoradiogramm.

Die gTBSV-RNA wurde bei Inkubation im BYL schneller abgebaut als die DI-RNA (Daten nicht gezeigt). Daher wurde für die gesamtgenomische TBSV-RNA ebenfalls EDTA als stabilisierendes Agens geprüft. Die Stabilität der gTBSV-RNA im BYL konnte durch die Zugabe von EDTA allerdings nicht erhöht werden. Dem entsprechend konnte die Replikationsrate durch EDTA nicht wesentlich gesteigert werden (Daten nicht gezeigt).

Als eine Möglichkeit, die Effizienz der gTBSV-Replikation zu steigern, sollte die Kotranslation eines TBSV-Wirtsfaktors mit der gTBSV-RNA getestet werden. Hsc70 wurde als ein Wirtsfaktor in einem Tombusvirus-Replikase-Komplex identifiziert (Serva & Nagy, 2006) und wurde deshalb als mRNA in einen Translations-/Replikations-Ansatz eingesetzt. Da die Replikase-Komplex-Komponenten p33 und p92 auch von der genomischen RNA translatiert werden konnten (siehe Abb. 3-1 C), wurden zur Synthese dieser Proteine 5 pmol eines *in vitro*-Transkriptes der gesamtgenomischen Wildtyp-RNA bzw. der GDA-Mutante in die Translation gegeben. Die *A. thaliana* Hsc70-1-mRNA wurde in demselben Ansatz wie die gTBSV-RNA translatiert. Um einen unspezifischen Effekt der mRNA auszuschließen, wurde als Kontrolle *firefly*-Luciferase-mRNA mit gTBSV-RNA kotranslatiert. Nach einstündiger Reaktionszeit wurden die Reaktionsbedingungen auf Replikation eingestellt und

erneut 5 pmol gTBSV-RNA zugegeben. Wie der Abbildung 3-19 zu entnehmen ist, erhöhte sich die Menge an Replikationsprodukt für die gTBSV-RNA durch die Kotranslation von Hsc70-mRNA. Aus drei unabhängigen Experimenten wurde als Mittelwert eine Steigerung der Replikationsproduktmenge um das nahezu zweifache, verglichen mit der Kontrolle, ermittelt.

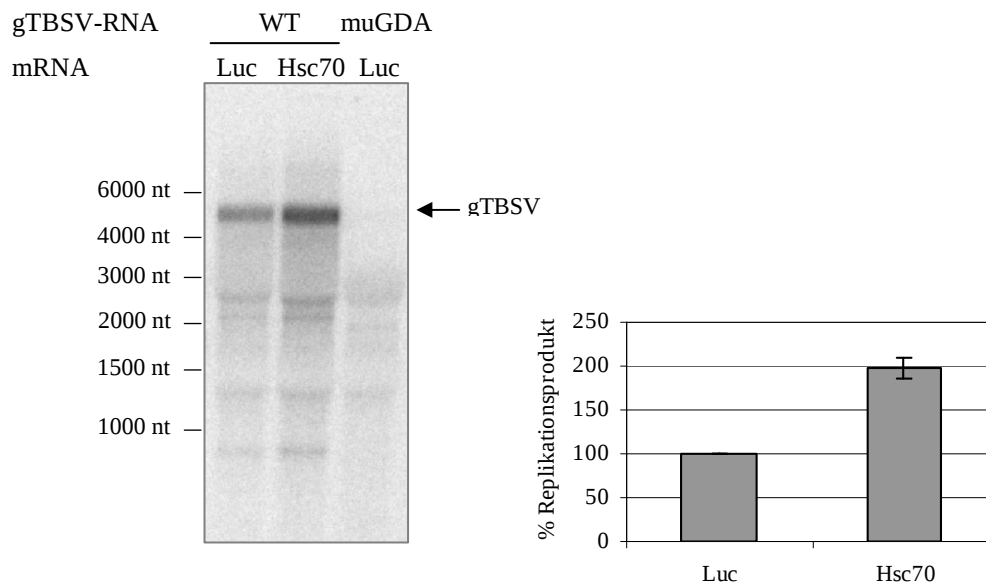


Abb. 3-19: Translations-/Replikationsreaktion mit gTBSV-RNA und kotranslatierter Hsc70-mRNA

Die Translationsreaktion wurde mit 5 pmol gTBSV-RNA sowie 5 pmol Hsc70- bzw. Luciferase-mRNA (Luc) durchgeführt. Zur Replikation wurden erneut 5 pmol gTBSV-RNA zum Reaktionsansatz zugegeben. Nach Ablauf der Replikation wurde die Gesamt-RNA isoliert und auf einem denaturierenden 2% Agarose-Gel aufgetrennt. Gezeigt ist das Autoradiogramm. Die anhand eines markierten gTBSV-Transkriptes und des Markers identifizierte Bande des Replikationsproduktes ist durch einen Pfeil markiert. Das Diagramm rechts zeigt das Mittel der Menge an Replikationsprodukt mit kotranslatierter Hsc70-mRNA relativ zur Kontrolle mit kotranslatierter Luciferase-mRNA aus drei unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung.

Die gTBSVmuGDA zeigte wiederum kein Replikationsprodukt, so dass eine unspezifische Markierung der *input*-RNA ausgeschlossen werden konnte.

Bisherige Replikationsversuche mit TBSV-RNA zeigten keine deutliche Transkription der subgenomischen RNAs. Da unspezifisch markierte Banden als Hintergrund aus dem BYL die Detektion der möglicherweise gebildeten sgRNAs erschwerten, wurde versucht, die sgRNA1 per Northern Blot nachzuweisen. Dafür wurden Translations-/Replikationsreaktionen mit verschiedenen Konzentrationen von gTBSV-RNA ohne [α - 32 P]-CTP durchgeführt. Die parallel durchgeführte Translations-/Replikationsreaktion mit *firefly*-

Luciferase-mRNA sollte eine Differenzierung der viralen RNA von RNAs aus dem BYL ermöglichen.

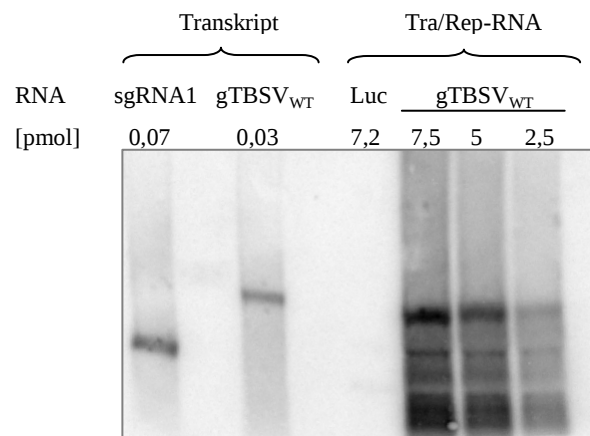


Abb. 3-20: Test auf Bildung subgenomischer TBSV-RNA im BYL mittels Northern Blot

Die isolierte RNA aus Translations-/Replikationsreaktionen (Tra/Rep-RNA) mit 2,5 bis 7,5 pmol gTBSV_{WT}-RNA wurde auf einem denaturierenden 2% Agarose-Gel aufgetrennt, auf Nylon-Membran transferiert und mit einer 600 nt langen RNA-Sonde hybridisiert. Zur Kontrolle wurden 0,07 pmol eines sgRNA1-Transkriptes und 0,03 pmol eines gTBSV-Transkriptes mitgeführt. Gezeigt ist das Autoradiogramm. Der Versuch wurde zwei Mal durchgeführt.

Abbildung 3-20 zeigt, dass die Kontroll-RNAs, ein Transkript der sgRNA1, sowie der gTBSV-RNA von der Sonde detektiert werden konnten. In den Translations-/Replikationsansätzen konnte jedoch keine der detektierten Banden eindeutig als sgRNA1 identifiziert werden. Eine Unterscheidung zwischen Abbauprodukten der gTBSV-RNA und potentieller sgRNA1 war somit aus technischen Gründen nicht möglich.

3.3 Untersuchungen zur Viruspartikel-Assemblierung im *in vitro* Translations-/Replikationssystem

Da die genomische TBSV-RNA im BYL replizieren konnte, stellte sich die Frage, ob auch ein weiterer Schritt des TBSV-„Lebenszyklus“ im *in vitro*-Translations-/Replikationssystem stattfinden kann: die Assemblierung von Viruspartikeln. Es ist weder bekannt, ob die Assemblierung der Viruspartikel Strukturen oder Sequenzen der TBSV-RNA als Startpunkt benötigt, noch inwiefern die Verpackung der viralen RNA mit der simultanen Translation des p41 oder der Replikation funktionell assoziiert ist.

Der Nachweis, ob in dem *in vitro*-Translations-/Replikationssystem Viruspartikel assemblieren, sollte über verschiedene experimentelle Ansätze geführt werden.

Der einfachste Weg schien der direkte Nachweis der Viruspartikel im BYL mittels Elektronenmikroskopie zu sein (Kap. 3.3.1). Als alternative Möglichkeit sollten indirekte

Hinweise für einen Nachweis herangezogen werden. Als ein solcher Hinweis wurde erwartet, dass im Translations-/Replikationssystem vom Hüll-Protein gebundene TBSV-RNA oder in Viruspartikel verpackte RNA besser vor Nukleasen geschützt ist als freie RNA (Kap. 3.3.2). Da das Hüll-Protein wahrscheinlich an der Virus-Verbreitung in der Pflanze über die Leitgewebe beteiligt ist (Qu & Morris, 2002), wurde erwartet, dass Viruspartikel effizienter beim Auslösen einer Infektion sind als die unverpackte RNA und gegebenenfalls zu einer schnelleren systemischen Ausbreitung des Virus in der Pflanze führen. In Kombination mit der Annahme, dass verpackte RNA Nuklease-resistent ist, wurde zudem erwartet, dass Translations-/Replikationsansätze trotz Nuklease-Behandlung eine Infektion auslösen können, sofern die virale RNA *in vitro* in Partikel verpackt wurde (Kap. 3.3.3).

3.3.1 Detektion von Viruspartikeln per Elektronenmikroskopie

Für die folgenden Versuche wurden TBSV-Viruspartikel als Positivkontrolle gewonnen. Dazu wurde gTBSV-RNA, die aus einer *in vitro*-Transkription gewonnen wurde, in ältere Blätter einer *Nicotiana benthamiana*-Pflanze inokuliert. Dies führte zu einer Infektion der Pflanze. Nach fünf Tagen waren an der Infektionsstelle Läsionen sichtbar. Eine systemische Infektion war nach sechs Tagen anhand von chlorotischen und nekrotischen Flecken auf den jüngeren Blättern zu beobachten. 20 Tage nach der Inokulation war die Infektion auch anhand des verringerten Wachstums der Pflanze im Vergleich zu einer Kontrollpflanze (Abb. 3-21 A und B) offensichtlich. Aus den systemisch infizierten Blättern konnten Viruspartikel isoliert werden, die durch die Inkubation mit einem TBSV-spezifischen Antikörper und einem Gold-markierten sekundären Antikörper eindeutig per Elektronenmikroskopie identifiziert wurden. Die Größe der Partikel lag im erwarteten Bereich von 25 -30 nm. Proben aus nicht-infizierten Pflanzen zeigten keine unspezifische Antikörper-Bindung (Daten nicht gezeigt).

Eine Voraussetzung für den Nachweis von Viruspartikel-Assemblierung im *in vitro*-Translations-/Replikationssystem war, dass die Viruspartikel im BYL intakt bleiben. Dies wurde durch einstündige Inkubation von aus infiziertem Blattmaterial gewonnenen Viruspartikeln in 40% BYL mit TR-Puffer getestet. Nach der Reisolierung der Viruspartikel aus dem Ansatz waren die Viruspartikel tatsächlich elektronenmikroskopisch nachweisbar (Abb. 3-21 E). Die Behandlung von Viruspartikeln mit Na-Acetatpuffer diente als Positivkontrolle (Abb. 3-21D).

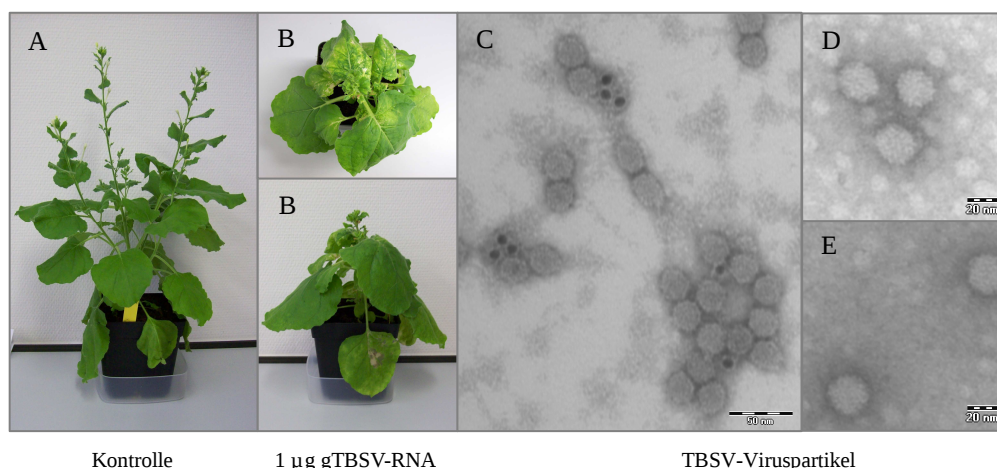


Abb. 3-21: Symptomausprägung in infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen und elektronenmikroskopische Aufnahmen gereinigter Viruspartikel

A und B: *N. benthamiana*-Pflanzen 20 Tage nach der Inokulation mit TBSV

A: Die Kontrollpflanze wurde mit Inokulationspuffer inokuliert. **B:** Eine mit 1 µg (2,5 pmol) gTBSV-Transkript infizierte Pflanze zeigt typische Infektionssymptome. **C:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von TBSV-Viruspartikeln mit Immunogold-Markierung. Der Größenbalken entspricht 50 nm **D:** Viruspartikel, reisoliert aus Na-Acetatpuffer. **E:** Viruspartikel, reisoliert aus BYL. Der Größenbalken in D und E entspricht 20 nm.

Um nun zu testen, ob sich im BYL aus der gTBSV-RNA und dem Hüll-Protein, p41, Viruspartikel assemblieren, wurde p41 von der artifiziellen subgenomischen RNA (sgRNA1) unter Zugabe von gTBSV_{WT}-RNA translatiert. Die gTBSV-RNA wurde in Aliquots im Abstand von 15 min zum Translations-Ansatz zugesetzt. Zur Kontrolle auf die Bildung von *virus like particles* (leere Viruspartikel ohne virale RNA) wurde die sgRNA1 in Abwesenheit von viraler RNA translatiert. Zur mikroskopischen Unterscheidung von Lysatkomponenten wurde eine Leerkontrolle ohne virale RNA mitgeführt. Tabelle 3-4 gibt eine Übersicht über die Versuchsansätze.

Tab. 3-4: Translationsansätze für den elektronenmikroskopischen Nachweis von Viruspartikeln im BYL

Ansatz	B	C	D
p41 (sgRNA1)	14,2 pmol	14,2 pmol	-
gTBSV-RNA	2,5 pmol	-	-

Die sgRNA1 hatte im 50 µl Translationsansatz eine Konzentration von 0,28 µM, die TBSV-RNA 50 nM.

Je fünf solcher Translationsansätze wurden vereinigt, anschließend der Viruspartikel-Isolierungsprozedur unterzogen und elektronenmikroskopisch ausgewertet. Abbildung 3-22 A zeigt, dass TBSV-Viruspartikel der Positivkontrolle per Immunogold-Markierung detektiert werden konnten. In dem Translationsansatz mit p41 und in der BYL-Leerkontrolle wurden keine Strukturen mit dem Antikörper markiert (Abb. 3-22 C bzw. D). Bei

Translation von p41 mit Zugabe von gTBSV-RNA war ebenfalls keine Markierung sichtbar (Abb. 3-22 B). Es musste also davon ausgegangen werden, dass sich unter den gegebenen Bedingungen keine Viruspartikel bilden konnten, bzw. auf diese Weise nicht nachweisbar waren.

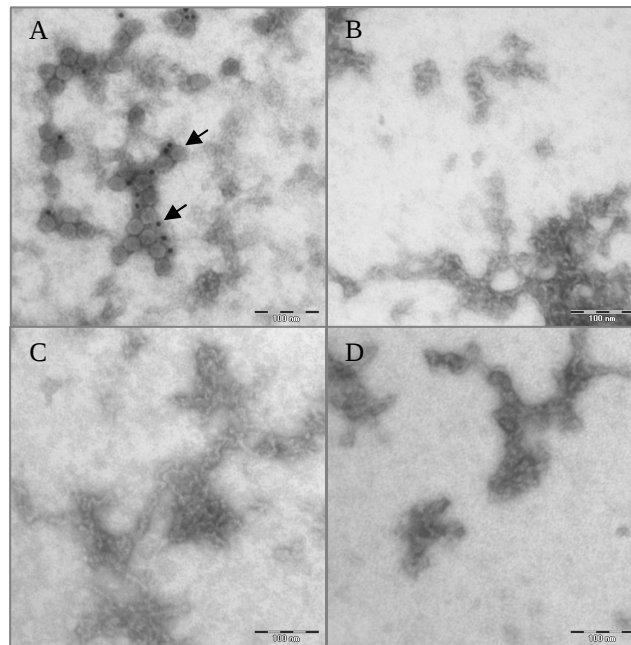


Abb. 3-22: Elektronenmikroskopische Analyse von Translations-Reaktionen zur Viruspartikel-Detektion mittels Immunogold-Markierung

A: aus infizierten Pflanzen isolierte Viruspartikel als Positivkontrolle; Immunogold-markierte Viruspartikel sind beispielhaft mit einem Pfeil gekennzeichnet; **B-D:** aus Translations-Reaktionen isoliertes Material; **B:** Translation von p41 mit Zugabe von gTBSV-RNA, **C:** Translation von p41, **D:** Translation ohne virale RNA. Der Größenbalken entspricht jeweils 100 nm.

3.3.2 Hüll-Protein-vermittelte Nukleaseresistenz der TBSV-RNA - Nachweisversuch per RT-PCR

Da im direkten, elektronenmikroskopischen Nachweis keine Viruspartikel detektiert werden konnten, wurden die alternativen Nachweismethoden überprüft. Dazu musste zunächst die Annahme, dass RNA in Viruspartikeln vor Nukleasen geschützt ist, bestätigt werden. Aus infizierten Pflanzen gewonnene Viruspartikel wurden in BYL mit Mikrokokkus-Nuklease bzw. RNase A/T1 behandelt. Anschließend wurde die RNA aus den Proben isoliert und die virale RNA mittels RT-PCR nachgewiesen (Abb. 3-23). Das Mitführen von 2,5 pmol gTBSV_{WT}-RNA unter gleichen Bedingungen zeigte, dass die Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung die freie RNA abbaute. Die RNA aus Nuklease behandelten Viruspartikel-Proben lieferte dagegen ebenso starke Signale wie die unbehandelte Viruspartikel-Probe.

(Abb. 3-23). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die RNA in den Viruspartikeln vor Nukleasen geschützt ist.

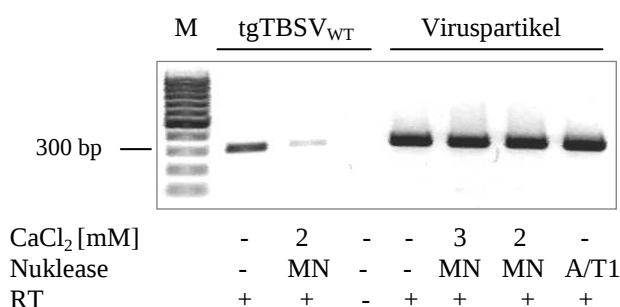


Abb. 3-23: RT-PCR mit Nuklease-behandelten Viruspartikeln und TBSV-Transkripten

Für die Nuklease-Behandlung wurden die TBSV-Viruspartikel bzw. gTBSV_{WT}-Transkript (tgTBSV_{WT}) in TR-Puffer mit 40% BYL gegeben. Die Mikrokoccus-Nuklease (0,07 U/μl) wurde mit 2 bzw. 3 mM CaCl₂ aktiviert. Die RNase A/T1-Behandlung wurde mit 12 ng/μl RNaseA und 0,03 U RNase T1 durchgeführt. Die Nuklease-Ansätze sowie die unbehandelten Kontrollen wurden für 15 Minuten bei 20°C inkubiert und die Reaktion durch EGTA gestoppt. Die Gesamt-RNA wurde aus den Ansätzen isoliert, die virale RNA einer reversen Transkription unterzogen und die cDNA mit 25 Zyklen in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Gezeigt ist das Agarose-Gel der PCR. RT = Reverse Transkriptase, MN = Mikrokoccus-Nuklease, M= Marker

Würde die gTBSV-RNA auch im *in vitro*-System bei Kotranslation mit p41-mRNA geschützt sein, könnte das ein Hinweis auf Viruspartikel-Bildung im BYL sein. Um dies zu überprüfen, wurde gTBSV_{WT}-RNA mit p41-mRNA im BYL kotranslatiert. In Kontrollansätzen wurde die mRNA der p41-Stop-Variante oder keine weitere mRNA kotranslatiert. Damit sollte ein Effekt des p41-Proteins von einem der mRNA unterscheidbar sein. Zehn Minuten vor Beendigung der Reaktion wurde jeweils mit [³²P]CTP durchgängig markiertes gTBSV-Transkript, als weitere verpackungsfähige RNA, zur direkten Detektion zugegeben. Anschließend folgte eine Mikrokoccus-Nuklease-Behandlung zum Abbau unverpackter RNA. Tabelle 3-5 gibt eine Übersicht über die Reaktionsansätze.

