

Aus dem Department für Nutzpflanzenwissenschaften,  
Abteilung Pflanzenvirologie  
der Georg-August-Universität Göttingen

Untersuchungen zur Interaktion des  
Pathogenitätsfaktors P25 des  
beet necrotic yellow vein virus mit  
Proteinen der Zuckerrübe (*Beta vulgaris L.*)

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Agrarwissenschaften  
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Heike Thiel  
geboren in Gehrden

Göttingen, Dezember 2008

## **D 7**

1. Referent: Prof. Dr. Mark Varrelmann

2. Korreferent: Prof. Dr. Heiko Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2009

## I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>II. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Kapitel 1: Allgemeine Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Die Zuckerrübe.....	1
1.1.1. Taxonomie und Geschichte.....	1
1.1.2. Zuckerrübenanbau in Deutschland .....	1
1.1.3. Ziele in der Zuckerrübenzüchtung.....	2
1.1.4. Rizomania-Resistenzzüchtung.....	3
1.2. Rizomania im Zuckerrübenanbau .....	5
1.2.1. Beet necrotic yellow vein virus und sein Vektor <i>Polomyxa betae</i> .....	7
1.2.2. Variabilität und weltweite Verbreitung .....	7
1.2.3. Pathogenitätsfaktor P25 – Einfluss, Tetradenkompositionen und dessen Bedeutung .....	9
1.3. Methoden zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen .....	10
1.3.1. „Yeast two-hybrid“ Systeme .....	11
1.3.2. Schwierigkeiten und Adaptionen von Yeast two-hybrid Systemen .....	13
1.3.3. Systeme für die Bestätigung von Protein-Protein Interaktionen .....	15
1.3.4. Untersuchungen von Protein-Protein Interaktionen zur Charakterisierung von Virus-Wirt-Beziehungen .....	18
1.4. Zielstellung dieser Arbeit.....	21
<b>Kapitel 2: Molecular Biology of the Beet necrotic yellow vein virus .....</b>	<b>22</b>
ABSTRACT .....	22
INTRODUCTION.....	23
RHIZOMANIA DISEASE .....	24
BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS.....	25
PATHOGENICITY .....	35
CONCLUSIONS.....	43
ACKNOWLEDGEMENTS .....	43
REFERENCES.....	44
<b>Kapitel 3: Identification of beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor interacting sugar beet proteins which represent putative virus targets or components of plant resistance.....</b>	<b>60</b>

ABSTRACT .....	60
INTRODUCTION.....	61
RESULTS.....	64
DISCUSSION.....	74
MATERIALS AND METHODS .....	78
ACKNOWLEDGEMENTS .....	84
LITERATURE CITED .....	84
<b>Kapitel 4: Beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor interacts with a sugar beet F-box protein from resistant and susceptible genotypes involved in the induction of a hypersensitive resistance response .....</b>	<b>97</b>
ABSTRACT .....	97
INTRODUCTION.....	98
MATERIAL AND METHODS.....	101
RESULTS.....	105
DISCUSSION.....	116
ACKNOWLEDGEMENTS: .....	120
REFERENCES.....	121
<b>Kapitel 5: Diskussion .....</b>	<b>130</b>
5.1. Beurteilung des Yeast two-hybrid Systems als Screening-Methode zur Identifizierung von Proteininteraktionen.....	130
5.2. Eignung des "Bimolecular fluorescence complementation assay" zur Interaktionsüberprüfung .....	133
5.3. Screening des zweiten (virus) Pathogenitätsfaktors P26 des BNYVV .....	135
5.4. Eine Beteiligung des F-box Kandidaten an der Virusresistenz? .....	137
5.5. Möglichkeiten für die weitere Charakterisierung von P25 interagierenden cDNA Kandidaten .....	143
5.6. Ausblick.....	151
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>155</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>159</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>176</b>
8.1. Construction of a random primed normalized cDNA library from <i>Beta vulgaris</i> ..	176
<b>Danksagung.....</b>	<b>181</b>

<b>Verzeichnis der Publikationen und Tagungsbeiträge .....</b>	<b>183</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>186</b>

