
Sektion 33 - Molekulare Phytomedizin / Diagnose- und Nachweisverfahren

33-1 - Dierker, L.; von Bargaen, S.; Büttner, C.

Humboldt-Universität zu Berlin

Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen im Wirt-Pathogen-System *Arabidopsis thaliana*/Cherry leaf roll virus

Identification of protein-protein-interactions in the host-pathogen-system Arabidopsis thaliana/Cherry leaf roll virus

Das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) der Gattung Nepovirus ist weltweit in einer Vielzahl krautiger und holziger Wirtspflanzenarten vertreten. Die natürliche Verbreitung kann vertikal durch das Saatgut und horizontal durch den Pollen erfolgen. Etwa 20 % aller Pflanzenviren sind durch das Saatgut übertragbar (Maule and Wang, 1996), so dass dieser Übertragungsweg eine große epidemiologische Relevanz besitzt. Die molekularen Mechanismen sind bisher nur wenig untersucht. Untersuchungen aus dem Jahr 2009 konnten eine Übertragung von CLRV durch das Saatgut von *Arabidopsis thaliana* über mehrere Generationen nachweisen (Rumbou et al., 2009). Es wird vermutet, dass neben dem viralen Transportprotein (MP, 385 aa, 42 kDa) auch das Hüllprotein (CP, 512 aa, 56 kDa) an der Ausbreitung in der Pflanze beteiligt ist.

Zur Identifizierung von pflanzlichen Proteinen, die an den multiplen Virus-Pflanze-Interaktionen während der Infektion des meristematischen Gewebes und der Samenentwicklung beteiligt sind, wird das Hefe Zwei-Hybrid System (YTHS) in Verbindung mit dem Modellsystem CLRV/*A. thaliana* verwendet. Beide viralen Proteine wurden als Köder zur Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek von *A. thaliana* cv. Columbia (Nemeth et al., 1998) eingesetzt. Bisher wurden 37 potentiell positive pflanzliche Interaktionspartner des CLRV-MP über Selektion mit den Reporter genen HIS3 und LacZ gefunden. In ersten Untersuchungen mit dem viralen CP wurden zwei Transformanten positiv auf die Reportergene getestet. Plasmide, die für potentielle pflanzliche Interaktionspartner kodieren, werden aus Hefe isoliert und sollen nach Sequenzierung mittels Daten-bankabgleich (NCBI) identifiziert werden. Zudem konnte eine spezifische Interaktion des Proteins At-4/1 aus *A. thaliana* mit dem CLRV-MP, nicht aber mit dem CP detektiert werden. Das Protein At-4/1 ist sowohl mit dem Endoplasmatischen Reticulum assoziiert als auch an den Plasmodesmata lokalisiert und vermittelt spezifisch den intra- und interzellulären Transport des *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, Paape et al., 2006). Beide Viren nutzen die MP-vermittelte Ausbreitung in der Wirtspflanze entlang tubulärer Strukturen, so dass gleiche Transportmechanismen denkbar sind.

Literatur:

- MAULE, A.J., WANG, D., 1996: Seed transmission of plant viruses: a lesson in biological complexity. *Trends in Microbiology* 4, 153-158.
- NEMETH, K., SALCHERT, K., PUTNOKY, P., BHALERAO, R., KONCZ-KALMAN, Z., STANKOVIC-STANGELAND, B., BAKO, L., MATHUR, J., OKRESZ, L., STABEL, S., GEIGENBERGER, P., STITT, M., REDEI, G.P., SCHELL, J., KONCZ, C., 1998: Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 12, 3059-3073.
- PAAPE, M., SOLOVYEV, A.G., EROKHINA, T., MININA, E.A., SCHEPETILNIKOV, M.Y., LESEMAN, D.-E., SCHIEMAN, J., MOROZOV, S.Y., KELLMANN, J.-W., 2006: At-4/1, an interactor of the *Tomato spotted wilt virus* movement protein, belongs to a new family of plant proteins capable of directed intra- and intercellular trafficking. *Mol Plant Microbe Interact* 19, 874-883.
- RUMBOU, A., VON BARGEN, S., BÜTTNER, C., 2009. A model system for plant-virus interaction – infectivity and seed transmission of *Cherry leaf roll virus* (CLRV) in *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Plant Pathology* 124, 527-532.

33-2 - Robel, J.¹⁾; Dieckmann, L.¹⁾; Mühlbach, H.-P.²⁾; von Bargaen, S.¹⁾; Büttner, C.¹⁾

¹⁾ Humboldt-Universität zu Berlin

²⁾ Universität Hamburg

Genetische Variabilität der Nucleocapsidprotein (p3)- und der p4-kodierenden Genomregion des *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) aus *Sorbus aucuparia* L. verschiedener europäischer Standorte

Genetic variability of the nucleocapsid protein (p3)- and p4-coding region of European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) in Sorbus aucuparia L. of various European regions

Das *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) konnte 2005 mit der Ringfleckigkeit der Eberesche assoziiert werden (Benthack et al., 2005), wenig später wurde das gesamte Genom charakterisiert (Mielke und Mühlbach, 2007). Jede RNA des viergeteilten ss(-)RNA-Genoms kodiert für ein Protein. Durch Sequenzver-

gleiche gelang die Zuweisung der möglichen Funktionen der Proteine, die von den ersten drei RNAs kodiert werden. Die RNA4 kodiert für ein Protein (p4, 233 aa), das keine Sequenzähnlichkeiten zu bisher bekannten Proteinen aufweist. Es wird vermutet, dass es sich bei diesem Protein um ein Transport-Protein handelt, das an der systemischen Ausbreitung in der Pflanze bzw. bei der Übertragung durch die als Vektor vermutete Gallmilbe *Phytoptus pyri* beteiligt sein könnte.