Tab. 3-5: Translationsansätze zur Überprüfung der Mikrokoccus-Nuklease-Resistenz von TBSV-RNA bei Kotranslation mit p41-mRNA

Translation	Ansatz	A		B		C	
	gTBSV-RNA [pmol]	2,5		2,5		2,5	
	mRNA [pmol]	-		p41 10		p41stop 10	
	gTBSV-RNA	+		+		+	
	MN	-	+	-	+	-	+

MN = Mikrokoccus-Nuklease-Behandlung, *gTBSV* = radioaktiv-markiertes gTBSV-Transkript

Durch die Zugabe des radioaktiv-markierten gTBSV-Transkriptes ließ sich der Abbau der RNA durch die Mikrokokus-Nuklease direkt aus dem Autoradiogramm ablesen. Wie Abbildung 3-24 zeigt, war kein Unterschied zwischen den Ansätzen mit bzw. ohne p41-Kotranslation festzustellen.

Dieses Ergebnis wurde durch eine RT-PCR-Reaktion derselben Ansätze verifiziert: Die Kotranslation von p41-mRNA hatte keine stabilisierende Wirkung auf die TBSV-RNA (Abb. 3-24). Lediglich eine begrenzte Region schien geschützt zu bleiben, dies aber unabhängig von p41.

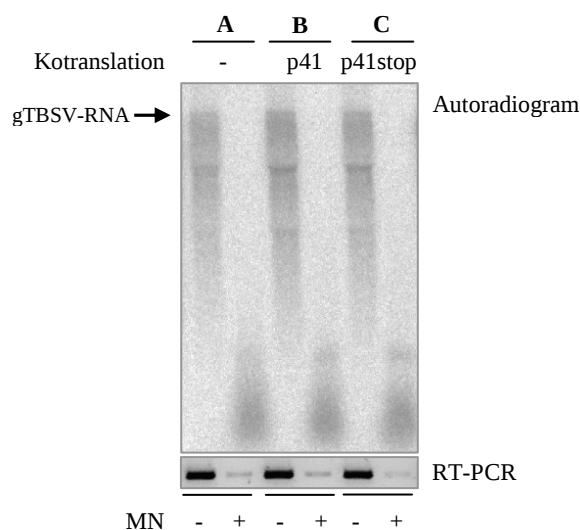


Abb. 3-24: Autoradiogramm und RT-PCR zur Prüfung der Nuklease-Resistenz viraler RNA in Translationsreaktionen

Zur Translationsreaktion mit gTBSV_{WT}-RNA und p41- bzw. p41-stop-mRNA wurden [³²P]-markierte gTBSV-Transkripte für weitere 10 Minuten mit inkubiert. Zur Aktivierung der Mikrokokus-Nuklease (MN; 0,1 U/μl) wurden 2 mM CaCl₂ zugegeben. Die Behandlung erfolgte für 15 Minuten bei 20°C und wurde durch Zugabe von 3 mM EGTA gestoppt. Die RNA wurde anschließend isoliert und auf ein 1,5% denaturierendes Agarose-Gel aufgetragen bzw. nach DNase-Behandlung mittels RT-PCR amplifiziert.

Die Kotranslation von p41-mRNA schützte die gTBSV-RNA nicht vor Nuklease-Abbau und lieferte somit keinen Hinweis auf Viruspartikel-Bildung.

3.3.3 Infektion von *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen als sensibles Testsystem für Viruspartikel

Aus der Kotranslation von TBSV-RNA mit p41-mRNA konnten keine Hinweise auf die Bildung von Viruspartikeln im BYL gewonnen werden. Es bestand jedoch die Möglichkeit, dass der indirekte Nachweis per RT-PCR nicht geeignet und sensitiv genug war, um sehr geringe Mengen an Viruspartikeln nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde in einem letzten

Ansatz versucht, eventuell im *in vitro*-Translations-/Replikationssystem assemblierte Viruspartikel mittels *N. benthamiana*-Infektion nachzuweisen.

Ob Viruspartikel und freie RNA tatsächlich unterschiedlich effizient eine systemische Infektion in Pflanzen auslösen können, sollte der folgende Versuch klären. Aus infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen wurden Viruspartikel gewonnen und in 10er Schritten verdünnt. Mit den Viruspartikel-Verdünnungen wurden *N. benthamiana*-Pflanzen inokuliert. Aus denselben verdünnten Viruspartikel-Suspensionen wurde nach Proteinase K-Behandlung TBSV-RNA isoliert und diese per qRT-PCR quantifiziert (siehe Material und Methoden). Da stets nur ein RNA-Molekül in einem Viruspartikel vorliegt, konnte somit indirekt die Menge an Viruspartikeln bestimmt werden, die zum Infizieren einer Pflanze nötig war.

Für die Inokulation wurden Viruspartikel eingesetzt, die bis in den amol-Bereich verdünnt waren. Die niedrigste ermittelte Viruspartikel-Menge, mit der eine systemische Infektion verursacht werden konnte, entsprach einer RNA-Menge von 117 fg (0,075 amol, Verdünnungsstufe 10^{-6}). Dies entspricht einer Menge von etwa 45000 Viruspartikeln. Abbildung 3-25 zeigt die systemisch infizierten Pflanzen dieser Versuchsreihe. Auch Mikrokokus-Nuklease behandelte Viruspartikel der Verdünnungen von 10^{-3} bis 10^{-5} wurden inokuliert. Die Suspensionen der Verdünnungen 10^{-3} und 10^{-4} konnten eine Infektion hervorrufen (Abb. 3-25).

Im Vergleich dazu waren gTBSV-Transkripte deutlich weniger infektiös. Eine Menge von 500 fg, 1 ng bzw. 10 ng war nicht ausreichend, um eine lokale oder systemische Infektion in der Pflanze auszulösen (Abb. 3-25). Die niedrigste getestete RNA-Menge, mit der eine systemische Infektion verursacht werden konnte, lag bei 100 ng (64 fmol). Viruspartikel konnten demnach in der Tat effizienter eine Infektion auslösen als freie RNA.

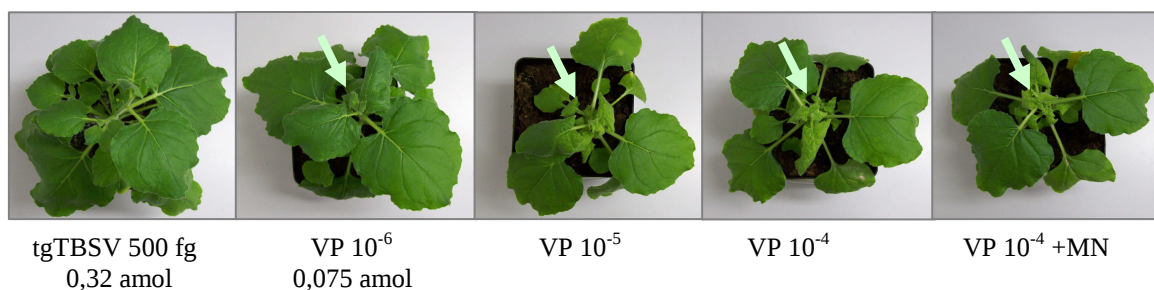


Abb. 3-25: *N. benthamiana*- Pflanzen zehn Tage nach der Inokulierung mit verdünnten Viruspartikel-Suspensionen

Angegeben ist die Menge an Transkript (tgTBSV) mit der inokuliert wurde bzw. die Verdünnungsstufe der Viruspartikel (VP) und die RNA-Menge, die für diese Viruspartikel-Verdünnungsstufe ermittelt wurde. Die Pfeile markieren die systemisch infizierten Blätter mit typischen Symptomen.

MN = Mikrokokus-Nuklease

Abbildung 3-26 gibt nochmals eine Übersicht über die infektiösen Mengen von freier RNA (Transkripten) und Viruspartikeln. Viruspartikel waren mit einer RNA-Menge im fg-Bereich, also im Bereich von weniger als 1 amol, infektiös, *in vitro* Transkripte hingegen erst im ng-Bereich.

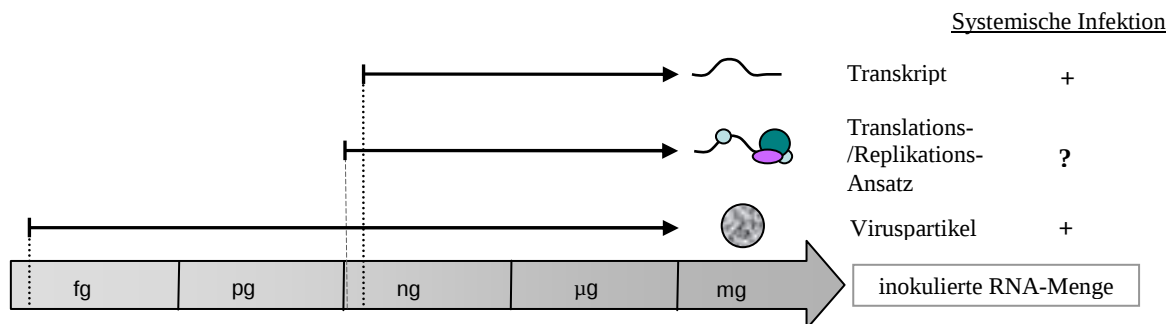


Abb. 3-26: Übersicht über die infektiösen Mengen an Viruspartikeln und Transkript-RNA

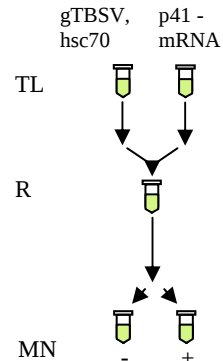
Am grau unterlegten Pfeil sind die inokulierten RNA-Mengen aus Viruspartikeln, aus Translations-/Replikationsansätzen und die Menge an Transkript markiert. Die gepunkteten Linien für das TBSV-Transkript und die Viruspartikel zeigen dabei die infektiösen Mengen an. Die gestrichelte Linie für die Translations-/Replikations-Ansätze zeigt die inokulierte Menge an, deren Infektiosität getestet werden sollte.

Vergleichend ist in der Übersicht (Abb. 3-26) die RNA-Menge aus einer Translations-/Replikationsreaktion, die für eine Inokulation genutzt wurde, aufgeführt. Für Translations-/Replikations-Ansätze konnte per qRT-PCR, im Mittel aus zwei Bestimmungen, eine TBSV-RNA-Menge nach Ablauf der Replikationszeit von 180 ng ermittelt werden. Ein Zehntel davon (18 ng, d.h. 11,5 fmol) sollte für die Inokulation von *N. benthamiana* eingesetzt werden. Für Mikrokokkus-Nuklease behandelte Translations-/Replikations-Ansätze konnte, im Mittel aus zwei Bestimmungen, eine RNA-Menge von 1,3 ng ermittelt werden. Davon sollten 130 pg (0,083 fmol) zur Infektion eingesetzt werden. Diese RNA-Mengen dürften, laut obigem Vergleich, nur eine Infektion verursachen, wenn die RNA im Translations-/Replikations-Ansatz in Viruspartikel verpackt wäre. Ob ein Translations-/Replikationsansatz bei Inokulation in die Pflanze eine Infektion auslösen kann, sollte demnach Aufschluss über die Viruspartikel-Bildung im BYL geben. Ein Translations-/Replikations-Ansatz sollte nach Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung eine Infektion lediglich durch verpackte RNA auslösen können, sogar wenn weniger als 0,1% der RNA in Viruspartikeln vorliegen würde. Zudem war zu erwarten, dass sich die systemische Infektion durch Viruspartikel mit einem zeitlichen Vorsprung im Vergleich zu unverpackter RNA ausbreitet.

Um dies zu prüfen, wurden Translations-/Replikations-Reaktionen, wie in Tabelle 3-6 aufgeführt, angesetzt. Genomische TBSV-RNA wurde mit Hsc70-mRNA kotranslatiert. Die

p41-mRNA wurde getrennt davon im BYL translatiert, bzw. ohne Translationsmix inkubiert. Die Translations-Ansätze wurden erst zu Beginn der Replikation zusammengeführt. Damit war es möglich, die p41-mRNA-Translation gezielt in einem einzelnen Ansatz zu unterbinden und einen Effekt der p41-mRNA, im Vergleich zum Protein, zu beurteilen. Um eine replikationsabhängige Infektion von einer Infektion durch die Matrizen-RNA unterscheiden zu können, wurde in einem Ansatz die Replikation mit Quinacrine inhibiert. Quinacrine verhindert die Bindung von p33 an die TBSV-RNA und ist als Replikations-Inhibitor bekannt (Sasvari *et al.*, 2009). Zudem wurden Kontroll-Ansätze mit [32 P]-CTP mitgeführt, um die Replikation detektieren zu können (Abb. 3-27 B). Nach der Replikationszeit wurde jeweils die Hälfte eines Ansatzes mit Mikrokokkus-Nuklease behandelt. Anschließend wurde je ein Zehntel eines Ansatzes in *N. benthamiana* inokuliert.

Tab. 3-6: Translations-/Replikationsansätze für die Überprüfung der Mikrokokkus-Nuklease-Resistenz von TBSV- RNA bei Kotranslation der p41-mRNA

	Translation	A		B		C		D
	gTBSV-RNA /Hsc70 mRNA [pmol]	2,5 / 4,7		2,5 / 4,7		2,5 / 4,7		2,5 / 4,7
	mRNA [pmol]	-		p41 10		p41 ohne Translation 10		p41 10
	Replikation gTBSV-RNA [pmol]	2,5		2,5		2,5		2,5 + Quinacrine
	MN	-	+	-	+	-	+	-

MN = Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung; TL = Translation; R = Replikation

Als Beleg für die systemische Infektion einer Pflanze wurde an mehreren Tagen nach der Inokulation aus den jeweils jüngsten Blättern RNA isoliert und die TBSV-RNA mittels RT-PCR nachgewiesen (Abb. 3-27 A). Die Mikrokokkus-Nuklease behandelten Proben bewirkten keine Infektion in der Pflanze, es wurde keine TBSV-RNA in den Blattproben nachgewiesen. Dies legt den Schluss nahe, dass keine Viruspartikel in den Translations-/Replikationsansätzen gebildet wurden. Die durch den Kontrollansatz mit Quinacrine hervorgerufene Infektion ließ erkennen, dass die Symptome durch die Matrizen-RNA hervorgerufen wurden. p41 hatte keinen positiven Einfluss auf die Infektiosität, wie die Kontrollen ohne translatiertes p41, im Vergleich zur Translation mit p41, zeigten. Demnach wurden keine Viruspartikel vor der Inokulation der Pflanzen, d.h. im Translations-/Replikations-Ansatz gebildet.

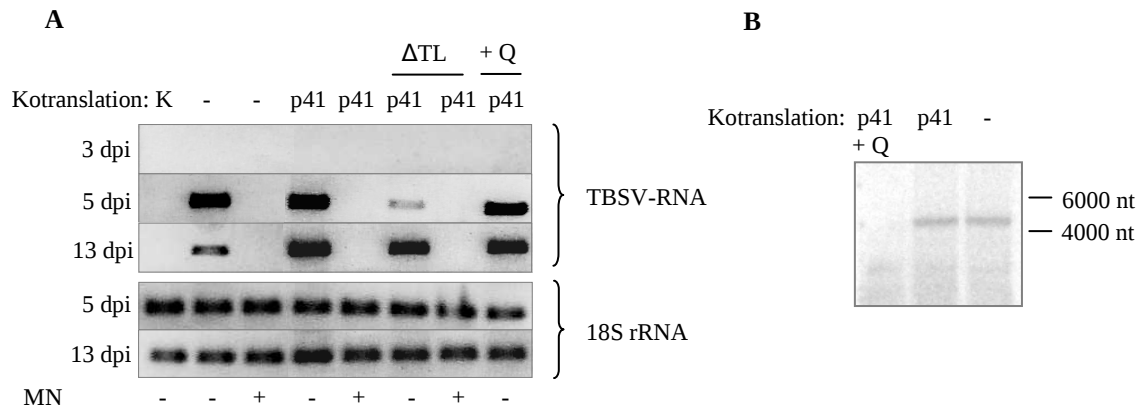


Abb. 3-27: RT-PCR-Nachweis von TBSV-RNA in infizierten Pflanzen (A) und Replikationskontrolle (B)

A: 3, 5 und 13 Tage nach der Inokulation (dpi) wurde RNA aus den jüngsten Blättern isoliert, einer RT-Reaktion unterzogen und die cDNA mit Oligonukleotiden für TBSV bzw. die 18S rRNA in einer PCR mit 15 bzw. 20 Zyklen amplifiziert.

K = Kontrolle, mit Puffer inokulierte Pflanze; ΔTL = Translation durch Auslassen des Translationsmixes unterbunden; MN = Mikrokokus-Nuklease-Behandlung, Q = Quinacrine

B: Kontrolle auf Replikation mit [³²P]-CTP. Nach der Replikation wurde die RNA isoliert und auf ein denaturierendes 1,5% Agarose-Gel aufgetragen. Gezeigt ist das Autoradiogramm.

Q = Quinacrine

Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt und zeigte das gleiche Ergebnis.

Für den Fall, dass die Verpackung der TBSV-RNA einer parallelen Translation von p41-mRNA bedarf, wurde der oben beschriebene Versuch in der Form wiederholt, dass gTBSV-RNA, Hsc70-mRNA und p41-mRNA im gleichen Reaktionsgefäß kotranslatiert wurden. Auch hierbei konnte nicht auf Viruspartikel-Assemblierung im BYL geschlossen werden.

Unter Ausnutzung der größeren Infektiosität der Viruspartikel gegenüber freier RNA wurde ein weiterer Versuch unternommen. Dazu wurden Translations-/Replikationsansätze mit gTBSV-, Hsc70- und p41-mRNA bzw. gTBSV- und Hsc70-mRNA ohne p41 Translation (s.a. Tabelle 3-6, Ansatz B und C) vor der Inokulation soweit mit Inokulationspuffer verdünnt, dass maximal 1 ng TBSV-RNA inokuliert wurde. Die Matrizen-RNA sollte dadurch nur verpackt in Viruspartikeln infektiös sein.

Abbildung 3-28 ist das Ergebnis des Versuches zu entnehmen. Unverdünnte Translations-/Replikationsansätze waren sowohl mit, als auch ohne p41-Translation infektiös (Abb. 3-28 1 und 2). Von den verdünnten Ansätzen war lediglich in einem von drei Wiederholungen ein Ansatz mit p41-Translation infektiös (Abb. 3-28 3). Aus diesem einen Versuch kann jedoch nicht geschlussfolgert werden, dass im *in vitro*-Translations-/Replikationssystem Viruspartikel assemblieren können.

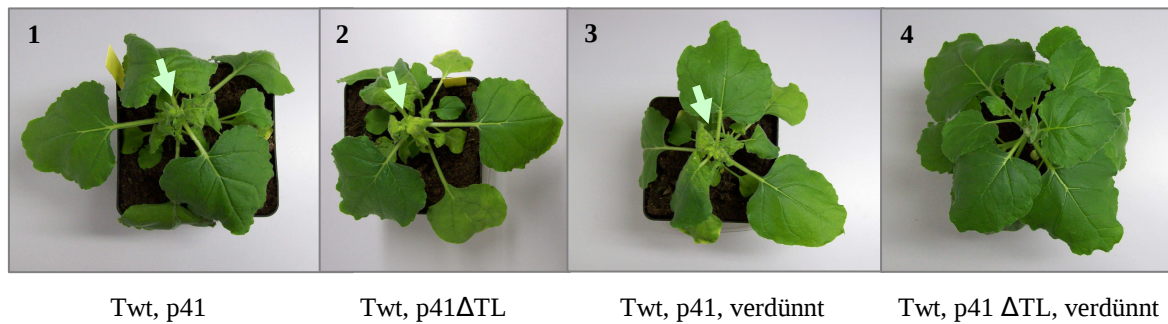


Abb. 3-28: *N. benthamiana*- Pflanzen inokuliert mit verdünnten und unverdünnten Translations-/Replikationsansätzen

Gezeigt sind die Pflanzen zehn Tage nach der Inokulation. Die Pfeile markieren die sichtbaren Symptome an jungen Blättern.