## **II. Abkürzungsverzeichnis**

%	Prozent
Abb.	Abbildung
ACRE	„Avr9/Cf-9 rapidly elicited“
As	Aminosäure
AD	DNA aktivierende Domäne
ANX	„Annexin repeats“
ARM	„Armadillo/beta-catenin-like repeats“
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Avr	Avirulenzgen
BAC	„bacterial artificial chromosome“
BD	DNA bindende Domäne
BiFC	„bimolecular fluorescence complementation“
B2H	„bacterial two-hybrid“
BCMV	bean common mosaic virus
BNYVV	beet necrotic yellow virus
BSBMV	beet soil-borne mosaic virus
BWYV	beet western yellows virus
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMV	cauliflower mosaic virus
cM	Zentimorgan
CMS	Cytoplasmatische männliche Sterilität
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
<i>C. quinoa</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>
<i>C. papaya</i>	<i>Carica papaya</i>
CP	„coat protein“ (Hüllprotein)

d.h.	das heißt
ER	extreme Resistenz
engl.	englisch
Etc.	Etcetera
FRET	„fluorescence resonance energy transfer“

<i>G. hirsutum</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>
GFP	„green fluorescent protein“
ggf	gegebenenfalls
GST	Glutathion-S-Transferase
GUS	β-Glucuronidase

HA	Haemagglutinin
HR	Hypersensitive Reaktion

IAA	„Indole-3-Acetic Acid“
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IV	Imperial Valley

Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

LRR	„leucine rich repeat“
LRR-Extensin	„leucine rich repeat family/extensin family protein“

Mb	Megabasen
M2H	„mammalian two-hybrid“
Mio.	Million
mRFP	„monomeric red fluorescent protein“

NBS	„nucleotide binding site“
NES	„nuclear export signal“

NLS	„nuclear localization signal“
n	Anzahl
nm	nanometer
o.a.	oben aufgeführt
<i>P. betae</i>	<i>Polymxa betae</i>
PSBMV	pea seed-borne mosaic virus
PVX	potato virus X
PR	„pathogenesis related“
QTL	„quantitative trait loci“
<i>r</i>	Resistenzgen, rezessiv
<i>R</i>	Resistenzgen, dominant
RDV	rice dwarf virus
RAPD	„random amplified polymorphic DNA“
RFLP	„restriction fragment length polymorphism“
RGA	„resistance gene analogues“
RNAi	RNA-Interferenz
RNA	Ribonukleinsäure
SAR	„systemic acquired resistance“
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCF	SKP1, Cullin1, F-box
SSCP	„single strand conformation polymorphism“
ssp.	Subspezies
t	Tonne
TCV	turnip crinkle virus
TIP	TCV-interagierendes Protein
TMV	tobacco mosaic virus
TOC1	„timing of cab expression“

---

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

TRV	tobacco rattle virus
u.a.	unter anderem
UAS	„upstream activating sequence“
var.	Varietät
VPg	„virus protein, genome linked“
Y3H	„yeast three-hybrid“
YFP	„yellow fluorescent protein“
YTH	„yeast two-hybrid“
z.B.	zum Beispiel
ZTL	Zeitlupe
z.T.	zum Teil

## Kapitel 1: Allgemeine Einleitung

### 1.1. Die Zuckerrübe

#### 1.1.1. Taxonomie und Geschichte

Die Zuckerrübe ist eine der jüngsten Kulturpflanzen Europas. Die Kulturart *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* stammt vermutlich ursprünglich von der Wildform *Beta vulgaris* ssp. *maritima* ab (Oltmann *et al.*, 1984). Sie gliedert sich in die Familie der *Chenopodiaceae* ein und gehört zur Gattung *Beta* L. Die Gattung unterteilt sich in die vier systematische Sektionen *Beta*, *Corollinae*, *Nanae* und *Procumbentes* (Ford-Lloyd *et al.*, 1975; Letschert *et al.*, 1994). Aus Sicht der landwirtschaftlichen Nutzung gilt die Sektion *Beta* aufgrund ihrer verschiedenen Kulturformen als die Bedeutendste. Neben der Zuckerrübe *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *altissima*, gehören auch die Kulturpflanzen Mangold (*B. vulgaris cicla*), Rote Beete (*B. vulgaris conditiva*) und Futterrüben (*B. vulgaris crassa*) zu dieser Gattung.