Bisher wurde die Variabilität des Nucleocapsid (NC)-kodierenden Genombereichs (RNA3) von EMARaV-Varianten verschiedener Standorte in Finnland und Russland untersucht und eine hohe Konservierung des Nucleocapsids (97 - 99 %) gezeigt (Kallinen et al., 2009, Valkonen und Rännäli 2010). Analog dazu wird die Variabilität des p4 untersucht und mit den bisherigen Ergebnissen diskutiert.

In den Jahren 2010 und 2011 wurden Proben von Ebereschen verschiedener europäischer Standorte mit charakteristischen Symptomen entnommen und die RNA3 sowie die p4-kodierende Genomregion mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA amplifiziert. Die generierten Produkte von insgesamt achtzehn Ebereschen wurden im Anschluss sequenziert und die Variabilität des Nicht-Strukturproteins p4 mit der Variabilität des NC-Proteins von EMARaV auf Nucleotid- und Aminosäureebene verglichen.

Literatur

- BENTHACK, W., MIELKE, N., BÜTTNER, C., MÜHLBACH, H.-P., 2005: Double-stranded RNA pattern and partial sequence data indicate plant virus infection associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *Arch Virol* 150:37-52.
- KALLINEN, A. K., LINDBERG, I. L., TUGUME, A. K., VALKONEN, J. P. T., 2008: Detection, Distribution, and Genetic Variability of *European mountain ash ringspot-associated virus*. *Phytopathology* 99, 344-352.
- MIELKE, N., MUEHLBACH, H.-P., 2007: A novel, multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *J Gen Virol* 88, 1337-1346.
- VALKONEN, J. P. T., RÄNNÄLI, M., 2010: First Report of *European mountain ash ringspot-associated virus* in *Sorbus aucuparia* from Eastern Karelia, Russia. *Disease Notes* 94 (7), 921.

33-3 - Nutz, S.; Rabenstein, F.; Kühne, T.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

Entwicklung einer immunologischen Nachweismethode für Kartoffelviren mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz

Development of an immuno-based detection method for potato viruses via Surface Plasmon Resonance

Der Nachweis von Viren in Pflanzkartoffeln mittels ELISA (Enzyme-linked Immunoassay) ist das immunologische Standardverfahren im Zertifizierungsprozess. Allerdings kann mit einem ELISA immer nur ein Pathogen pro Reaktion nachgewiesen werden. Zudem ist dieser Nachweis zeitaufwändig, da mehrstündige Einwirkzeiten der Antikörper- und Blockierungslösungen sowie die Inkubation der zu untersuchenden Probe über Nacht in den meisten Protokollen vorgesehen sind.

Eine alternative Methode, die spezifische Bindung von Viruspartikeln an homologe Antikörper zu detektieren, stellt die Oberflächen-Plasmonenresonanz (SPR)-Technologie dar. Dabei werden die spezifischen Antikörper an eine Goldfläche auf einem Chip gebunden. Wird virushaltiger Pflanzensaft über diesen Chip gespült, werden die Viruspartikel von den Antikörpern gebunden: hierdurch erhöht sich die Schichtdicke auf der Goldfläche, zudem kommt es dort zu einer Änderung des Brechungsindex. Während einer Messung mit einem SPR-Spektrometer wird gerichtetes Licht in einem bestimmten Winkel von unten auf die Goldfläche gestrahlt. Dadurch kommt es zur Anregung freier Elektronen an der Oberfläche des Metallionengitters, welche kollektiv zu schwingen beginnen. Diese Schwingungen werden als Oberflächenplasmonen bezeichnet. Die Frequenz dieser Schwingungen wird vom Brechungsindex und von der Schichtdicke der auf der Oberfläche der Metallfläche gebundenen Substanz beeinflusst. Änderungen der Schwingungsfrequenz, beispielweise durch Anbindung eines Viruspartikels an den homologen Antikörper auf der Metalloberfläche, können mit einem SPR-Spektrometer gemessen werden. So wird ein immunologischer Virusnachweis möglich, bei dem die Herstellung markierter Antikörper entfällt. Durch den direkten Nachweis der Bindung des Antigens an den Antikörper ist ein Nachweis innerhalb von 1 bis 2 h möglich, da die Inkubations- und Reaktionsschritte entfallen, die beim ELISA nötig sind.

Bei Verwendung von Mehrkanal-Flusszellen können parallel verschiedene Antikörper auf einem Chip immobilisiert werden. Dadurch wird der simultane Nachweis mehrerer Pathogene, so z. B. von verschiedenen Kartoffelviren in einer Probe möglich.

Nach Etablierung eines entsprechenden Regenerierungsverfahrens bestünde zudem die Möglichkeit, einen Chip mehrfach zu nutzen.