Insgesamt lassen die Versuche nicht auf eine Bildung von Viruspartikeln im *in vitro* Translations-/Replikationssystem schließen.

3.4 Reinigung und *in vitro*-Aktivität des rekombinanten p92

Um gezielt die Rolle einzelner Proteine für die TBSV-Replikation und deren Zusammenwirken mit der viralen RNA und der RNA-abhängigen RNA-Polymerase untersuchen zu können, war es wünschenswert, zusätzlich zum Translations-/Replikations-*assay* mit BYL einen Replikase-*assay* mit definierten Proteinmengen und definierten Konditionen zur Verfügung zu haben. Dazu sollte die RNA-abhängige RNA-Polymerase des TBSV, p92, als rekombinantes Protein in einem *in vitro* Polymerase-*assay* eingesetzt werden. Da p92 im Replikase-Komplex mit p33 interagiert, sollte dieses Protein ebenfalls für den Einsatz in dem *in vitro*-Polymerase-*assay* als rekombinantes Protein gereinigt werden.

Zu Beginn der Arbeit standen die Plasmide pET_SUMO_p92 und pET_SUMO_p33 zur Expression des p92 bzw. p33 als His₆-SUMO-Fusionsprotein (pI 8,98 bzw. pI 8,96) in *E. coli* aus einer Diplomarbeit zur Verfügung (Penzel, 2009). Da die Proteine unter den bisher getesteten Bedingungen nur in geringer Quantität und nicht löslich exprimiert werden konnten, wurden hier weitere Optimierungsversuche zu den Expressionsbedingungen vorgenommen. Auch die Expression des p92 in Fusion mit dem Maltose-Bindeprotein wurde getestet (s.a. Kapitel 2.5.5), war so jedoch ebenfalls nicht löslich zu exprimieren (Daten nicht gezeigt).

Die Expressionsstärke und die Löslichkeit konnten durch die Optimierungsversuche nicht günstig beeinflusst werden. Die Expression des pET_SUMO_p92 im Großansatz (Fermenter) wurde daher bei 16°C mit Induktion durch 1 mM IPTG im *E. coli*-Stamm

BL21-CodonPlus(DE3)-RP durchgeführt. Da das SUMO_p92 nicht löslich exprimiert wurde und in *inclusion bodies* vorlag, konnte ein erster Reinigungseffekt durch Waschschrte nach dem Zellaufschluss erzielt werden.

Die Solubilisierung der SUMO_p92-*inclusion bodies* erfolgte mit Guanidinhydrochlorid (GdmCl) in Na-Phosphatpuffer (20 mM Phosphorsäure, 0,5 M NaCl, pH 7,4 mit NaOH, 1 mM DTT). Die Rückfaltung des SUMO_p92 erfolgte durch Dialyse in Na-Phosphatpuffer ohne Denaturanz über die Zwischenstufe in 3M GdmCl-haltigen Na-Phosphatpuffer. Zudem wurde dabei ein Fällungsschritt mit Streptomycinsulfat vorgenommen, um Nukleinsäuren aus der Präparation zu entfernen. Die Zugabe von 0,2% Triton X-100 zum Na-Phosphatpuffer stellte sich als geeignet heraus, das Protein löslich zu halten. Ohne diesen Zusatz und bei der Verringerung der NaCl-Konzentration von 500 mM auf 100 mM im Na-Phosphatpuffer aggregierte das SUMO_p92 während der Rückfaltung (Daten nicht gezeigt). Die Reinigung erfolgte mittels His-tag des SUMO-Fusionsproteins per Affinitätschromatographie (IMAC, *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*) in dem Triton-haltigen Puffer (siehe Material und Methoden). Abbildung 3-29 A zeigt den Reinigungserfolg per Affinitätschromatographie für SUMO_p92. Mehrere Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit SUMO-Protease versetzt, um p92 (pI 9,35) aus dem Fusionsprotein zu spalten (Abb. 3-29 B). Die Vollständigkeit der Spaltung, d.h. Abtrennung des His₆-SUMO-Anteils, wurde mittels Western Blot mit Anti-His-tag-Antikörper verifiziert (Daten nicht gezeigt).

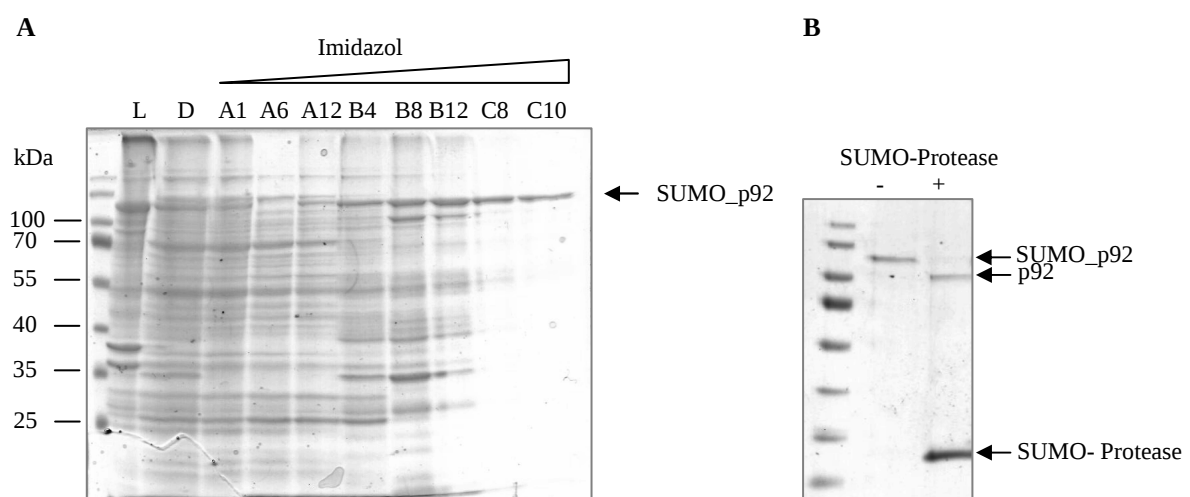


Abb.: 3-29: Reinigung des SUMO_p92 und Spaltung des Fusionsproteins

A: Reinigung des SUMO_p92 per Affinitätschromatographie. Gezeigt sind die von der Säule mittels Imidazolgradienten eluierten Fraktionen nach Auftrennung auf einem 10% SDS-Polyacrylamid-Gel und Coomassie-Färbung des Gels.

B: Behandlung der SUMO_p92-Präparation mit SUMO-Protease. Gezeigt ist das Coomassie-gefärbte 10% SDS-Polyacrylamidgel mit Proben vor und nach der Behandlung.

Mit der anschließenden zweiten Affinitätschromatographie konnte p92 von dem SUMO-Protein und der SUMO-Protease getrennt werden (Abb. 3-30 A).

Da während der SUMO-Protease-Behandlung ein Teil der p92-Präparation ausgefallen war, wurde versucht das Protein durch erneute Denaturierung und Rückfaltung per Dialyse in alternative Puffer zu bringen. Der lösliche Teil der Proteinpräparation wurde durch Zentrifugation vom aggregierten Teil abgetrennt. Im Triton X-100-haltigen TR-Puffer zeigte sich eine schwache Bande im Überstand, sodass davon auszugehen ist, dass ein Teil der p92-Präparation in diesem Puffer löslich blieb (Abb. 3-30 B, Bahn 4). Ein Puffer, der für die Reinigung der rekombinanten TCV-Polymerase genutzt wurde (Song & Simon, 1994), wurde hier adaptiert und ebenfalls getestet. Da für die Reinigung der CNV-Replikase-Komplexe die Detergentien-Kombination von Triton X-100 und SB3-10 zur Anwendung kam (Panaviene *et al.*, 2004), wurden dem TCV-Polymerase-Puffer beim Rückfaltungstest beide Detergentien statt Glycerin zugesetzt. In diesem Tris-basierten Puffer war allerdings sowohl mit Glycerin als auch mit Triton X-100/SB3-10 das p92 nach der Rückfaltung lediglich als unlösliches Protein im Pellet detektierbar (Abb. 3-30 B, Bahn 2 und 3). p92 wurde also in dem 0,2% (w/v) Triton-haltigen TR-Puffer belassen.

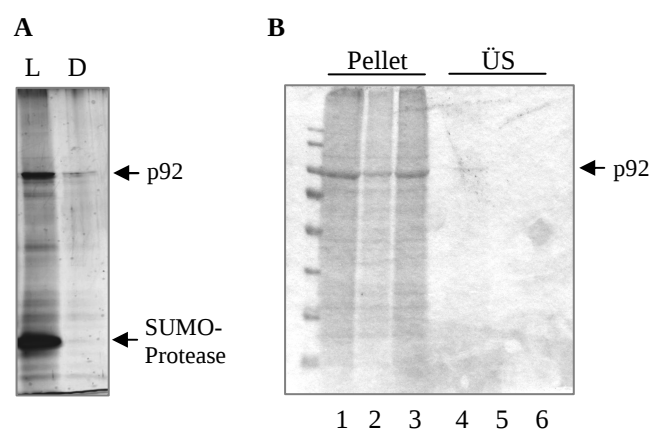


Abb.: 3-30: Reinigung des p92 und Dialyse gegen alternative Puffer

A: Silber-gefärbtes 10% SDS-Polyacrylamidgel nach der Trennung des p92 von der SUMO-Protease und dem SUMO-Protein per Affinitätschromatographie (IMAC) in Na-Phosphatpuffer mit 0,2% Triton X-100.

L = Beladung der Säule; D = Durchfluss

B: Dialyse des p92 gegen verschiedene Puffer. Bahn 1 und 4: TR-Puffer mit Triton X-100 (siehe auch Material und Methoden); Bahn 2 und 5: TCV-Polymerase-Puffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM TCEP, 6% Glycerin, pH 8); Bahn 3 und 6: TCV-Polymerase-Puffer mit 0,1% Triton X-100 und 1% SB3-10 statt Glycerin. Gezeigt ist das Coomassie-gefärbte 10% SDS-Polyacrylamidgel.

ÜS = Überstand

Zur Reinigung des SUMO_p33 wurde auf *E.coli*-Zellen, die SUMO_p33 im Fermenter exprimiert hatten und aus einer Diplomarbeit zur Verfügung standen (Penzel, 2009), zurückgegriffen. Die Reinigung erfolgte in gleicher Weise wie die des SUMO_p92. Mit der

Affinitätschromatographie (IMAC) konnte der überwiegende Teil kontaminierender Proteine abgetrennt werden (Abb. 3-31, bzw. Daten nicht gezeigt). Mehrere IMAC-Fractionen, die SUMO_p33 enthielten (Abb. 3-31 A), wurden vereinigt und mit SUMO-Protease behandelt. Diese wurde in einer zweiten Affinitätschromatographie entfernt (Abb. 3-31 B). Ein Teil der p33-Präparation war in TR-Puffer mit 0,2% Triton X-100 löslich (Abb. 3-31 B) und konnte somit nach dem Abzentrifugieren der Dialyse im Überstand detektiert werden.

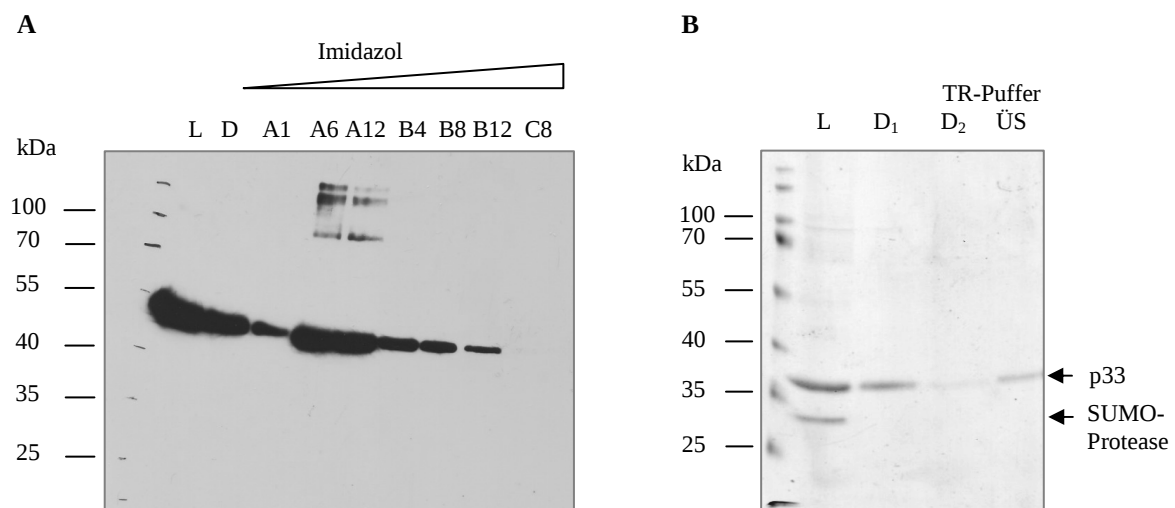


Abb.: 3-31: Reinigung des p33 und Dialyse gegen TR-Puffer

A: Western Blot mit Anti-His-tag-Antikörper zur Detektion des SUMO_p33 in Fraktionen der Affinitätschromatographie (IMAC) L = Beladung der Säule; D = Durchfluss

B: Coomassie-gefärbtes 10% SDS-Polyacrylamidgel nach der Trennung des p33 von der SUMO-Protease und dem SUMO-Protein per Affinitätschromatographie (IMAC) in Na-Phosphatpuffer mit 0,2% Triton X-100 und Dialyse des p33 gegen TR-Puffer. L = Beladung der Säule; D₁, D₂ = Durchfluss, ÜS = Überstand

Da mit dem 0,2% (w/v) Triton-haltigen TR-Puffer sowohl für p92 als auch p33 ein Puffer gefunden wurde, in dem die gereinigten Proteine zum Teil löslich waren, konnten nun Versuche zur Aktivität der rekombinanten RdRP durchgeführt werden.

Per SDS-Polyacrylamidgel und Coomassie-Färbung konnten aus dem Vergleich mit definierten BSA-Mengen die Konzentrationen der p92- und p33-Präparationen ermittelt werden. Um die Aktivität der Polymerase *in vitro* zu testen, wurden 20 µl (ca. 11 fmol) des rekombinanten p92 in Triton-TR-Puffer mit 10 pmol TBSV-DI (-)-Strang- bzw. (+)-Strang-RNA als Matrize versetzt. Der Ansatz wurde mit 2 mM MnCl₂, RNase-Inhibitor, Actinomycin D, DTT, ATP, GTP, UTP und ³²P-markiertem CTP komplettiert (siehe Material und Methoden). Abbildung 3-32 A zeigt, dass ein markiertes Produkt von der Größe der *template*-RNA entstand. Die Markierung war wesentlich stärker, wenn der DI(-)-Strang als Matrize eingesetzt wurde. Wurde zu dem Polymerase-assay-Ansatz mit (-)-Strang

template außerdem das rekombinante p33 (10 μ l, ca. 1,5 pmol) zugesetzt, war eine nochmals stärkere Markierung des Produktes sichtbar. Auf die Markierung des (+)-Strang-templates hatte p33 hingegen keine stimulierende Wirkung.

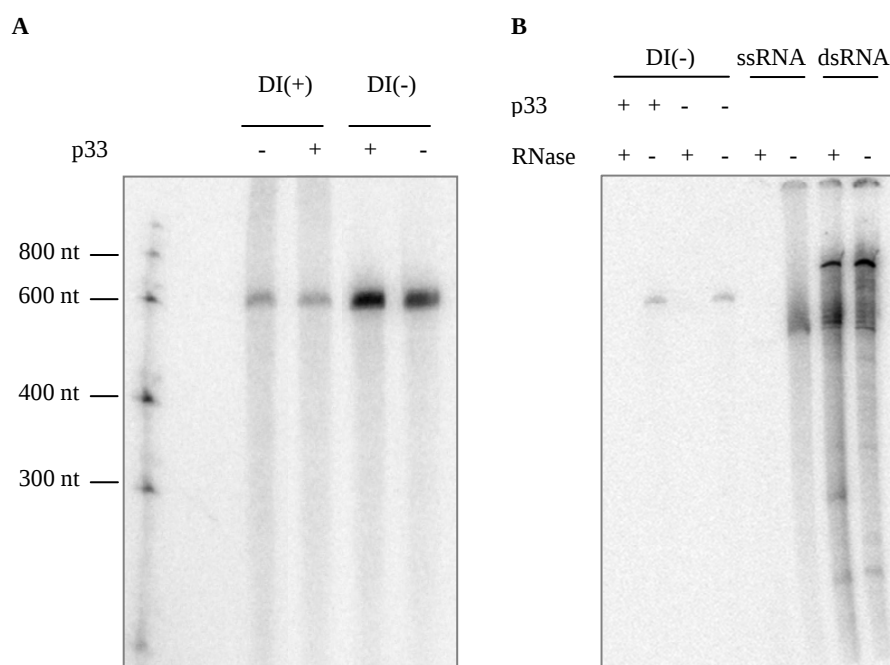


Abb. 3-32: Aktivität des rekombinanten p92 im *in vitro*-Polymerase-assay

A: Autoradiogramm eines *in vitro* Polymerase-assays. Es wurden 20 μ l p92-Präparation und 10 μ l p33-Präparation eingesetzt. Die RNA wurde nach der Reaktion aus dem Ansatz gereinigt und auf einem denaturierenden 4% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Der Versuch mit DI(+)-*template* wurde mehr als drei Mal wiederholt, mit dem gleichen Resultat. Der Versuch mit p33 und DI(-)-RNA wurde zwei Mal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

B: RNase T1-Behandlung eines markierten Produktes des *in vitro*-Polymerase-assays zum Abbau einzelsträngiger RNA. Gezeigt ist das Autoradiogramm.

Nach RNase T1-Behandlung unter Bedingungen, mit denen spezifisch einzelsträngige RNA abgebaut wird, wurde offensichtlich, dass das Produkt des Polymerase-assays End-markierte RNA war (Abb. 3-32 B). Im Falle von *de novo* synthetisierter RNA würde der neu gebildete (+)-Strang an die (-)-Strang-Matrize binden und als Doppelstrang, unter den eingestellten Bedingungen, RNase-resistent sein. Als Kontrolle für eine einzelsträngige RNA wurde GFP-RNA mitgeführt. Als dsRNA-Kontrolle diente ein Konstrukt des *West Nil virus*.

Das rekombinante p92 zeigte damit Terminale-Nukleotidyl-Transferase-Aktivität, jedoch keine detektierbare Polymerase-Aktivität. Diese Experimente lieferten aber erste wichtige Hinweise für zukünftige Versuche zur Darstellung aktiver TBSV-Replikase *in vitro*.

4. Diskussion

Ein Virus ist für seine Vermehrung auf eigene, regulatorisch wirkende RNA-Elemente und eine Vielzahl von Wirtsfaktoren angewiesen. Zur Untersuchung der Virus-Wirt-Interaktion ist ein Wirts-authentisches, zellfreies *in vitro*-System, in dem einzelne Abschnitte des Replikationszyklus synchronisiert ablaufen, von großem Vorteil. Eine noch größere Errungenschaft wäre die *in vitro*-Rekonstitution des Replikase-Komplexes, was eine sehr gezielte Beeinflussung der einzelnen Komponenten ermöglichen würde. Dazu sollte diese Arbeit beitragen.

Als Untersuchungsobjekt wurde TBSV gewählt, da dieses Virus ein recht breites Wirtsspektrums aufweist. Ebenso erschien es wegen der schon umfangreichen Charakterisierung seiner RNA-Elemente geeignet, die Etablierung eines pflanzlichen *in vitro*-Replikationssystems zu erleichtern.

4.1 Eignung verschiedener Suspensionskulturen für die Präparation translations- / und replikationsaktiver Extrakte

In jüngster Zeit wurde ein zellfreies Lysat aus *Nicotiana tabacum* BY-2-Suspensionkultur gewonnen, in dem Pflanzenviren verschiedener Gattungen replizieren konnten (Komoda *et al.*, 2004). Von *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Brome mosaic virus* (BMV) und *Turnip crinkle virus* (TCV) konnten in dem Extrakt markierte Replikationsprodukte von Größe der genomischen und subgenomischen RNAs gebildet werden. Damit war ein vielversprechender Ausgangspunkt geschaffen, um weitere Charakterisierungen des Replikationszyklus in einem *in vitro*-System vornehmen zu können. Das Protokoll zur Präparation dieses Extraktes (BYL) diente hier also als Grundlage und wurde für Untersuchungen zum TBSV-Infektionszyklus modifiziert. Da die Qualität und Eigenschaften einer Suspensionskultur von verschiedenen Parametern abhängen, war es nicht selbstverständlich, dass aus der hier verwendeten BY-2-Suspensionskultur ein aktiver Extrakt präpariert werden konnte. Mit den in Abschnitt 3.1 beschriebenen Abwandlungen gelang es, starke Translationsaktivität mit einem Luciferase-Reporterkonstrukt nachzuweisen (s.a. Tab. 3-2). Dabei wurde nach Verringerung des Lysat-Gehaltes eine höhere Translationsaktivität gemessen. Dies könnte seine Ursache darin haben, dass ein im Extrakt vorhandener inhibitorischer Faktor verdünnt wird.

Um mit einem breiteren Wirtsspektrum möglichst verschiedene Pflanzenviren untersuchen zu können, wurden Suspensionskulturen von *Arabidopsis thaliana* Col-0 und Tomate

(*Lycopersicon esculentum*) für die Lysat-Präparation genutzt. *A. thaliana* hat zudem den Vorteil, dass das Genom dieser Modellpflanze vollständig sequenziert ist.

Für die Präparation translationsfähiger Extrakte aus beiden Arten standen zu Beginn der Arbeit keine Protokolle zur Verfügung, sodass die Extrakte aus Suspensionskulturen von *A. thaliana* Col-0 und *L. esculentum* nach dem BYL-Protokoll präpariert wurden. Beide Extrakte zeigten trotz Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung keine Translationsaktivität. Ursächlich dafür könnte eine Kontamination mit aus den Vakuolen stammenden Nukleasen sein, die für eine geringe Stabilität der zu translatierenden RNAs verantwortlich sind. Die Vakuolen von *A. thaliana* und *L. esculentum* haben im Vergleich zu denen der Tabak-Zellen eine andere Größe. Möglicherweise konnten sie mit dem BYL-Protokoll nicht vollständig und intakt entfernt werden.

Erst 2011 gelang es Murota *et al.* einen Extrakt aus *Arabidopsis*-Protoplasten zu gewinnen, mit dem RNA translatiert werden konnte. Zur Protoplastierung wurden Kallus-Kulturen aus Samen verwendet. Allerdings war die Translation stark *cap*-abhängig. RNA ohne *cap* war nach 10-minütiger Inkubationszeit im Extrakt zu 90% abgebaut. Diese Arbeit zeigte zudem, dass ein Extrakt, der aus einer Mutante, bei der die 5'-3'Exoribonuklease AtXRN4 inaktiv ist, präpariert wurde, eine höhere Stabilität der RNA ohne *cap* zuließ. Es sind demnach mehrere Nukleasen für die Instabilität der RNA im Extrakt verantwortlich. Es ist sehr wahrscheinlich, dass dies auch für die hier präparierten Lysate gilt.

Für die nachfolgenden Experimente wurde entsprechend lediglich BYL genutzt.

4.2 Der Replikationszyklus des TBSV im Tabakzell-Extrakt BYL

4.2.1 Translation im BYL

Im BYL wird die Translation durch die Zugabe des Translations-Mixes synchronisiert initiiert. Dies wurde dadurch deutlich, dass die Translation komplett unterbunden werden kann, wenn Translations-Mix fehlt (Abb.3-1 C), mit dem die K- und Mg-Ionen-Konzentration auf einen optimalen Bereich eingestellt und ein ATP-regenerierendes System zur Verfügung gestellt wird.

Die TBSV-Proteine p33 und p92 konnten im BYL sowohl von mRNA, als auch von genomischer RNA translatiert werden (Abb. 3-1). Das Verhältnis der viralen Proteine des Replikase-Komplexes p33 und p92 hat einen entscheidenden Einfluss auf die Replikationseffizienz (Gursinsky *et al.*, 2009). *In vivo* liegt das p33/p92-Verhältnis bei 20:1 (Scholthof *et al.*, 1995). Von der genomischen RNA translatiert, liegt das Verhältnis im BYL bei bis zu 290:1 (Abb.3-2 und Abb.3-3) und ist somit zu Ungunsten des p92 verschoben. Das

Überlesen des Stop-Codons im p33-ORF, das zur p92-Bildung nötig ist, wird durch Suppressor-tRNAs bewirkt. Dies sind vermutlich tRNA^{Tyr} oder tRNA^{Gln} (Beier & Grimm, 2001). Ein Mangel dieser Suppressor-tRNAs im BYL würde folglich zu einer limitierten p92-Synthese führen, wie hier beobachtet. Diese Unzulänglichkeit des BYL kann leicht umgangen werden, indem p33 und p92 von mRNAs translatiert werden, wodurch das Verhältnis beider genau einstellbar ist.

Der virale Replikationszyklus kann einer Regulation durch das Hüll-Protein unterliegen. So wurde beispielsweise für *Alfalfa mosaic virus* (AMV) ein positiver Einfluss des Hüll-Proteins auf die Translation gezeigt (Krab *et al.*, 2005). Ein gegenteiliger Effekt wurde bei *Brome mosaic virus* (BMV) offenbar: hohe Konzentrationen des Hüll-Proteins verminderten die Translation der viralen Replikase-Komplex-Komponenten (Yi *et al.*, 2009). Das TBSV-Hüll-Protein übt keinen spezifischen Einfluss auf die Translation des p33 und p92 aus (Abb. 3-2). Offenbar wirkte in diesem Versuch sowohl die p41- als auch die Luciferase-mRNA als zusätzliches Nuklease-Substrat stabilisierend auf die gTBSV-RNA. Dies könnte wiederum die größere Menge an Translationsprodukten der gTBSV-RNA erklären.

Für die Versuche zur Viruspartikel-Assemblierung im BYL war es eine wichtige Information, dass kein spezifischer Effekt der p41-mRNA auf die Translation des p33 und p92 vorliegt.

Neben p33 und p92 lässt sich auch das nicht-virale Protein Hsp70 aus *A. thaliana* von einer mRNA translatieren. Dies wurde zur Optimierung der gTBSV-Replikation genutzt (s.a. Kap. 4.2.2.1).

4.2.2 Charakteristika des TBSV-Replikationszyklus im BYL

4.2.2.1 Replikation der TBSV-RNA in BYL

Die generelle Replikationsfähigkeit des hier präparierten BYL wurde anhand einer Test-Replikation mit TCV, im Vergleich mit Daten von Komoda *et al.* (2004), bestätigt. Die grundsätzliche Eignung der Extraktpräparationen für die Replikation war also gegeben.

Erste Versuche zur Replikation mit TBSV im BYL hatten gezeigt, dass DI-RNA repliziert werden kann, wobei die Replikase-Komplex-Proteine p33 und p92 sowohl von genomischer RNA, als auch von mRNAs translatiert werden konnten. Es konnte ein vollständiger Replikationszyklus nachgewiesen werden, bei dem das (+)/(-)-Strang-Verhältnis bei 200:1 lag (Gursinsky *et al.*, 2009). Kürzere oder längere Nebenprodukte waren kaum detektierbar.

Der Zeitverlauf der Replikation im BYL (Abb. 3-6) zeigte, dass eine halbe Stunde für die Assemblierung des Replikase-Komplexes und die RNA-Neusynthese über die Detektionsgrenze ausreichte. Ein Hefe-basierter *in vitro*-Replikations-assay (s.a. Kap. 1-4) lieferte in dieser Hinsicht ähnliche Daten: Pogany & Nagy (2008) berichteten, dass ein DI-Replikationsprodukt nach 40 min detektierbar wurde. In BYL stieg die Menge an Replikationsprodukt über einen Zeitraum von vier Stunden stetig an. Ähnlich war die Situation in Hefe: nach sechs Stunden war die Menge an Replikationsprodukt am größten (Pogany & Nagy, 2008).

Im Vergleich zur DI-RNA war die Replikation der gesamtgenomischen TBSV-RNA (gTBSV) schwächer (Abb. 3-18). Eine unspezifische Markierung durch Faktoren im Lysat konnte durch die Abhängigkeit der Markierung vom GDD-Motiv des p92 ausgeschlossen werden (Abb. 3-18, 3-19). Die Synthese subgenomischer RNAs war im BYL nicht offensichtlich (Abb. 3-20). Die Bildung der sgRNAs scheint generell für TBSV *in vitro* gehemmt zu sein. Ein Extrakt aus p33- und p92-exprimierenden Hefe-Zellen zeigte das gleiche Bild: Mit *in vitro* transkribierter gTBSV-RNA als Replikations-Matrize ließ sich keine sgRNA nachweisen (Pogany & Nagy, 2008). Wurde die Replikation mit aus Viruspartikeln isolierter RNA, sogenannter Virionen-RNA, durchgeführt, war neben einer erhöhten Menge an Replikationsprodukt auch eine sehr schwache Bande von der Größe der sgRNA2 sichtbar (Pogany & Nagy, 2008). Von Virus-Genomen des TCV, BMV und CIRV ließen sich hingegen im BYL, bzw. im Hefe-System, sgRNAs synthetisieren (Komoda *et al.*, 2004; Pogany & Nagy, 2008). Die Bildung von sgRNAs des TBSV erfordert RNA-RNA-Interaktionen zwischen RNA-Sekundärstrukturen, die über 1000 nt entfernt voneinander im RNA-Molekül liegen (Wang *et al.*, 2008). Sie fungieren im (+)-Strang als Attenuationssignal für die RdRP. Da die Matrizen RNA für die Versuche im BYL aus einer *in vitro*-Transkription mittels Phenol/Chloroform-Reinigung gewonnen wurde, ist es vorstellbar, dass sich diese komplexen Strukturen nicht korrekt ausbilden konnten.

Die Replikationsprodukt-Menge konnte für die DI-RNA durch die Verringerung der Mg-Ionen-Konzentration in der Replikation erhöht werden. Noch effizienter gelang dies durch die Zugabe von EDTA vor der Replikation (Abb. 3-7). Die Chelatierung zweiwertiger Kationen im BYL durch EDTA inhibiert sehr wahrscheinlich Kationen-abhängige Nukleasen. Für die DI-RNA konnte folgerichtig gezeigt werden, dass sich die Stabilität der RNA im BYL durch die Zugabe von EDTA erhöht (s.a. Gursinsky *et al.*, 2009). Eine an der Degradation von Tombusvirus-RNA beteiligte Nuklease ist XRN4p, eine cytosolische 5'-3'Exoribonuklease aus *N. benthamiana* (Cheng *et al.*, 2007; Jaag & Nagy, 2009). Auch die Endoribonuklease RNase MRP kann für die Instabilität der TBSV-RNA eine Rolle spielen

(Jaag *et al.*, 2011). Sowohl 5'-3'-Exoribonukleasen, als auch RNase MRP benötigen für ihre Aktivität divalente Kationen (Xiang *et al.*, 2009; Tanner, 1999). Auf die gTBSV-RNA-Stabilität hatte EDTA dagegen keine so deutliche Wirkung. Im Gegensatz zur hier verwendeten DI-RNA enthält die gTBSV-RNA die 3'CITE. Diese kann mit dem 5'-Ende der RNA interagieren (Fabian & White, 2004), sodass das 5'-Ende vermutlich weniger zugänglich für eine Exoribonuklease ist.

Die Menge an Replikationsprodukt der gTBSV-RNA im BYL konnte durch kotranslatierte Hsc70-mRNA nahezu verdoppelt werden (Abb. 3-19). Dies wurde auch mit der DI-RNA als Matrize beobachtet (Gursinsky *et al.*, 2009). Die Neusynthese des Hsc70 scheint dabei entscheidend zu sein. Ein Grund dafür könnte sein, dass das endogene Hsp70 nicht in ausreichender Menge verfügbar ist, um die TBSV-Replikation zu unterstützen, weil es an zelluläre Proteine gebunden ist. Konstitutiv exprimiertes Hsp70 (Hsc70) ist in eukaryotischen Zellen an der co- und posttranslationalen Proteinfaltung und am Transport von Proteinen zu Organellen beteiligt. Zudem kann es mit Proteinen, die Signaltransduktionswege regulieren, interagieren (Mayer & Bukau, 2005). Das Hsc70 wurde als Bestandteil eines Tombusviurs-Replikase-Komplexes in Hefe identifiziert (Serva & Nagy, 2006). Es bindet sowohl an das TBSV-p33, als auch an das TBSV-p92 und ist an der Insertion beider Proteine in Membranen beteiligt (Wang *et al.*, 2009). Letzteres und eine Rolle des Hsc70 als Chaperon für p33 und p92 tragen vermutlich dazu bei, dass im BYL durch die Kotranslation von Hsc70-mRNA und gTBSV-RNA ein aktiver Replikase-Komplex effizienter assembliert. Zudem konnten Serva & Nagy (2006) feststellen, dass bei Überexpression eines Hsp70-Homologen in Hefe die Menge an p92 zwar abnahm, p92 aber dennoch aktiver war.

Zusätzlich zu TBSV wurden zwei weitere Plusstrang-RNA-Viren im BYL getestet: *Raspberry bushy dwarf virus* und *Rubus chlorotic mottle virus*. Für beide konnte keine Replikation sondern lediglich 3'End-Markierung der Matrizen-RNA detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Über die Gründe kann nur spekuliert werden. Möglicherweise fehlen wirtsspezifische zelluläre Proteine: die natürlichen Wirte sind Brombeere und Himbeere.

4.2.2.2 Der TBSV-Replikase-Komplex zeigt eine hohe Matrizen-Spezifität im BYL

Zur Assemblierung des Replikase-Komplexes ist die TBSV-RNA unabdingbar. Zwei Regionen der TBSV-RNA sind für die spezifische Bindung durch die Replikase-Proteine besonders wichtig. Dazu gehört ein C-C-mismatch in einer stem-loop-Struktur der Region II,

das sogenannte p33RE, an das p33 bevorzugt bindet (Panaviene *et al.*, 2005). Des Weiteren spielen Elemente der Region IV für die Bildung des Replikase-Komplexes eine Rolle (Panaviene *et al.*, 2005).

Die vielfach für die TBSV-Replikation genutzten, aus Hefe oder infizierten Pflanzen partiell gereinigten, vorassemblierten Replikase-Komplexe zeigten eine vielfältige Matrizen-Nutzung. So wurde neben der artfremden TCV-satC-RNA und TBSV-Minusstrang-RNA auch eine RNA als Matrize verwendet, in der ein Cytosin des essentiellen C·C- *mismatch* in ein Guanin mutiert war (Panaviene *et al.*, 2004; Pogany & Nagy, 2008). Dagegen konnte in dem von Pogany & Nagy 2008 entwickelten Hefe-basierten Replikations-System weder TBSV-Minus-Strang-DI-RNA noch die Mutante des C·C-*mismatch* als Matrize genutzt werden. Die beiden viralen Replikase-Proteine p33 und p92 wurden in diesem *assay* vor der Extrakt-Präparation ohne virales *template* in Hefe exprimiert. RNA-Protein-Interaktionen hängen im Allgemeinen von den Pufferbedingungen und die Spezifität der Interaktion auch von der Protein-Konzentration ab. p33 bindet *in vitro* in hohen Konzentrationen unspezifisch an RNA (Stork *et al.*, 2011). Deshalb war es besonders interessant, ob im BYL die für ein *in vitro*-Replikationssystem erforderliche *template*-Spezifität gegeben ist.

Bei Versuchen in BYL lieferte die p33RE-Mutante der DI-RNA (DI_{muA}), mit einer Punktmutation des C·C-*mismatch*, kein Replikationsprodukt (Abb. 3-8). Dies gilt auch für die p33RE-Mutante der gTBSV-RNA (Gursinsky *et al.*, 2009). Obwohl die p33RE-Mutante, neben der p33- und p92-mRNA sowie ribosomaler RNA, in hoher Konzentration im Translations-/Replikationsassay vorlagen, führte dies nicht zu einer unspezifischen Amplifikation oder Markierung der RNAs. Die Proteine p33 und p92 interagieren demnach im BYL äußerst spezifisch mit der viralen RNA.

Interessanterweise konnte im BYL auch die DI-Minusstrang-RNA nicht als *template* genutzt werden (Abb. 3-8). Dies stimmt mit den Daten von Panaviene *et al.* (2005) überein, die in Replikase-Assemblierungs-Versuchen keinen replikationsfähigen Komplex mit dem DI-Minusstrang als Matrize gewinnen konnten. Offensichtlich fehlen der Minusstrang-RNA Elemente, die eine Assemblierung des Replikase-Komplexes gewährleisten, wenngleich eine Bindung von p33 an TBSV-Minusstrang-RNA gezeigt wurde (Rajendran & Nagy, 2003; Stork *et al.*, 2005). Es ist zudem denkbar, dass die Replikase nur den Minusstrang nutzen kann, der mit der Plusstrang-Matrize im Replikase-Komplex assoziiert ist, jedoch keinen externen Minusstrang.

Prinzipiell sollte eine Nutzung des Minusstranges jedoch möglich sein, wenn der Replikase-Komplex zuvor an einem anderen *template* assemblieren konnte, wie die Versuche mit aus Pflanzen gereinigten Replikase-Komplexen nahe legen (Nagy & Pogany, 2000). Im BYL

sollte eine Deletionsvariante des DI-Plusstranges (DI Δ RI) als Assemblierungsplattform dienen. An einer solchen DI-RNA, ohne die Region I, konnte sich in Hefe ein aktiver TBSV-Replikase-Komplex formieren, der kurze Minusstrang-RNA als Matrize nutzte (Panaviene *et al.*, 2005). Im BYL konnte hingegen, auch mit der DI Δ RI-RNA als Assemblierungsplattform, kein Replikationsprodukt der Minusstrang-RNA detektiert werden (Abb. 3-10).

Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass, aufgrund der Deletion, nur ein Teil der DI Δ RI-RNA die erforderlichen Sekundärstrukturen ausbilden konnte. Ein Hinweis darauf könnte die schwache Replikation der DI Δ RI-RNA sein. Die gewünschte Funktion als Assemblierungsplattform könnte dann lediglich ein Teil der RNA ausüben. Dadurch könnte die Replikation der Minusstrang-RNA unter der Detektionsgrenze geblieben sein. Erschwerend könnte hinzukommen, dass sich eine geringe Menge an Minusstrang-Replikationsprodukt möglicherweise aufgrund des Überschusses an (+) Matrizen-RNA nicht als distinkte Bande im Gel detektieren ließ.

Als weiterer technischer Grund könnte der Einsatz eines zu geringen Überschusses an Minusstrang-*template*, im Vergleich zur DI Δ RI-RNA, eine Rolle spielen. Der knapp 1,5-fache molare Überschuss an DI(-)-RNA reichte, im Gegensatz zum knapp 1,5-fachen molaren Überschuss an DI_{WT}(+)-RNA, möglicherweise nicht aus, um die DI Δ RI-RNA aus dem Replikase-Komplex zu verdrängen. Ein Teil der Minusstrang-Matrize könnte mit der Assemblierungsplattform DI Δ RI(+) unzugänglich für die Replikase zu dsRNA hybridisieren.

Insgesamt zeigen die Versuche, dass TBSV im BYL für die Replikation spezielle RNA-Strukturen bzw. -Sequenzen benötigt. Die große Spezifität des TBSV bei der Matrizen-Wahl ist eine wichtige Voraussetzung für weitere Untersuchungen im BYL wie beispielsweise Studien zur antiviralen Immunantwort (Schuck *et al.*, 2013).

4.2.2.3 Die Rolle des RSE für die Replikation des TBSV im BYL

Mit der erfolgreichen Replikation der genomischen TBSV-RNA sowie der DI-RNA im BYL und der hohen Spezifität bei der Matrizen-Nutzung schien es lohnenswert, die Verwendbarkeit des BYL für Studien an replikationsregulatorischen Elementen zu überprüfen. In dieser Hinsicht hat die am 3'-Ende der TBSV-RNA gelegene Region, die in der DI-RNA auch als RIV bezeichnet wird, eine besondere Bedeutung für TBSV und wurde deshalb hier untersucht. Die Region enthält den Promotor für die Minusstrang-Synthese und soll mit ihren drei *stem loop*-Strukturen die Minusstrang-Synthese regulieren (Pogany *et al.*,

2003). Wie bereits erwähnt, leiteten Pogany *et al.* aus ihren Versuchen ein Modell ab, nach dem die fünf terminalen Basen 5'-AGCCC-3' mit fünf komplementären Basen einer *loop*-Region (RSE, *replication silencer element*) interagieren, die 60 Nukleotide stromaufwärts liegt (s.a. Abb. 3-11). Das 3'-Ende soll auf diese Weise vor Abbau geschützt und der (-)-Strang-Promotor schwer zugänglich für die RdRP gebunden sein, sodass die Minusstrang-Synthese inhibiert wird. *In vitro* Versuche mit vorassemblierten, partiell gereinigten CNV-Replikase-Komplexen aus infizierten Pflanzen zeigten, dass bis zu 9-fach mehr Minusstrang synthetisiert wurde, wenn die *pseudoknot*-Bildung durch eine Punktmutation unterbunden war. Bei Wiederherstellung der Interaktion durch kompensatorische Punktmutationen sank die Minusstrang-Menge nahezu auf Wildtyp-Niveau ab. Interessanterweise konnte dies lediglich *in vitro* beobachtet werden. *In vivo*, d.h. in Protoplasten, die mit DI-Mutanten und der genomischen RNA als Helfer-Virus transfiziert wurden, replizierte keine der Mutanten auf Wildtyp-Niveau. Die Einzelmутanten zeigten weder Plus- noch Minusstrang-Synthese. Sogar die kompensatorische Mutante akkumulierte lediglich 18% der Plusstrang-Menge des DI-Wildtyp und zeigte eine damit korrelierende, niedrige Minusstrang-Menge (Pogany *et al.*, 2003).

Für die Versuche im BYL wurden drei Mutanten, die eine Abschwächung der Interaktion zwischen 3'-Ende und RSE bewirken, genutzt sowie eine kompensatorische Mutante, bei der die *pseudoknot*-Bildung durch zwei Punktmutationen wieder möglich sein sollte (s.a. Abb. 3-11). Die Basenaustausche gleichen denen von Pogany *et al.* (2003) bzw. Panaviene *et al.* (2005). Die Replikase-Proteine p33 und p92 wurden statt von genomischer RNA als Helfer-Virus von einer entsprechenden mRNA translatiert. Die drei Mutanten mit beeinträchtigter RSE-gPR-Interaktion replizierten im BYL auf bis zu 14% des Wild-Typ-Niveaus. Die kompensatorische Mutante erreichte 34% des Wild-Typ-Niveaus (Abb. 3-12). Für die verschiedenen Replikationsprodukt-Mengen ist dabei keine unterschiedliche Stabilität der einzelnen Mutanten verantwortlich (Abb. 3-15).

Die von den Mutanten im BYL gebildete Menge an Minusstrang-RNA lag bei 20% bis 40% relativ zur Minusstrang-Menge, die von der DI_{WT}(+)-RNA synthetisiert wurde (Abb. 3-14). Im BYL zeigt sich somit keine deutlich erhöhte Minusstrang-Synthese wie bei *in vitro*-Versuchen mit CNV-Replikase-Komplexen, sie lag aber auch nicht unter der Nachweisgrenze, wie die Replikation der Einzelmутanten in Protoplasten (*in vivo*). Die im BYL gewonnenen Ergebnisse entsprechen eher den *in vivo* erzielten Ergebnissen als den *in vitro*-Daten von Pogany *et al.*, 2003. Der Vergleich der Ergebnisse wird allerdings dadurch erschwert, dass für die *in vivo*-Versuche in Protoplasten gTBSV-RNA als Helfer-Virus eingesetzt wurde. Die gTBSV-RNA könnte mit dem eigentlichen Untersuchungsobjekt, der

DI-RNA, als Konkurrent um Replikase-Komplexe im Vorteil sein und die Ergebnisse verfälschen. Bei den *in vitro* erzeugten Daten gilt es zu bedenken, dass die CNV-Replikase-Komplexe generell nur eine geringe *template*-Spezifität aufweisen und keinen vollständigen Replikationszyklus bewerkstelligen können. Zudem umfasste die Matrize für die CNV-Replikase lediglich die Region IV, nicht die DI-RNA in voller Länge.

Die im BYL gewonnenen Daten sprechen insgesamt gegen die Rolle des *replication silencer elements* als Regulator der Minusstrang-Synthese. Die Bedeutung der RNA-RNA-Interaktion, also einer geschlossenen Form am 3'-Ende, wurde hingegen bestätigt. Sie könnte vor allem wichtig für die Assemblierung des Replikase-Komplexes und dessen korrekte Positionierung am (-)-Strang-Promotor sein, ein Prozess, der der Minusstrang-Synthese vorausgeht. Ergebnisse von Panaviene *et al.* (2005) legten allerdings nahe, dass die Primärsequenz essentiell für die Assemblierung des Replikase-Komplexes ist. So konnten die zwei im BYL getesteten DI-Mutanten B und C bei Panaviene *et al.* als Mutanten eines Minimalkonstruktes (aus den DI-Regionen II und IV) eine Replikase mit nur 1% bzw. 3% Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt hervorbringen. In diesen Versuchen wurden Replikase-Komplexe aus Hefe-Zellen, die neben der jeweiligen DI-RNA-Variante die Proteine p33 und p92 des CNV exprimierten, isoliert. Die Aktivität dieser Replikase-Komplexe wurde anschließend im *in vitro*-Replikations-assay anhand der relativen Menge komplementärer RNA, die von verkürzter Minusstrang-Matrize synthetisiert wurde, bestimmt. Noch deutlicher schien die Rolle der Primärsequenz durch weitere Experimente in Hefe belegt zu werden: Panaviene *et al.* (2005) testeten die Replikations-Fähigkeit der auch im BYL untersuchten DI-Mutanten. Die DI-Mutanten (entsprechend den Mutanten B, C und D) wurden mit p33 und p92 zusammen in Hefe exprimiert und die Menge an DI-RNA nach zwei Tagen per Northern Blot ermittelt. Es zeigte sich, dass die RNA-Mengen, auch der kompensatorischen Mutante, jeweils bei unter 1% im Vergleich zum WT lagen.

Dem stehen nicht nur die im BYL gewonnenen Daten entgegen, sondern auch neuere Versuche aus der gleichen Arbeitsgruppe: Pathak *et al.* (2012) konnten in Replikase-Assemblierungs-Versuchen zeigen, dass eine der Mutante B entsprechende Variante eines Minimalkonstruktes auf 11% des Wildtyp-Niveaus replizierte. Dabei wurde das Minimalkonstrukt (DI-Region II und IV) als Wildtyp oder Mutante zur Assemblierung des Replikase-Komplexes mit rekombinantem p33 und p92 im Hefeextrakt eingesetzt, der Replikase-Komplex anschließend gereinigt und die Komplementärstrang-Synthese von einem (-)-RNA-template bestimmt.

Für TCV wurde ebenfalls eine RNA-RNA-Interaktion mit Beteiligung des 3'-Terminus und dem in 5'-Richtung davon gelegenen *replication silencer* in einem *loop* des H5 beschrieben

(Zhang *et al.*, 2004). In *in vitro*-Versuchen mit Satelliten-RNA und rekombinanter, aus *E. coli* gereinigter TCV-RdRP wurde bei veränderter RNA-RNA-Interaktion eine bis zu zehnfach gesteigerte Minus-Strang-Synthese ermittelt. Kompensatorische Punkt-Mutationen führten lediglich zu 3,7-fach erhöhter Minus-Strang-Akkumulation. Wie auch bei TBSV konnten die Mutanten *in vivo* (in Protoplasten) nicht bzw. nur schwach replizieren.

Insgesamt legt das Replikationsverhalten der TBSV-Mutanten im BYL nahe, dass neben der RSE-3'-Terminus-Interaktion auch die Primärsequenz dieser Bereiche für die effiziente Replikation von Bedeutung ist, allerdings in geringerem Maße, als in der Literatur beschrieben (s.o.). Möglicherweise trägt auch die genaue Struktur dieses *pseudoknots*, bzw. die genaue Struktur der beteiligten *stem-loop*-Strukturen der Region IV dazu bei. Beispielsweise könnte durch eine Mutation die Bindung bzw. Funktion eines Wirtsfaktors wie eEF1A beeinträchtigt sein. eEF1A ist Teil des Tombusvirus-Replikase-Komplexes und bindet sowohl die TBSV-RdRP als auch die 3'UTR der TBSV-RNA. eEF1A erhöht die Halbwertszeit des p33, wie Li *et al.* (2009) bei Versuchen in Hefe feststellten. Der Translations-Elongationsfaktor mit Helikase-Aktivität stimuliert die Minusstrang-Synthese, besonders im Beisein von eEF1B γ , der ebenfalls die TBSV-3'UTR bindet (Sasvari *et al.*, 2011). Sollte sich eine der getesteten Mutationen auf die Bindung eines Wirtsfaktors oder die Funktion einer Komponente des Replikase-Komplexes (eines Kofaktors) negativ auswirken, könnte das die Replikase-Aktivität am Promotor für die Minusstrang-Synthese vermindern.

Denkbar ist auch, dass bisher unbekannte replikationsregulatorische RNA-Strukturänderungen, die durch die Bindung von Proteinen des Replikase-Komplexes induziert werden, durch die hier untersuchten Mutationen beeinflusst werden. Solche Strukturänderungen in der Region am 3'-Ende wurden von Yuan *et al.* (2009) für TCV beschrieben. Durch die RdRP-Bindung änderte sich die Konformation der Strukturelemente der 3'-Region. Die Versuche wurden auch mit Einzelmutanten bzw. einer Doppelmutante, die die Interaktion des *replication silencer elements* mit dem 3'-Terminus unterbinden bzw. wiederherstellt, durchgeführt. Die Bindung der RdRP erzeugte in den Einzelmutanten je nach Ort des Basenaustausches unterschiedliche Konformationsänderungen auch in benachbarten Strukturelementen. Dies wirkte sich, zusätzlich zur verminderten Interaktion der komplementären Basen, auf die Minusstrang-Synthese aus.

Für die TBSV-Mutanten ist ein solcher kombinierter Effekt ebenfalls vorstellbar: Neben der beeinträchtigten *pseudoknot*-Bildung könnten die Mutationen verhindern, dass einzelne Basen spezielle Strukturvoraussetzungen schaffen, die für die Wirtsfaktorbindung nötig sind. In dem gereinigten Replikase-Komplex eines Tombusvirus wurden bis zu 15 Proteine

detektiert, von denen weder alle identifiziert sind noch die Funktionsweise bekannt ist (Serva *et al.*, 2006).

4.2.2.4 Die TBSV-Replikation benötigt keine simultane Proteinsynthese

Da das Genom von Plusstrang-RNA Viren nicht nur als Matrize für die Translation dient, sondern auch als *template* für die Replikation, sind beide Prozesse reguliert miteinander verknüpft. Die virale Polymerase kann jedoch keine Matrizen replizieren, die gleichzeitig translatiert werden, da beide Prozesse in entgegengesetzter Richtung auf der gleichen RNA ablaufen (Gamarnik & Andino, 1998). Die RdRP und Ribosomen würden sich gegenseitig behindern. Dennoch ist eine enge Kopplung beider Prozesse auf verschiedene Weise denkbar, wie Novak und Kirkegaard für Poliovirus beschrieben haben (Novak & Kirkegaard, 1994). Zum einen könnte die Translation *in cis* nötig sein, weil das Protein nur naszierend oder neu synthetisiert funktional für die Replikation ist, indem es z.B. durch die Interaktion mit seiner eigenen mRNA die Minusstrang-Synthese von diesem *template* ermöglicht. Desweiteren könnte eine Affinität zu nicht-mobilen Strukturen wie Membranen oder eine geringe Stabilität des Proteins die Diffusion zu weiter entfernt gelegenen RNA-Molekülen einschränken und somit die Aktivität *in cis* begünstigen. Denkbar ist dies auch, wenn das RNA-Molekül nur in einem engen Zeitfenster zur Translation und Replikation befähigt ist. Darüber hinaus könnten die Ribosomen eine vorrangige *in cis*-Aktivität des translatierten Proteins bewirken, indem sie die Bindung eines Faktors an die RNA beeinflussen oder durch die eigene Bewegung an der RNA entscheidende Sekundärstrukturen induzieren oder aufheben.

Eine Kopplung von Translation und Replikation ist auch für TBSV denkbar. So könnte beispielsweise die Translationsmaschinerie einen großen Anteil daran haben, dass der Translationselongationsfaktor eEF1A an die RdRP und die virale RNA binden kann. eEF1A übt eine stimulierende Wirkung auf die Minusstrang-Synthese aus (Li *et al.*, 2009). Tatsächlich berichteten Pogany & Nagy (2008), dass im zellfreien Hefeextrakt *de novo*-Translation für die Replikation erforderlich war. Dies konnte im BYL nicht bestätigt werden. In dem in BYL durchgeführten Versuch wurden p33- und p92-mRNAs unter Translationsbedingungen inkubiert. Nach Einstellen der Replikationsbedingungen wurde DI-RNA als Matrize zugegeben. Der Einsatz des Translationsinhibitors Puromycin in der Replikation erlaubte RNA-Neusynthese auf dem gleichen Niveau (Abb. 3-17), obwohl die Translation nachweislich unterbunden wurde (Abb. 3-16). Auch die Erhöhung der Mg-Ionen-Konzentration zur Replikation inhibierte die Translation (Daten nicht gezeigt). Damit ist es unwahrscheinlich, dass die Replikation des TBSV zwingend an die Translation

gekoppelt ist. Dafür spricht auch, dass im BYL die Proteine p33 und p92 von gänzlich anderen Matrizen translatiert werden konnten, als dann für die Replikation eingesetzt wurden: die Proteine wurden von mRNAs translatiert, als Matrize für die Replikation wurde hingegen DI-RNA eingesetzt, die keine ORFs enthält.

Die Diskrepanz zwischen dem Hefe-System und dem BYL bezüglich des Bedarfs an einer *de novo* Translation für die Replikation könnte in den experimentellen Details liegen. Im Hefe-System wurden die Zellen mit p33- und p92-codierenden Plasmiden transformiert. Für die Expression der beiden Proteine wurde 24 Stunden Zeit gegeben. Dann erst wurde der Extrakt präpariert, mit dem schließlich die Replikation durchgeführt wurde (Pogany & Nagy, 2008). Im BYL dagegen wurden p33 und p92 erst im fertigen Extrakt exprimiert. Da p33 in hohen Konzentrationen unspezifisch und bevorzugt an einzelsträngige RNA bindet (Rajendran & Nagy, 2003), ist es denkbar, dass das Protein vor der Extraktpräparation aus Hefe zelluläre RNAs gebunden hat, die durch die Replikationsmatrize nicht mehr verdrängt werden können. Im BYL wird dieser unspezifischen RNA-Protein-Interaktion durch die Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung vorgebeugt.

Die Notwendigkeit der *de novo*-Translation im Hefe-System, im Gegensatz zum BYL, könnte zudem an der unterschiedlich langen Translationszeit liegen. Die p33- und p92-transformierten Hefezellen wurden für 24 Stunden inkubiert. Die Extrakt-Präparation zeigte, dass p33 und p92 nur in der Membranfraktion detektierbar waren, nicht aber in der löslichen Fraktion des Extraktes (Pogany & Nagy, 2008). Bei Lokalisationsversuchen in Tabak-BY-2-Zellen wurde deutlich, dass allein exprimiertes p33 eine fortschreitende Aggregation und Strukturänderung der Peroxisomen bewirkte (McCartney *et al.*, 2005). Diese Strukturänderung unterschied sich von den *multivesicular bodies*, die bei einer normalen TBSV-Infektion zu beobachten sind (McCartney *et al.*, 2005). Denkbar ist also, dass p33 und p92, da sie ohne Matrizen-RNA exprimiert wurden, sich und die Membranabschnitte durch irreversible Veränderung replikationsuntauglich machten. Erst durch neu translatiertes p33 (und p92) könnten dann im Beisein des DI-RNA-*templates* funktionstüchtige Replikationskompartimente im Hefeextrakt etabliert worden sein. Mit der wesentlich kürzeren Translationszeit von einer Stunde im BYL wird diese Situation vermutlich umgangen.

Nach dem Modell von Nagy *et al.* (2011) könnte eine durch die räumliche Nähe bedingte Kopplung von Translation und Replikation vorteilhaft sein. Sie ist aber nicht zwingend nötig. Nach diesem Modell binden zuerst p33 und p92 die Replikationsmatrize, bevor der Komplex unter Beteiligung von Wirtsfaktoren in die peroxisomale Membran integriert und

die RNA-Synthese beginnt. Die im BYL gewonnenen Daten fügen sich gut in dieses Modell ein.

Dass im BYL Translation und Replikation für TBSV nicht gekoppelt sind, ist von Vorteil. Bisher ist nicht bekannt, wie die virale RNA vom Translations-*template* zum Replikations-*template* wird. Vermutlich geschieht dies unter Beteiligung von Wirtsfaktoren. Die RNA-Bindung putativer Kandidaten kann somit im BYL getrennt unter Translations- oder Replikations-Bedingungen getestet werden. Zudem können Translationsansätze flexibler kombiniert werden.

4.2.3 Eignung des BYL zur Untersuchung der TBSV-Viruspartikel Assemblierung

Die Bildung der Viruspartikel erfolgt im Zytoplasma der infizierten Zelle. Gängige Strategien der Viruspartikel-Formierung sind entweder die Bestückung vorgeformter Partikel mit RNA oder die Zusammenlagerung der Hüll-Protein-Untereinheiten an einem RNA-Molekül (Rao *et al.*, 2006). Für das Carmovirus TCV, ein Vertreter der Familie *Tombusviridae*, konnte eine Sequenz am 3'-Ende der Hüll-Protein-codierenden Sequenz bestimmt werden, die als Ursprung der Viruspartikel-Assemblierung (OAS, *origin of assembly*) fungiert (Qu & Morris, 1997). Ein TCV-Viruspartikel gleicht in seinem Aufbau und seiner Struktur dem des TBSV (Golden & Harrison, 1982; Carrington *et al.*, 1987). Die Viruspartikel-Formierung konnte für TCV *in vitro* in einem Puffer nachgestellt werden, allerdings ausgehend von Hüll-Protein-Dimeren, die aus dissoziierten Viruspartikeln stammten (Sorger *et al.*, 1986). Diese Arbeit zeigte auch, dass RNA für die Partikel-Bildung nötig ist und die TCV-RNA effizienter verpackt wird als heterologe RNA.

Dass Viruspartikel-Assemblierung, mit der viralen RNA als Ausgangsmaterial, in einem *in vitro*-System möglich ist, wurde für *Poliovirus* gezeigt (Molla *et al.*, 1991). Ein zellfreier Extrakt aus Hela-Zellen diente zum indirekten Nachweis der Virion-Bildung, die abhängig von der Translation und RNA-Neusynthese war. Die Virionen konnten anhand der Nuklease-Resistenz von infektiöser, freier viraler RNA unterschieden werden.

Für TBSV wurde gezeigt, dass die Expression des Hüll-Proteins im Baculovirus-System in Insektenzellen zur Bildung von Viruspartikeln führt (Hsu *et al.*, 2006). Dabei wurde unspezifisch in der Zelle vorhandene RNA verpackt. Die Frage, ob in einer Konkurrenzsituation, d.h. wenn zelluläre und virale RNA verfügbar wären, selektiv TBSV-RNA verpackt würde, blieb jedoch offen. Zudem ist ungeklärt, ob für eine Selektivität eine

RNA-Sequenz oder -Struktur nötig ist, oder ob dies allein durch räumliche Nähe des Hüll-Proteins zu neu synthetisierter RNA geschieht.

Dem sollte nun mit Hilfe des BYL nachgegangen werden. Dafür waren mehrere Voraussetzungen zu erfüllen. Zum einen musste mit der Translation des p41 genügend Hüll-Protein zur Verfügung stehen, um eine messbare Anzahl an Viruspartikeln zu bilden. Die Menge an p41-Hüll-Protein, die im BYL bei der Translation von mRNA gebildet wurde, liegt geschätzt im fmol-Bereich (Abb.3-3). Für die Assemblierung eines Viruspartikels sind 180 p41-Moleküle nötig. Die Menge an p41 aus einer Translationsreaktion sollte theoretisch für ca. 3×10^9 Viruspartikel ausreichen. Diese Bedingung war also im BYL erfüllt.

Eine zweite Voraussetzung war, dass im BYL eventuell gebildete Viruspartikel stabil sind. Die Viruspartikel sollten unter den Ionenbedingungen im BYL und trotz der Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung, zum Abbau endogener RNAs, intakt bleiben.

In TBSV-Viruspartikeln wurden Bindungsstellen für divalente Kationen ausgemacht, wobei die Daten für Ca-Ionen sprechen (Harrison *et al.*, 1978; Hogle *et al.*, 1983). Ca-Ionen beeinflussten lediglich reversibel die Kompaktheit der Viruspartikel (Krüse *et al.*, 1982). Wurden TBSV-Viruspartikel in Ca-Ionen-freien Puffer überführt, zeigte sich eine Konformationsänderung innerhalb der Hüll-Protein-Untereinheiten, die eine Ausdehnung des Partikels von der geschlossenen in die offene Form bedingte. Der Partikel zerfiel aber nicht und gewährleistete weiterhin die Nuklease-Resistenz der verpackten RNA (Krüse *et al.*, 1982; Robinson & Harrison, 1982). Es ist demnach denkbar, dass sich die Viruspartikel zunächst über die RNA-Protein-Interaktion formieren und anschließend zur Erhöhung der Stabilität Ca-Ionen binden, so wie beispielsweise für das Sobemovirus *Sesbania mosaic virus* gezeigt (Satheshkumar *et al.*, 2004).

Für das *in vitro*-Translations-/Replikationssystem mit BYL gilt, dass TBSV-Viruspartikel die verpackte RNA vor Nukleasen schützen: Im BYL inkubierte Viruspartikel waren nach Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung elektronenmikroskopisch sichtbar und intakt (Abb. 3-21 E). Die virale RNA aus Viruspartikeln ließ sich außerdem auch nach Mikrokokkus-Nuklease- bzw. RNase A/T1-Behandlung per RT-PCR nachweisen, im Gegensatz zu freier RNA, d.h. *in vitro*-Transkripten (Abb. 3-23). Die Daten aus der Literatur konnten somit bestätigt werden und die zweite wichtige Voraussetzung für die weiteren Versuche war erfüllt.

Eine Übersicht über die Experimente, die zur Viruspartikel-Assemblierung im BYL durchgeführt wurden, gibt Tabelle 4-1 wieder.

Tab. 4-1: Übersicht über die Experimente zur Viruspartikel-Assemblierung im BYL

	I	II	III	IV
Translation	gTBSV p41	gTBSV p41 *gTBSV*	gTBSV p41	gTBSV p41
Replikation	-	-	gTBSV	gTBSV
Nuklease- Behandlung	-	+	+	-
Auswertung	Elektronen- mikroskop	Autoradiogramm, RT-PCR	Pflanzeninfektion, RT-PCR	Pflanzeninfektion mit verdünnten Translations- /Replikations- Ansätzen

Angegeben ist die in der Translation bzw. Replikation eingesetzte RNA

* = ^{32}P -markiertes *in vitro*-Transkript

Zum einen wurde ein direkter Nachweis versucht, für den gTBSV-RNA in Gegenwart von p41-mRNA kotranslatiert wurde (s.a. Tab. 4-1, I). Die elektronenmikroskopische Sichtung dieser Probe zeigte jedoch keine Viruspartikel-ähnlichen Strukturen (Abb. 3-22). Der direkte Nachweis einer TBSV-Viruspartikel-Bildung im BYL gelang demnach nicht. Ein Grund dafür könnte sein, dass diese Methode nicht sensitiv genug ist. Aus den Versuchen war nur eine geringe Menge an Viruspartikeln im BYL zu erwarten. Zudem könnten Viruspartikel während der Präparation verloren gegangen sein. In Kombination mit der schwachen Bindung des α -TBSV-Antikörpers an die Partikel (Abb. 3-22 A) war der Nachweis per Elektronenmikroskopie möglicherweise nicht ausreichend sensitiv. Ein indirekter Nachweis von Viruspartikeln mittels RT-PCR bzw. mittels Infektion von *N. benthamiana* Pflanzen, unter Ausnutzung der Nuklease-Resistenz, schien erfolgversprechender.

Die Versuche zum indirekten Nachweis umfassten zum einen Translationsversuche, bei denen p41-mRNA, bzw. eine Stop-Mutante der p41-mRNA als Kontrolle, im Beisein von gTBSV-RNA und markiertem gTBSV-Transkript translatiert wurde (s.a. Tab. 4-1, II). Die anschließende Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung sollte die freie RNA abbauen, sodass nur durch p41 geschützte RNA im Autoradiogramm als Bande detektierbar war. Sowohl aus dem Autoradiogramm als auch dem RT-PCR-Resultat (Abb. 3-24) lässt sich entnehmen, dass trotz Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung ein kurzer Bereich der RNA geschützt blieb. Allerdings war dies unabhängig vom Hüll-Protein. Eine für die Viruspartikel-Bildung nötige initiale Bindung des p41 an die RNA war somit unwahrscheinlich. Da die Mikrokokkus-Nuklease eine Präferenz für ssRNA hat, handelt es sich bei der detektierten RNA möglicherweise um dsRNA-Bereiche oder um von p33 und p92 gebundene Bereiche. Auch durch die Membran-gebundenen Replikationskomplexe wird die virale RNA geschützt (Pogany & Nagy, 2008).

Viruspartikel zeigten eine wesentlich höhere Infektiösität in *N. benthamiana* Pflanzen als freie, d.h. *in vitro* transkribierte RNA (Abb. 3-25, 3-26). Eine Menge an Viruspartikeln, die mindestens 117 fg gTBSV-RNA entsprach, konnte eine systemische Infektion auslösen. Es ist zu bedenken, dass bei der indirekten Bestimmung über die RNA-Menge während der Isolierungsprozedur RNA verloren gehen kann und der Wert somit höher liegen könnte. Dennoch ist für eine systemische Infektion mit freier RNA, d.h. mit *in vitro*-Transkripten, fast 10^6 Mal so viel RNA notwendig (s.a. Abb. 3-26).

Dies wurde für den Versuch, eine Viruspartikel-Bildung im BYL indirekt nachzuweisen, genutzt. *N. benthamiana*-Pflanzen wurden mit Translations-/Replikations-Ansätzen inokuliert. Durch die mitgeführten Kontrollansätze (s.a. Tab. 3-6) sollte unterschieden werden, ob und wie schnell eine systemische Infektion durch neu synthetisierte RNA oder die in die Reaktion eingesetzte Matrizen-RNA (*input*-RNA) hervorgerufen wurde. Dazu diente der Ansatz mit dem Replikationsinhibitor Quinacrine. Des Weiteren wurde durch die Reaktion in Anwesenheit des Hüll-Proteins und eine anschließende Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung ein Unterschied in der Infektiösität zwischen verpackter und freier RNA erwartet. Ein zeitlicher Unterschied im Auftreten einer systemischen Infektion war jedoch in dem hier untersuchten Zeitrahmen nicht festzustellen (Abb. 3-27). Eine häufigere Beprobung der infizierten Pflanzen zu früheren Zeitpunkten, verbunden mit weiteren Infektionskontrollen und mehr Material-Aufwand, hätte möglicherweise einen Unterschied erkennen lassen. Da überdies Mikrokokkus-Nuklease-behandelte Proben keine Infektion zeigten (Abb. 3-27), sprechen die Ergebnisse gegen die Bildung von Viruspartikel im Translations-/Replikations-Ansatz.

Zusätzliche Gewissheit sollte die Verdünnung von Translations-/Replikationsansätzen mit und ohne p41-Translation bringen. Die Verdünnung sollte die freie, unverpackte RNA unter die Infektionsgrenze bringen und verpackte RNA gleichzeitig infektiös lassen. Dabei konnte lediglich einer von drei Ansätzen, mit einer kalkulierten RNA-Menge von 1 ng, eine Infektion auslösen (Abb.3-28). Eine robuste Viruspartikel-Formierung war also nicht zu beobachten.

Die Bildung von Viruspartikeln im BYL konnte auch auf diese indirekte Weise nicht nachgewiesen werden. Ausschlaggebend dafür könnte sein, dass die Hüll-Protein-Untereinheiten einer co- bzw. posttranslationalen Modifikation bedürfen, die im BYL nicht möglich ist. In der Literatur finden sich dazu wenige Hinweise. Für mehrere Pflanzenviren, z.B. *Tobacco mosaic virus*, *Turnip yellow mosaic virus*, *Alfalfa mosaic virus*, *Brome mosaic virus* und auch TBSV wird eine N-Acetylierung des Hüll-Proteins erwähnt, jedoch keine biologische Funktion dafür beschrieben (Driessen *et al.*, 1985; Shih & Kaesberg, 1973;

Carrington *et al.*, 1987). Für das dsRNA-Virus *L-A-virus*, dessen Wirt Hefe ist, wurde indessen gezeigt, dass die Assemblierung von Viruspartikeln die Aktivität eines N-Acetyltransferase-homologen Gens in Hefe erfordert (Tercero & Wickner, 1992). Im BYL könnte die N-Acetylierung oder schon die notwendigerweise vorangehende Entfernung des N-terminalen Methionins (eine Metall-Ionen-abhängige Reaktion), durch z.B. EDTA oder andere inhibitorische Faktoren, unterbunden sein. Dies könnte wiederum eine Beeinträchtigung der Funktion des Hüll-Proteins, z.B. in der Protein-Protein-Interaktion, nach sich ziehen.

Auch weitere Modifikationen des Hüll-Proteins könnten eine Rolle spielen. Beispielsweise wird das Hüll-Protein des *Plum pox virus* (PPV) durch N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) und auch Phosphorylierung modifiziert. Die reversible Phosphorylierung könnte die Interaktion der O-GlcNAc-modifizierten Proteine und somit die Formation der Virionen regulieren (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung kann zudem die RNA-Bindung des Hüll-Proteins inhibieren, wie für *Potato virus A* gezeigt (Ivanov *et al.* 2003). Zudem könnte die Phosphorylierung anderer viraler Proteine eine indirekte Wirkung auf die Verpackung haben. Von dem engen TBSV-Verwandten CNV ist bekannt, dass p33 *in planta* im Laufe des Replikationszyklus phosphoryliert wird (Shapka *et al.*, 2005). Wie dies reguliert wird, ist nicht bekannt. Phosphoryliertes p33 bindet die virale RNA aber wesentlich weniger effizient (Stork *et al.*, 2005). Wenn p33 im BYL nicht phosphoryliert wird, könnte das die Freisetzung der RNA aus dem Replikase-Komplex hemmen, sodass die RNA für die Verpackung nicht verfügbar ist.

Eine weitere mögliche Ursache könnte in der Sekundärstruktur der RNA liegen. Für den MS2-Phagen, der Partikel mit T=3 Symmetrie ausbildet, konnte eine *stem loop*-Struktur der RNA identifiziert werden, die eine Konformationsänderung der Hüll-Protein-Dimere induziert. Ohne diese alternative Konformation der Dimere war keine Assemblierung möglich (Rolfsson *et al.*, 2008). Sofern für die Verpackung der TBSV-RNA eine RNA-Struktur oder/und die Größe der RNA entscheidend ist, ist es denkbar, dass die Faltung der RNA, unter den im BYL gegebenen Bedingungen, nicht verpackungsgerecht ist.

4.3 Aktivität der heterolog exprimierten TBSV RNA-abhängigen RNA Polymerase

Um eine Interaktion der TBSV-RNA mit der RdRP und putativen Wirtsfaktoren direkt untersuchen zu können, sollte in Ergänzung zum Translations-/Replikationssystem mit BYL

ein *in vitro* Polymerase-assay etabliert werden, unabhängig von pflanzlichem Extrakt. Dazu wurden die viralen Komponenten des TBSV-Replikase-Komplexes, p92 und p33, als rekombinante Proteine gereinigt.

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase des TBSV wird der *Supergroup II* der RdRPs zugeordnet, ebenso wie die RdRPs des *Hepatitis C virus* (HCV) und TCV (Koonin, 1991). Trotz der unterschiedlichen Genomorganisation und des ungleichen Wirtsspektrums eint die Mitglieder dieser Gruppe eine Sequenz-Ähnlichkeit konservierter Motive der RdRP, für die z.T. eine Konsensus-Sequenz abgeleitet werden konnte (Koonin, 1991).

Für die beiden Mitglieder dieser *Supergroup II*, TCV und HCV, ist es bereits gelungen, die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) heterolog zu exprimieren, zu reinigen und eine RdRP-Aktivität des rekombinanten Proteins zu messen (Song & Simon, 1994; Behrens *et al.*, 1996). Über Versuche, die RdRP des TBSV rekombinant zu gewinnen, sind in der Literatur keinerlei Angaben zu finden. Lediglich ein Hinweis, dass die TBSV-RdRP *in vitro* nicht aktiv sei, findet sich bei Stork *et al.*, 2011. Interaktionsstudien des p92 mit p33, Wirtsfaktoren oder der viralen RNA wurden wahrscheinlich deshalb mit p92 in Fusion mit dem Maltose-Binde-Protein oder als Deletionsvariante, ohne die N-terminale Transmembrandomäne, durchgeführt (Rajendran & Nagy, 2003; Li *et al.*, 2008). Auch auf das p92 des TBSV-Verwandten CNV wurde ersatzweise zurückgegriffen (Rajendran & Nagy, 2006).

In den hier unternommenen Versuchen konnte das TBSV-p92 weder als Fusionsprotein mit dem Maltose-Binde-Protein, noch als SUMO-Fusions-Protein löslich in *E. coli* exprimiert werden (siehe Abschnitt 3.2.2.5). Das Protein wurde demzufolge aus *inclusion bodies* solubilisiert und renaturiert. Durch den Zusatz von 0,2% (w/v) Triton X-100 zum Natrium-Phosphat-Puffer konnte die Konzentration an löslichem p92 erhöht und auf ein detektierbares Niveau gebracht werden. Triton X-100 steigerte in einer Konzentration von bis zu 1% die Aktivität der HCV-Polymerase des Genotyps 1b (Weng *et al.*, 2012) und die Aktivität der RdRP des Klons HC-J4 (Cramer, 2004).

Die p92-Präparation des TBSV zeigte im *in vitro* Polymerase-assay eine Terminale-Nukleotidyl-Transferase-Aktivität (TNTase). Das GDD-Motiv (katalytisches Zentrum) einer RdRP ist sowohl für die RNA-Synthese essentiell als auch für die Terminale Nucleotidyl-Transferase-Aktivität, wie für die HCV-RdRP gezeigt wurde (Ranjith-Kumar *et al.*, 2001). Die TNTase-Aktivität deutet demnach darauf hin, dass grundsätzlich die Renaturierung des p92 aus *inclusion bodies* erfolgreich war. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Aktivität auf eine Kontamination aus der p92-Präparation zurückzuführen ist. Allerdings haben auch die Pufferbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität einer

RdRP, wie für die HCV-Polymerase festgestellt wurde. Bei einer NaCl-Konzentration von 90-100 mM wurde eine Zunahme an unspezifischem Nukleotideinbau festgestellt. Die *de novo*-Synthese von RNA sank dagegen bei 50 -100 mM NaCl auf 35% ab, verglichen mit der Aktivität ohne NaCl (Cramer, 2004).

Die TBSV-RdRP konnte gar nicht oder nur unter enormen Verlusten in Puffer ohne NaCl, wie z.B. der Puffer, in dem die TCV-RdRP aktiv war, zurückgefaltet werden. Für den TBSV-Polymerase-assay wurde daher zugunsten einer möglichst hohen p92-Konzentration eine hohe NaCl-Konzentration in Kauf genommen. Diese lag, errechnet aus den Pufferzusammensetzungen, bei knapp 200 mM und war damit möglicherweise zu hoch für eine RNA-RdRP-Interaktion bzw. begünstigte die TNTase-Aktivität. Aufgrund der geringen Konzentration des p92 in der Präparation konnten keine RNA-Bindungsstudien durchgeführt werden.

Denkbar ist zudem, dass für die Polymerase-Aktivität des p92 ein akzessorischer Faktor, der im Replikase-Komplex des TBSV vorliegt, nötig ist. Ein putativer Kandidat schien p33 zu sein. p33 weist RNA-Chaperon-Aktivität auf. RNA-Chaperone bewirken Strukturänderungen der RNA. Für p33 wird also eine Rolle bei der Aufwindung von RNA-Sekundärstrukturen angenommen, um sie so für die Polymerase zugänglich zu machen. Allerdings ist die Aktivität des p33 an der DI(+)-RNA schwach (Stork *et al.*, 2011). Dies könnte erklären, warum p33 als rekombinantes Protein im *in vitro* Polymerase-assay keine stimulierende Wirkung mit dem DI(+)-*template* zeigte (Abb. 3-32). Möglicherweise ist ein Wirtsfaktor für die Aktivität des p92 als Polymerase statt TNTase entscheidend. Dies könnte eEF1A sein. eEF1A konnte die RNA-Synthese-Aktivität der TCV-RdRP in einem extraktfreien *in vitro assay* bis zu 5-fach steigern, wenn der Elongationsfaktor mit der RdRP präinkubiert wurde (Li *et al.*, 2010). Als Matrize wurde ein Teil der TBSV 3'UTR (+) eingesetzt und die Synthese des komplementären Stranges überprüft.

Lohnenswert für zukünftige Versuche wäre vermutlich, die Pufferbedingungen des *assays* zu ändern, insbesondere bezüglich der NaCl-Konzentration und auch des Verhältnisses von Mg- und Mn-Ionen. Der Ersatz von Triton X-100 im Puffer durch bis zu 20% Glycerin könnte ebenfalls hilfreich sein. Möglicherweise könnte die TNTase-Aktivität der TBSV-RdRP im *in vitro assay* zugunsten der RNA-Synthese verschoben werden, wenn p33 mit der RdRP oder der RNA präinkubiert würde. Auch der Einsatz von rekombinant gereinigtem eEF1A könnte dabei vielversprechend sein.

5. Zusammenfassung

Plusstrang-RNA-Pflanzenviren sind für ihren Replikationszyklus auf zahlreiche Interaktionen mit dem Wirt angewiesen. Viele Details sind davon noch unverstanden. Für die Untersuchung von Pflanzenviren sind *in vitro*-Systeme von Vorteil, da sie synchronisierte Bedingungen für die Translation und Replikation des viralen RNA-Genoms schaffen. Für das Modellvirus *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) standen lediglich Hefebasierte *in vitro*-Systeme oder *assays* mit vorassemblierten Replikase-Komplexen eines verwandten Tombusvirus zur Verfügung. Erst durch ein Lysat, das aus evakuolisierten Tabak-Zellen gewonnen wurde (BYL), eröffnete sich die Möglichkeit, ein authentisches *in vitro*-System für TBSV zu etablieren. Erste Versuche zur TBSV-Replikation mit *defective interfering*-RNA (DI-RNA) machten dieses Lysat zu einem vielversprechenden Untersuchungssystem für den TBSV-Replikationszyklus.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften des BYL als *in vitro*-Untersuchungssystem optimiert und näher charakterisiert. Eine Anforderung an das *in vitro*-System ist eine hohe *template*-Spezifität. Versuche mit verschiedenen Matrizen machten deutlich, dass diese Bedingung im BYL für TBSV erfüllt wird. Die Replikation konnte nicht an der (-)-Strang-RNA initiiert werden.

Replikations-Versuche mit TBSV-Mutanten zeigten, dass das System für genetische Studien geeignet ist. Die bedeutende Rolle des *replication silencer element* für die Replikation konnte bestätigt werden. Dessen postulierte Funktion als Inhibitor der Minusstrang-Synthese wurde jedoch nicht bestätigt. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass eine effiziente Replikation ohne simultane Translation möglich ist. Dieses Ergebnis ist für weitere Versuche wichtig, da es Replikationsstudien unabhängig von der Proteinsynthese erleichtert. Neben der DI-RNA war auch die gesamtgenomische TBSV-RNA zur Replikation im BYL fähig. Ein weiterer Schritt des viralen Infektionszyklus, die Assemblierung von Viruspartikeln, konnte im BYL dagegen nicht beobachtet werden.

Die Erkenntnisse zur TBSV-Replikation im BYL, die durch die Experimente im *in vitro*-System gewonnen wurden, bildeten die Grundlage für weitere Studien zur Virus-Wirt-Interaktion, wie die antivirale Immunantwort.

Zur Komplementierung des BYL-Systems wurde versucht, einen Polymerase-*assay* mit rekombinanter, gereinigter RdRP des TBSV aufzubauen. In ersten *assays* zeigte das renaturierte Protein terminale Nukleotidyl-Transferase-Aktivität. Optimierungsversuche zur Proteinreinigung und den *assay*-Bedingungen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

6. Literaturverzeichnis

- Annamalai, P., and Rao, A. L. N. (2005). Replication-independent expression of genome components and capsid protein of Brome mosaic virus in planta: A functional role for viral replicase in RNA packaging. *Virology* **338**(1), 96-111.
- Aramayo, R., Merigoux, C., Larquet, E., Bron, P., Perez, J., Dumas, C., Vachette, P., and Boisset, N. (2005). Divalent ion-dependent swelling of tomato bushy stunt virus: a multi-approach study. *Biochimica et Biophysica Acta* **1724**(3), 345-54.
- Ball, L.A. (2007) Virus replication strategies. In *Fields Virology* (D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman & S.E. Straus, Eds) 5th edition. 119-140. Wolters Kluwer Health, Philadelphia, USA
- Behrens, S. E., Tomei, L., and DeFrancesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of Hepatitis C virus. *Embo Journal* **15**(1), 12-22.
- Beier, H., and Grimm, M. (2001). Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs. *Nucleic Acids Research* **29**(23), 4767-4782.
- Bjerum, O.J. and Schafer-Nielsen, C. (1986). Analytical Electrophoresis, M.J. Dunn ed., p.315; Verlag Chemie, Weinheim
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-54.
- Bringloe, D. H., Pleij, C. W. A., and Coutts, R. H. A. (1999). Mutation analysis of cis-elements in the 3' - and 5' -untranslated regions of satellite Tobacco necrosis virus strain C RNA. *Virology* **264**(1), 76-84.
- Carrington, J. C., Morris, T. J., Stockley, P. G., and Harrison, S. C. (1987). Structure and Assembly of Turnip Crinkle Virus .4. Analysis of the Coat Protein Gene and Implications of the Subunit Primary Structure. *Journal of Molecular Biology* **194**(2), 265-276.
- Cheng, C. P., Jaag, H. M., Jonczyk, M., Serviène, E., and Nagy, P. D. (2007). Expression of the Arabidopsis Xrn4p 5'-3' exoribonuclease facilitates degradation of tombusvirus RNA and promotes rapid emergence of viral variants in plants. *Virology* **368**(2), 238-48.
- Choi, S. K., Hema, M., Gopinath, K., Santos, J., and Kao, C. (2004). Replicase-binding sites on plus- and minus-strand Brome mosaic virus RNAs and their roles in RNA replication in plant cells. *Journal of Virology* **78**(24), 13420-13429.
- Choi, I. R., and White, K. A. (2002). An RNA activator of subgenomic mRNA1 transcription in Tomato bushy stunt virus. *The Journal of Biological Chemistry* **277**(5), 3760-6.
- Cramer, J. (2004). Funktionelle Charakterisierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des Hepatitis-C-Virus. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- Desvoves, B., and Scholthof, H. B. (2002). Host-dependent recombination of a Tomato bushy stunt virus coat protein mutant yields truncated capsid subunits that form virus-like complexes which benefit systemic spread. *Virology* **304**(2), 434-442.
- Diaz, A., Wang, X. F., and Ahlquist, P. (2010). Membrane-shaping host reticulon proteins play crucial roles in viral RNA replication compartment formation and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(37), 16291-16296.
- Driessen, H. P. C., Dejong, W. W., Tesser, G. I., and Bloemendal, H. (1985). The Mechanism of N-Terminal Acetylation of Proteins. *Crc Critical Reviews in Biochemistry* **18**(4), 281-325.
- Eskelin, K., Hafren, A., Rantalainen, K. I., and Makinen, K. (2011). Potyviral VPg Enhances Viral RNA Translation and Inhibits Reporter mRNA Translation In Planta. *Journal of Virology* **85**(17), 9210-9221.

- Fabian, M. R., and White, K. A. (2004). 5'-3' RNA-RNA interaction facilitates cap- and poly(A) tail-independent translation of Tomato bushy stunt virus mRNA - A potential common mechanism for Tombusviridae. *Journal of Biological Chemistry* **279**(28), 28862-28872.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editor. (2005). Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. London: Elsevier/Academic Press
- Fernandez-Fernandez, M. R., Camafeita, E., Bonay, P., Mendez, E., Albar, J. P., and Garcia, J. A. (2002). The capsid protein of a plant single-stranded RNA virus is modified by O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry* **277**(1), 135-140.
- Galao, R. P., Chari, A., Alves-Rodrigues, I., Lobao, D., Mas, A., Kambach, C., Fischer, U., and Diez, J. (2010). LSm1-7 complexes bind to specific sites in viral RNA genomes and regulate their translation and replication. *RNA-a Publication of the RNA Society* **16**(4), 817-827.
- Gallie, D. R. (2001). Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *Journal of Virology* **75**(24), 12141-12152.
- Gamarnik, A. V., and Andino, R. (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes & Development* **12**(15), 2293-2304.
- Gazo, B. M., Murphy, P., Gatchel, J. R., and Browning, K. S. (2004). A novel interaction of cap-binding protein complexes eukaryotic initiation factor (eIF) 4F and eIF(iso)4F with a region in the 3'-untranslated region of satellite tobacco necrosis virus. *Journal of Biological Chemistry* **279**(14), 13584-13592.
- Golden, J. S., and Harrison, S. C. (1982). Proteolytic Dissection of Turnip Crinkle Virus Subunit in Solution. *Biochemistry* **21**(16), 3862-3866.
- Guo, L., Allen, E. M., and Miller, W. A. (2001). Base-pairing between untranslated regions facilitates translation of uncapped, nonpolyadenylated viral RNA. *Molecular Cell* **7**(5), 1103-1109.
- Gursinsky, T., Schulz, B., and Behrens, S. E. (2009). Replication of Tomato bushy stunt virus RNA in a plant in vitro system. *Virology* **390**(2), 250-260.
- Harrison, S. C., Olson, A. J., Schutt, C. E., Winkler, F. K., and Bricogne, G. (1978). Tomato bushy stunt virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **276**(5686), 368-73.
- Hayes, R. J., and Buck, K. W. (1990). Complete Replication of a Eukaryotic Virus-RNA In vitro by a Purified RNA-Dependent RNA-Polymerase. *Cell* **63**(2), 363-368.
- Hearne, P. Q., Knorr, D. A., Hillman, B. I., and Morris, T. J. (1990). The complete genome structure and synthesis of infectious RNA from clones of Tomato bushy stunt virus. *Virology* **177**(1), 141-151.
- Hillman, B. I., Carrington, J. C., and Morris, T. J. (1987). A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. *Cell* **51**(3), 427-433.
- Hogle, J., Kirchhausen, T., and Harrison, S. C. (1983). Divalent-Cation Sites in Tomato Bushy Stunt Virus - Difference Maps at 2.9 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **171**(1), 95-100.
- Hsu, C., Singh, P., Ochoa, W., Manayani, D. J., Manchester, M., Schneemann, A., and Reddy, V. S. (2006). Characterization of polymorphism displayed by the coat protein mutants of Tomato bushy stunt virus. *Virology* **349**(1), 222-229.
- Hu, B., Pillai-Nair, N., and Hemenway, C. (2007). Long-distance RNA-RNA interactions between terminal elements and the same subset of internal elements on the potato virus X genome mediate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA-a Publication of the RNA Society* **13**(2), 267-280.
- Hull, R. (2009). Comparative plant virology, second edition. Elsevier Academic Press, London, UK
- Ivanov, K. I., Puustinen, P., Gabrenaite, R., Vihinen, H., Ronnstrand, L., Valmu, L., Kalkkinen, N., and Makinen, K. (2003). Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection. *Plant Cell* **15**(9), 2124-2139.

- Jaag, H. M., Lu, Q. S., Schmitt, M. E., and Nagy, P. D. (2011). Role of RNase MRP in Viral RNA Degradation and RNA Recombination. *Journal of Virology* **85**(1), 243-253.
- Jaag, H. M., and Nagy, P. D. (2009). Silencing of *Nicotiana benthamiana* Xrn4p exoribonuclease promotes tombusvirus RNA accumulation and recombination. *Virology* **386**(2), 344-352.
- Jiang, Y., Serviene, E., Gal, J., Panavas, T., and Nagy, P. D. (2006). Identification of essential host factors affecting tombusvirus RNA replication based on the yeast Tet promoters Hughes Collection. *Journal of Virology* **80**(15), 7394-404.
- Knorr, D. A., Mullin, R. H., Hearne, P. Q., and Morris, T. J. (1991). De novo generation of defective interfering RNAs of Tomato bushy stunt virus by high multiplicity passage. *Virology* **181**(1), 193-202.
- Komoda, K., Naito, S., and Ishikawa, M. (2004). Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(7), 1863-1867.
- Koonin, E. V. (1991). The Phylogeny of RNA-Dependent RNA-Polymerases of Positive-Strand RNA Viruses. *Journal of General Virology* **72**, 2197-2206.
- Krab, I. M., Caldwell, C., Gallie, D. R., and Bol, J. F. (2005). Coat protein enhances translational efficiency of Alfalfa mosaic virus RNAs and interacts with the eIF4G component of initiation factor eIF4F. *Journal of General Virology* **86**, 1841-1849.
- Kruse, J., Kruse, K. M., Witz, J., Chauvin, C., Jacrot, B., and Tardieu, A. (1982). Divalent Ion-Dependent Reversible Swelling of Tomato Bushy Stunt Virus and Organization of the Expanded Virion. *Journal of Molecular Biology* **162**(2), 393-414.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* **227**(5259), 680-685.
- Lee, W. M., and Ahlquist, P. (2003). Membrane synthesis, specific lipid requirements, and localized lipid composition changes associated with a positive-strand RNA virus RNA, replication protein. *Journal of Virology* **77**(23), 12819-12828.
- Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., and Laliberte, J. F. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology* **74**(17), 7730-7737.
- Li, Z. H., Pogany, J., Tupman, S., Esposito, A. M., Kinzy, T. G., and Nagy, P. D. (2010). Translation Elongation Factor 1A Facilitates the Assembly of the Tombusvirus Replicase and Stimulates Minus-Strand Synthesis. *Plos Pathogens* **6**(11).
- Li, Z., Pogany, J., Panavas, T., Xu, K., Esposito, A. M., Kinzy, T. G., and Nagy, P. D. (2009). Translation elongation factor 1A is a component of the tombusvirus replicase complex and affects the stability of the p33 replication co-factor. *Virology* **385**(1), 245-260.
- Li, Z. H., Barajas, D., Panavas, T., Herbst, D. A., and Nagy, P. D. (2008). Cdc34p ubiquitin-conjugating enzyme is a component of the tombusvirus replicase complex and ubiquitinates p33 replication protein. *Journal of Virology* **82**(14), 6911-6926.
- Lin, H. X., and White, K. A. (2004). A complex network of RNA-RNA interactions controls subgenomic mRNA transcription in a tombusvirus. *Embo Journal* **23**(16), 3365-3374.
- Lucas, W. J. (2006). Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* **344**(1), 169-184.
- Lucchesi, J., Makelainen, K., Merits, A., Tamm, T., and Makinen, K. (2000). Regulation of-1 ribosomal frameshifting directed by Cocksfoot mottle sobemovirus genome. *European Journal of Biochemistry* **267**(12), 3523-3529.
- MacFarlane, S. A., and McGavin, W. J. (2009). Genome activation by Raspberry bushy dwarf virus coat protein. *Journal of General Virology* **90**, 747-753.
- Matsuda, D., and Dreher, T. W. (2004). The tRNA-like structure of Turnip yellow mosaic virus RNA is a 3'-translational enhancer. *Virology* **321**(1), 36-46.
- Matsuda, D., Yoshinari, S., and Dreher, T. W. (2004). eEF1A binding to aminoacylated viral RNA represses minus strand synthesis by TYMV RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **321**(1), 47-56.
- Mayer, M. P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences* **62**(6), 670-84.

- Mayo, M. A., Jolly, C. A., Murant, A. F., and Raschke, J. H. (1991). Nucleotide-Sequence of Raspberry Bushy Dwarf Virus RNA-3. *Journal of General Virology* **72**, 469-472.
- McCartney, A. W., Greenwood, J. S., Fabian, M. R., White, K. A., and Mullen, R. T. (2005). Localization of the Tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *Plant Cell* **17**(12), 3513-3531.
- Miller, W.A. & Giedroc, D.P. (2010) Ribosomal Frameshifting in Decoding Plant Viral RNAs. in: Atkins, J.E., & Gesteland, R.F., eds. (2010) Recoding: Expansion in Decoding Rules Enriches Gene Expression. *Nucleic Acids and Molecular Biology* **24**, Springer, NY, pp. 192-220.
- Miller, W. A., Wang, Z., and Treder, K. (2007). The amazing diversity of cap-independent translation elements in the 3'-untranslated regions of plant viral RNAs. *Biochemical Society Transactions* **35**, 1629-1633.
- Miller, W. A., and Koev, G. (2000). Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* **273**(1), 1-8.
- Miroux, B., and Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in Escherichia coli: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology* **260**(3), 289-298.
- Molla, A., Paul, A. V., and Wimmer, E. (1991). Cell-Free, Denovo Synthesis of Poliovirus. *Science* **254**(5038), 1647-1651.
- Murota, K., Hagiwara-Komoda, Y., Komoda, K., Onouchi, H., Ishikawa, M., and Naito, S. (2011). Arabidopsis Cell-Free Extract, ACE, a New In Vitro Translation System Derived from Arabidopsis Callus Cultures. *Plant and Cell Physiology* **52**(8), 1443-1453.
- Nagy, P. D., and Pogany, J. (2012). The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nature Reviews Microbiology* **10**(2), 137-149.
- Nagy, P. D., Wang, R. Y., Pogany, J., Hafren, A., and Makinen, K. (2011). Emerging picture of host chaperone and cyclophilin roles in RNA virus replication. *Virology* **411**(2), 374-382.
- Nagy, P. D., and Pogany, J. (2000). Partial purification and characterization of Cucumber necrosis virus and Tomato bushy stunt virus RNA-dependent RNA polymerases: similarities and differences in template usage between tombusvirus and carmovirus RNA-dependent RNA polymerases. *Virology* **276**(2), 279-288.
- Nicholson, B. L., Zaslaver, O., Mayberry, L. K., Browning, K. S., and White, K. A. (2013). Tombusvirus Y-Shaped Translational Enhancer Forms a Complex with eIF4F and Can Be Functionally Replaced by Heterologous Translational Enhancers. *Journal of Virology* **87**(3), 1872-1883.
- Nicholson, B. L., and White, K. A. (2008). Context-influenced cap-independent translation of Tombusvirus mRNAs in vitro. *Virology* **380**(2), 203-212.
- Nishikiori, M., Dohi, K., Mori, M., Meshi, T., Naito, S., and Ishikawa, M. (2006). Membrane-bound Tomato mosaic virus replication proteins participate in RNA synthesis and are associated with host proteins in a pattern distinct from those that are not membrane bound. *Journal of Virology* **80**(17), 8459-8468.
- Noueiry, A. O., Diez, J., Falk, S. P., Chen, J. B., and Ahlquist, P. (2003). Yeast Lsm1p-7p/Pat1p deadenylation-dependent mRNA-decapping factors are required for brome mosaic virus genomic RNA translation. *Molecular and Cellular Biology* **23**(12), 4094-4106.
- Novak, J. E., and Kirkegaard, K. (1994). Coupling between Genome Translation and Replication in an RNA Virus. *Genes & Development* **8**(14), 1726-1737.
- Ohki, T., Uematsu, S., Lesemann, D.E., Honda, Y., Tsuda, S., Fujisawa, I. (2005). Characterization of Tomato bushy stunt virus newly isolated from nipplefruit (*Solanum mammosum*) in Japan. *Journal of General Plant Pathology* **71**(1), 74-79.
- Osman, T. A. M., and Buck, K. W. (1997). The Tobacco mosaic virus RNA polymerase complex contains a plant protein related to the RNA-Binding subunit of yeast eIF-3. *Journal of Virology* **71**(8), 6075-6082.

- Panavas, T., Hawkins, C. M., Panaviene, Z., and Nagy, P. D. (2005a). The role of the p33 : p33/p92 interaction domain in RNA replication and intracellular localization of p33 and p92 proteins of Cucumber necrosis tobravirus. *Virology* **338**(1), 81-95.
- Panavas, T., Serviene, E., Brasher, J., and Nagy, P. D. (2005b). Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(20), 7326-7331.
- Panavas, T., and Nagy, P. D. (2003). Yeast as a model host to study replication and recombination of defective interfering RNA of Tomato bushy stunt virus. *Virology* **314**(1), 315-25.
- Panavas, T., Pogany, J., and Nagy, P. D. (2002a). Analysis of minimal promoter sequences for plus-strand synthesis by the Cucumber necrosis virus RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **296**(2), 263-274.
- Panaviene, Z., Panavas, T., and Nagy, P. D. (2005). Role of an internal and two 3'-terminal RNA elements in assembly of tobravirus replicase. *Journal of Virology* **79**(16), 10608-10618.
- Panaviene, Z., Panavas, T., Serva, S., and Nagy, P. D. (2004). Purification of the Cucumber necrosis virus replicase from yeast cells: Role of coexpressed viral RNA in stimulation of replicase activity. *Journal of Virology* **78**(15), 8254-8263.
- Panaviene, Z., Baker, J. M., and Nagy, P. D. (2003). The overlapping RNA-binding domains of p33 and p92 replicase proteins are essential for tobravirus replication. *Virology* **308**(1), 191-205.
- Pathak, K. B., and Nagy, P. D. (2009). Defective Interfering RNAs: Foes of Viruses and Friends of Virologists. *Viruses-Basel* **1**(3), 895-919.
- Pathak, K. B., Pogany, J., Xu, K., White, K. A., and Nagy, P. D. (2012). Defining the Roles of cis-Acting RNA Elements in Tobravirus Replicase Assembly In Vitro. *Journal of Virology* **86**(1), 156-171.
- Penzel, A. (2009). Rekombinante Darstellung der Replikase und eines Wirtsfaktors des Tomato bushy stunt virus zur Durchführung viraler Replikationsstudien. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Pogany, J., and Nagy, P. D. (2008). Authentic replication and recombination of Tomato bushy stunt virus RNA in a cell-free extract from yeast. *Journal of Virology* **82**(12), 5967-5980.
- Pogany, J., White, K. A., and Nagy, P. D. (2005). Specific binding of tobravirus replication protein p33 to an internal replication element in the viral RNA is essential for replication. *Journal of Virology* **79**(8), 4859-4869.
- Pogany, J., Fabian, M. R., White, K. A., and Nagy, P. D. (2003). A replication silencer element in a plus-strand RNA virus. *Embo Journal* **22**(20), 5602-5611.
- Qu, F., and Morris, T. J. (1997). Encapsidation of Turnip crinkle virus is defined by a specific packaging signal and RNA size. *Journal of Virology* **71**(2), 1428-1435.
- Qu, F., and Morris, T. J. (2002). Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol Plant Microbe Interact* **15**(3), 193-202.
- Quadt, R., Kao, C. C., Browning, K. S., Hershberger, R. P., and Ahlquist, P. (1993). Characterization of a Host Protein Associated with Brome Mosaic-Virus RNA-Dependent RNA-Polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(4), 1498-1502.
- Rajendran, K. S., and Nagy, P. D. (2006). Kinetics and functional studies on interaction between the replicase proteins of Tomato Bushy Stunt Virus: requirement of p33:p92 interaction for replicase assembly. *Virology* **345**(1), 270-279.
- Rajendran, K. S., and Nagy, P. D. (2004). Interaction between the replicase proteins of Tomato bushy stunt virus in vitro and in vivo. *Virology* **326**(2), 250-261.
- Rajendran, K. S., and Nagy, P. D. (2003). Characterization of the RNA-binding domains in the replicase proteins of tomato bushy stunt virus. *Journal of Virology* **77**(17), 9244-58.

- Rajendran, K. S., Pogany, J., and Nagy, P. D. (2002). Comparison of Turnip crinkle virus RNA-dependent RNA polymerase preparations expressed in *Escherichia coli* or derived from infected plants. *Journal of Virology* **76**(4), 1707-1717.
- Ranjith-Kumar, C. T., Gajewski, J., Gutshall, L., Maley, D., Sarisky, R. T., and Kao, C. C. (2001). Terminal nucleotidyl transferase activity of recombinant Flaviviridae RNA-dependent RNA polymerases: Implication for viral RNA synthesis. *Journal of Virology* **75**(18), 8615-8623.
- Rao, A. L. N. (2006). Genome packaging by spherical plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 61-87.
- Ray, D., and White, K. A. (2003). An internally located RNA hairpin enhances replication of Tomato bushy stunt virus RNAs. *Journal of Virology* **77**(1), 245-257.
- Ray, D., Wu, B., and White, K. A. (2003). A second functional RNA domain in the 5' UTR of the Tomato bushy stunt virus genome: intra- and interdomain interactions mediate viral RNA replication. *RNA* **9**(10), 1232-1245.
- Ray, S., Yumak, H., Domashevskiy, A., Khan, M. A., Gallie, D. R., and Goss, D. J. (2006). Tobacco etch virus mRNA preferentially binds wheat germ eukaryotic initiation factor (eIF) 4G rather than eIFiso4G. *Journal of Biological Chemistry* **281**(47), 35826-35834.
- Robinson, I. K., and Harrison, S. C. (1982). Structure of the Expanded State of Tomato Bushy Stunt Virus. *Nature* **297**(5867), 563-568.
- Rolfsson, O., Toropova, K., Morton, V., Francese, S., Basnak, G., Thompson, G. S., Homans, S. W., Ashcroft, A. E., Stonehouse, N. J., Ranson, N. A., and Stockley, P. G. (2008). RNA packing specificity and folding during assembly of the bacteriophage MS2. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* **9**(3-4), 339-349.
- Salvador, B., García, J. A. and Simón-Mateo, C. (2006). Causal agent of sharka disease: *Plum pox virus* genome and function of gene products. *EPPO Bulletin* **36**, 229-238.
- Sambrook and Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sasvari, Z., Izotova, L., Kinzy, T. G., and Nagy, P. D. (2011). Synergistic Roles of Eukaryotic Translation Elongation Factors 1B gamma and 1A in Stimulation of Tombusvirus Minus-Strand Synthesis. *Plos Pathogens* **7**(12).
- Satheshkumar, P. S., Lokesh, G. L., and Savithri, H. S. (2004). Polyprotein processing: cis and trans proteolytic activities of Sesbania mosaic virus serine protease. *Virology* **318**(1), 429-438.
- Scholthof, K. B. G., Scholthof, H. B., and Jackson, A. O. (1995). The Tomato Bushy Stunt Virus Replicase Proteins Are Coordinately Expressed and Membrane-Associated. *Virology* **208**(1), 365-369.
- Schuck, J., Gursinsky, T., Pantaleo, V., Burgyan, J., and Behrens, S. E. (2013) AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system. *Nucleic Acids Research* **41**(9), 5090-103.
- Serva, S., and Nagy, P. D. (2006). Proteomics analysis of the tombusvirus replicase: Hsp70 molecular chaperone is associated with the replicase and enhances viral RNA replication. *Journal of Virology* **80**(5), 2162-2169.
- Shapka, N., Stork, J., and Nagy, P. D. (2005). Phosphorylation of the p33 replication protein of Cucumber necrosis tombusvirus adjacent to the RNA binding site affects viral RNA replication. *Virology* **343**(1), 65-78.
- Shepherd, C. M., Borelli, I. A., Lander, G., Natarajan, P., Siddavanahalli, V., Bajaj, C., Johnson, J. E., Brooks, C. L., and Reddy, V. S. (2006). VIPERdb: a relational database for structural virology. *Nucleic Acids Research* **34**, D386-D389.
- Shih, D. S., and Kaesberg, P. (1973). Translation of Brome Mosaic Viral Ribonucleic-Acid in a Cell-Free System Derived from Wheat Embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**(6), 1799-1803.

- Song, C. Z., and Simon, A. E. (1994). RNA-Dependent RNA-Polymerase from Plants Infected with Turnip Crinkle Virus Can Transcribe (+)-Strands and (-)-Strands of Virus-Associated RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(19), 8792-8796.
- Sorger, P. K., Stockley, P. G., and Harrison, S. C. (1986). Structure and Assembly of Turnip Crinkle Virus .2. Mechanism of Reassembly In vitro. *Journal of Molecular Biology* **191**(4), 639-658.
- Stork, J., Kovalev, N., Sasvari, Z., and Nagy, P. D. (2011). RNA chaperone activity of the tombusviral p33 replication protein facilitates initiation of RNA synthesis by the viral RdRp in vitro. *Virology* **409**(2), 338-347.
- Stork, J., Panaviene, Z., and Nagy, P. D. (2005). Inhibition of in vitro RNA binding and replicase activity by phosphorylation of the p33 replication protein of Cucumber necrosis tombusvirus. *Virology* **343**(1), 79-92.
- Sun, X. P., and Simon, A. E. (2006). A cis-replication element functions in both orientations to enhance replication of Turnip crinkle virus. *Virology* **352**(1), 39-51.
- Tanner, N. K. (1999). Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs. *Fems Microbiology Reviews* **23**(3), 257-275.
- Tercero, J. C., and Wickner, R. B. (1992). Mak3 Encodes an N-Acetyltransferase Whose Modification of the L-A gag NH2 Terminus Is Necessary for Virus Particle Assembly. *Journal of Biological Chemistry* **267**(28), 20277-20281.
- van Dijk, A. A., Makeyev, E. V., and Bamford, D. H. (2004). Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. *Journal of General Virology* **85**, 1077-1093.
- van Regenmortel, M. H. V., and Mahy, B. W. J. (2004). Emerging issues in virus taxonomy. *Emerging Infectious Diseases* **10**(1), 8-13.
- Verhagen, W., and Bol, J. F. (1972). Evidence for a pH-Induced Structural Change of Alfalfa Mosaic Virus. *Virology* **50**(2), 431-439.
- Wang, S., Mortazavi, L., and White, K. A. (2008). Higher-order RNA structural requirements and small-molecule induction of tombusvirus subgenomic mRNA transcription. *Journal of Virology* **82**(8), 3864-71.
- Wang, R. Y. L., Stork, J., and Nagy, P. D. (2009). A Key Role for Heat Shock Protein 70 in the Localization and Insertion of Tombusvirus Replication Proteins to Intracellular Membranes. *Journal of Virology* **83**(7), 3276-3287.
- Wells, D. R., Tanguay, R. L., Le, H., and Gallie, D. R. (1998). HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Genes & Development* **12**(20), 3236-3251.
- Weng, L. Y., Kohara, M., Wakita, T., Shimotohno, K., and Toyoda, T. (2012). Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene* **496**(2), 79-87.
- White, K. A., and Morris, T. J. (1994). Nonhomologous RNA Recombination in Tombusviruses - Generation and Evolution of Defective Interfering RNAs by Stepwise Deletions. *Journal of Virology* **68**(1), 14-24.
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M. G., and Laliberte, J. F. (1997). Interaction of the viral protein genome linked of Turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of Arabidopsis thaliana using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**(1), 84-92.
- Wu, B. D., Pogany, J., Na, H., Nicholson, B. L., Nagy, P. D., and White, K. A. (2009). A Discontinuous RNA Platform Mediates RNA Virus Replication: Building an Integrated Model for RNA-based Regulation of Viral Processes. *Plos Pathogens* **5**(3).
- Wu, B., and White, K. A. (1999). A primary determinant of cap-independent translation is located in the 3'-proximal region of the tomato bushy stunt virus genome. *Journal of Virology* **73**(11), 8982-8988.
- Xiang, S., Cooper-Morgan, A., Jiao, X. F., Kiledjian, M., Manley, J. L., and Tong, L. (2009). Structure and function of the 5' to 3' exoribonuclease Rat1 and its activating partner Rai1. *Nature* **458**(7239), 784-U130.

- Yamamura, Y., and Scholthof, H. B. (2005). Tomato bushy stunt virus: a resilient model system to study virus-plant interactions. *Molecular Plant Pathology* **6**(5), 491-502.
- Yamanaka, T., Imai, T., Satoh, R., Kawashima, A., Takahashi, M., Tomita, K., Kubota, K., Meshi, T., Naito, S., and Ishikawa, M. (2002). Complete inhibition of tobamovirus multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes. *Journal of Virology* **76**(5), 2491-2497.
- Yi, G., Letteney, E., Kim, C. H., and Kao, C. C. (2009). Brome mosaic virus capsid protein regulates accumulation of viral replication proteins by binding to the replicase assembly RNA element. *RNA-a Publication of the RNA Society* **15**(4), 615-626.
- Yuan, X., Shi, K., Meskauskas, A., and Simon, A. E. (2009). The 3' end of Turnip crinkle virus contains a highly interactive structure including a translational enhancer that is disrupted by binding to the RNA-dependent RNA polymerase. *RNA* **15**(10), 1849-64.
- Zhang, J. C., Stuntz, R. M., and Simon, A. E. (2004). Analysis of a viral replication repressor: sequence requirements for a large symmetrical internal loop. *Virology* **326**(1), 90-102.
- Ziegler, A., Mayo, M. A., and Murrant, A. F. (1993). Proposed Classification of the Bipartite-Genomed Raspberry Bushy Dwarf Idaeovirus, with Tripartite-Genomed Viruses in the Family Bromoviridae. *Archives of Virology* **131**(3-4), 483-488.

7. Anhang

Tab-AI: Übersicht über die Virus-Taxonomie der Plusstrang-RNA-Viren

Es sind alle Ordnungen der Plusstrang-RNA-Viren mit allen dazugehörigen Familien aufgeführt. Vertreter der Pflanzenviren sind außerdem mit Gattung und Spezies aufgeführt. Die in dieser Arbeit erwähnten Viren sind mit Abkürzung aufgeführt. Zusätzlich sind die in dieser Arbeit erwähnten Vertreter nicht-pflanzlicher Plusstrang-RNA-Viren mit Gattung und Spezies aufgeführt. Der namensgebende Vertreter einer Gattung ist fett gedruckt.

V = Vertebraten, IV = Invertebraten, P = Pflanzen, eMO = eukaryotische Mikroorganismen, B = Bakterien, n.b. = nicht benannt

Familie (Anzahl der Gattungen)	Wirt	Gattung (Anzahl der Spezies)	Spezies	Ab- kürzung
Ordnung Nidovirales				
<i>Arteriviridae</i> (1)	V	(4)		
<i>Coronaviridae</i> (6)	V	(25)		
<i>Roniviridae</i> (1)	IV	(1)		
Ordnung Picornavirales				
<i>Dicistroviridae</i> (2)	IV	(15)		
<i>Iflarviridae</i> (1)	IV	(7)		
<i>Marnaviridae</i> (1)	P	<i>Marnavirus</i> (1)	<i>Heterosigma akashiwo RNA virus</i>	
<i>Picornaviridae</i> (12)	V	(29) z.B. <i>Enterovirus</i>	<i>Human enterovirus C (Poliovirus)</i>	PV
<i>Secoviridae</i> (8)	P	<i>Comovirus</i> (15)	<i>Cowpea mosaic virus</i>	CPMV
	P	<i>Fabavirus</i> (4)	<i>Broad bean wilt virus 1</i>	
	P	<i>Nepovirus</i> (35)	<i>Tobacco ringspot virus</i>	
	P	<i>Cheravirus</i> (3)	<i>Cherry rasp leaf virus</i>	
	P	<i>Sadwavirus</i> (1)	<i>Satsuma dwarf virus</i>	
	P	<i>Sequivirus</i> (3)	<i>Parsnip yellow fleck virus</i>	
	P	<i>Torradovirus</i> (2)	<i>Tomato torrado virus</i>	
	P	<i>Waikavirus</i> (3)	<i>Rice tungro spherical virus</i>	
	P	n.b. (3)	<i>Strawberry mottle virus</i>	
n.b. (2)	eMO	(4)		
Ordnung Tymovirales				
<i>Alphaflexiviridae</i> (6)	P	<i>Allexivirus</i> (8)	<i>Shallot virus X</i>	
	P	<i>Lolavirus</i> (1)	<i>Lolium latent virus</i>	
	P	<i>Mandarinivirus</i> (1)	<i>Indian citrus ringspot virus</i>	
	P	<i>Potexvirus</i> (35)	<i>Potato virus X</i>	PVX
	eMO	(2)		
<i>Betaflexiviridae</i> (7)	P	<i>Capillovirus</i> (2)	<i>Apple stem grooving virus</i>	
	P	<i>Carlavirus</i> (43)	<i>Carnation latent virus</i>	
	P	<i>Citrivirus</i> (1)	<i>Citrus leaf blotch virus</i>	
	P	<i>Foveavirus</i> (4)	<i>Apple stem pitting virus</i>	
	P	<i>Tepovirus</i> (1)	<i>Potato virus T</i>	
	P	<i>Trichovirus</i> (5)	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	
	P	<i>Vitivirus</i> (6)	<i>Grapevine virus A</i>	
	P	n.b. (5)	<i>Banana mild mosaic virus</i>	
<i>Gammaflexiviridae</i> (1)	eMO	(1)		
<i>Tymoviridae</i> (3)	P	<i>Maculavirus</i> (1)	<i>Grapevine fleck virus</i>	
	P	<i>Marafivirus</i> (7)	<i>Maize rayado fino virus</i>	
	P	<i>Tymovirus</i> (26)	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>	TYMV
	IV, P	n.b. (2)	<i>Poinsettia mosaic virus</i>	
Ordnung n.b.				
<i>Alphatetraviridae</i> (2)	IV	(10)		
<i>Astroviridae</i> (2)	V	(22)		

Familie (Anzahl der Gattungen)	Wirt	Gattung (Anzahl der Spezies)	Spezies	Ab- kürzung
<i>Barnaviridae</i> (1)	eMO	(1)		
<i>Bromoviridae</i> (6)	P	<i>Alfavirus</i> (1)	<i>Alfalfa mosaic virus</i>	AMV
	P	<i>Anulavirus</i> (1)	<i>Pelargonium zonate spot virus</i>	
	P	<i>Bromovirus</i> (6)	<i>Brome mosaic virus</i>	BMV
	P	<i>Cucumovirus</i> (4)	<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV
	P	<i>Ilarvirus</i> (19)	<i>Tobacco streak virus</i>	
	P	<i>Oleavirus</i> (1)	<i>Olive latent virus 2</i>	
<i>Carmotetraviridae</i> (1)	IV	(1)		
<i>Caliciviridae</i> (5)	V	(7)		
<i>Closteroviridae</i> (3)	P	<i>Ampelovirus</i> (8)	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>	
	P	<i>Closterovirus</i> (11)	<i>Beet yellows virus</i>	
	P	<i>Crinivirus</i> (12)	<i>Lettuce infectious yellows virus</i>	
	P	n.b. (6)	<i>Little cherry virus 1</i>	
<i>Flaviviridae</i> (3)	V	(58) z.B. <i>Flavivirus</i> <i>Hepacivirus</i>	<i>West Nile Virus</i> <i>Hepatitis C virus</i>	WNV HCV
<i>Hepeviridae</i> (1)	V	(1)		
<i>Leviviridae</i> (2)	B	(4)		
<i>Luteoviridae</i> (3)	P	<i>Enamovirus</i> (1)	<i>Pea enation mosaic virus-1</i>	
	P	<i>Luteovirus</i> (6)	<i>Barley yellow dwarf virus-PAV</i>	BYDV-PAV
	P	<i>Polerovirus</i> (13)	<i>Potato leafroll virus</i>	
	P	n.b. (8)	<i>Barley yellow dwarf virus-GPV</i>	BYDV-GPV
<i>Narnaviridae</i> (2)	eMO	(7)		
<i>Nodaviridae</i> (2)	V	(9)		
<i>Permutotetraviridae</i> (1)	IV	(1)		
<i>Potyviridae</i> (8)	P	<i>Brambyvirus</i> (1)	<i>Blackberry virus Y</i>	
	P	<i>Bymovirus</i> (6)	<i>Barley yellow mosaic virus</i>	
	P	<i>Ipomovirus</i> (5)	<i>Sweet potato mild mottle virus</i>	
	P	<i>Macluravirus</i> (6)	<i>Maclura mosaic virus</i>	
	P	<i>Poacevirus</i> (2)	<i>Triticum mosaic virus</i>	
	P	<i>Potyvirus</i> (146)	<i>Plum pox virus</i>	PPV
			<i>Potato virus A</i>	PVA
			<i>Potato virus Y</i>	
			<i>Tobacco etch virus</i>	TEV
			<i>Turnip mosaic virus</i>	TuMV
	P	<i>Rymovirus</i> (3)	<i>Ryegrass mosaic virus</i>	
	P	<i>Tritimovirus</i> (4)	<i>Wheat streak mosaic virus</i>	
	P	n.b. (2)	<i>Tomato mild mottle virus</i>	
<i>Togaviridae</i> (2)	V	(30)		
<i>Tombusviridae</i> (8)	P	<i>Aureusvirus</i> (4)	<i>Pothos latent virus</i>	
	P	<i>Avenavirus</i> (1)	<i>Oat chlorotic stunt virus</i>	
	P	<i>Carmovirus</i> (20)	<i>Carnation mottle virus</i>	
	P		<i>Turnip crinkle virus</i>	TCV
	P	<i>Dianthovirus</i> (3)	<i>Carnation ringspot virus</i>	
	P	<i>Machlomovirus</i> (1)	<i>Maize chlorotic mottle virus</i>	
	P	<i>Necrovirus</i> (7)	<i>Tobacco necrosis virus A</i>	
	P		<i>Satellite tobacco necrosis virus</i>	STNV
	P	<i>Panicovirus</i> (2)	<i>Panicum mosaic virus</i>	
	P	<i>Tombusvirus</i> (17)	<i>Carnation Italian ringspot virus</i>	CIRV
			<i>Cucumber necrosis virus</i>	CNV
			<i>Tomato bushy stunt virus</i>	TBSV
	P	n.b. (2)	<i>Maize necrotic streak virus</i>	

Familie (Anzahl der Gattungen)	Wirt	Gattung (Anzahl der Spezies)	Spezies	Ab- kürzung
Virgaviridae (6)	P	<i>Furovirus</i> (6)	<i>Soil-borne wheat mosaic virus</i>	
	P	<i>Hordeivirus</i> (4)	<i>Barley stripe mosaic virus</i>	
	P	<i>Pecluvirus</i> (2)	<i>Peanut clump virus</i>	
	P	<i>Pomovirus</i> (4)	<i>Potato mop-top virus</i>	
	P	<i>Tobamovirus</i> (25)	<i>Tobacco mosaic virus</i>	TMV
	P		<i>Tomato mosaic virus</i>	ToMV
	P	<i>Tobravirus</i> (3)	<i>Tobacco rattle virus</i>	
n.b. (7)	P	<i>Benyvirus</i> (2)	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>	
	P	<i>Cilevirus</i> (1)	<i>Citrus leprosis virus C</i>	
	P	<i>Idaeovirus</i> (1)	<i>Raspberry bushy dwarf virus</i>	RBDV
	P	<i>Ourmiavirus</i> (3)	<i>Ourmia melon virus</i>	
	P	<i>Polemovirus</i> (1)	<i>Poinsettia latent virus</i>	
	P	<i>Sobemovirus</i> (14)	<i>Cocksfoot mottle virus</i>	CfMV
			<i>Rice yellow mottle virus</i>	RYMV
			<i>Rubus chlorotic mottle virus</i>	RuCMV
			<i>Sesbania mosaic virus</i>	SeMV
			<i>Southern bean mosaic virus</i>	
	P	<i>Umbravirus</i> (7)	<i>Carrot mottle virus</i>	

Die Daten sind der Virus-Taxonomie-Liste des ICTV entnommen
(<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>) und der Quelle viralzone expasy
(http://viralzone.expasy.org/all_by_species/294.html).

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Sven-Erik Behrens für die Möglichkeit dieses vielfältige Thema in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu dürfen, bedanken, für die Betreuung der Arbeit und die vielen Anregungen und die stetige Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt allen, die Pflanzen, Suspensionskulturen, Konstrukte und andere Materialien zur Verfügung gestellt haben.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Torsten Gursinky für die unzähligen wesentlichen Tips, Anregungen und die unermüdliche und geduldige Unterstützung, ohne die die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Dr. Gerd Hause und Simone Jahn danke ich für die zuverlässige und wunderbar unkomplizierte Zusammenarbeit zur elektronenmikroskopischen Analyse von möglichen Viruspartikeln.

Für die großen und kleinen Tips und Hilfen bei der Proteinexpression und –reinigung bedanke ich mich bei PD Dr. Ralph Golbik sowie Stefan Reich, Paul Knick und Susann Friedrich. Ihr danke ich besonders für die Fortführung der Polymerase-*assay*-Versuche.

Allen Mitarbeitern der AG Mikrobielle Biotechnologie, vor allem Labor 513, möchte ich für die angenehme Arbeits-Atmosphäre und Unterstützung in so vieler Hinsicht danken. Auch den Mitarbeitern der AG Allgemeine Biochemie danke ich für die freundliche Zusammenarbeit.

Ein Dank geht auch an Claudia Müller für den Einsatz bei den Pflanzentransporten und Dr. Carolin Delker für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Außerdem danke ich den Korrekturlesern für die investierte Zeit und Mühe.

Ein besonders großer Dank geht an meine Familie und Freunde für all den Rückhalt.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Beate Schulz

Geburtsdatum, -ort: 04.02.1978, Berlin

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

1997: Abitur am Alexander-von-Humboldt-Gymnasium, Berlin

Ausbildung:

08/ 1997 – 07/ 2000: Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin an der Lise-Meitner-Fachoberschule, Berlin

10/ 2000 – 04/ 2006: Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Abschlussprüfungen: Genetik, Pflanzenphysiologie, Mikrobiologie, Biochemie

Berufliche Tätigkeit und Promotion:

08/ 2006 – 12/2010: Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Mikrobielle Biotechnologie, Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

01/2011 – 04/2012 wissenschaftliche Hilfskraft am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie

seit 06/2013 angestellt bei Analytikum Umweltlabor GmbH

bis 08/ 2013 Verfassen der Dissertation über die Replikation von Plusstrang-RNA-Viren in einem *in vitro*-System

Publikation:

Gursinsky, T., Schulz, B., and Behrens, S. E. (2009). Replication of *Tomato bushy stunt virus* RNA in a plant *in vitro* system. *Virology* 390(2), 250-260.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen aufgeführt sind. Den Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass ich mich mit dieser Arbeit erstmalig um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Halle/Saale,

Beate Schulz