Ende des siebzehnten Jahrhunderts wurden die mit wichtigsten Erkenntnisse in der Geschichte der ackerbaulichen Zuckerrübennutzung gemacht. Der Physiker Andreas Sigismund Marggraf entdeckte in Roter Beete und Runkelrübe süßschmeckende Kristalle, die in ihrer Zusammensetzung mit denen des Zuckerrohrs identisch waren. Der Zuckerertrag dieser Rüben war sehr gering. Franz Carl Achard, ein Schüler Marggrafs, schuf durch phänotypische Selektion Rüben mit höherem Zuckerertrag und es wird vermutet, dass durch die natürliche Kreuzung von Mangold und Futterrübe die zuckerreiche Form, die „Weiße schlesische Rübe“ entstand (Draycott, 1991) Die heute verfügbaren Zuckerrübensorten gehen auf diese gezüchtete schlesische Rübe (de Bock, 1986) zurück. Durch diese Grundlagenforschung konnten die heute im Anbau befindlichen, ertragsreichen Zuckerrüben mit einem Zuckergehalt von ca. 16-18 % gezüchtet werden.

#### 1.1.2. Zuckerrübenanbau in Deutschland

Die Zuckerrübe ist eine zweijährige Kulturpflanze, die im ersten Jahr der Anbauperiode nach ausreichender Speicherwurzelbildung geerntet wird. Dabei lagern die Zuckerrüben in den gebildeten Speicherwurzeln Kohlenhydrate in Form von Saccharose ein.

Die landwirtschaftlich bewirtschaftete Fläche in Deutschland betrug im Jahr 2007 insgesamt 11,9 Mio. ha. Dabei wurden mehr als 50% des Ackerlandes mit Getreide als größter Anbaugruppe bewirtschaftet. Hackfrüchte stellen nur einen kleinen Teil von knapp 6% dar, von der Zuckerrübenanbau 3,3% (~ 390.000 ha Anbaufläche) ausmacht. Die Zuckererzeugung im Zeitraum 2007/2008 erreichte eine Gesamtmenge von 4 Mio. t, was einen 20%igen Mehrertrag zum Vorjahr bedeutet (Wirtschaftliche Vereinigung Zucker, 2008). In Norddeutschland konnte trotz des Inkrafttretens der europäischen Zuckermarktordnung von 2005 eine Erhöhung der Zuckerrübenanbaufläche von 20% zum vorherigen Anbaujahr erreicht werden. Weitere Verwendungsmöglichkeiten, wie die Herstellung von Bioethanol und eine mögliche Perspektive zur Erzeugung von Biogas, weisen auf die zukünftige Wettbewerbsfähigkeit der Zuckerrübe hin (Spicher, 2008).

### **1.1.3. Ziele in der Zuckerrübenzüchtung**

Zuckerrüben sind selbstinkompatible Fremdbefruchter mit einem haploiden Chromosomensatz von  $n = x = 9$  und einer geschätzten Genomgröße von ca. 714-758 Mb (Kole, 2007). Eines der für die arbeitstechnische Vollmechanisierung wichtigsten Züchtungserfolge war die Entwicklung der Einkeimigkeit (Monogermie) des Zuckerrübensaatguts (Seldmayer, 1964). Ursprünglich bildeten Zuckerrüben sogenannte Knäuel, die aus 4-5 verwachsenen Samen bestehen und nach Aussaat mittels Handarbeit vereinzelt wurden. Der Ploidiegrad der Zuckerrübensorten ist durch den Züchter leicht veränderbar. Die meisten Sorten sind diploid ( $2n = 2x = 18$ ), aber auch triploide Sorten ( $3n = 3x = 27$ ) sind erwerbbar (Bosemark, 1993; Beschreibende Sortenliste, 2008). Triploide Sorten werden aus Kreuzungen von diploiden, monogermen Mutter- und tetraploiden Vaterpopulationen gekreuzt (Becker, 1993; Bosemark, 1993). Zu Beginn der Züchtung verschiedener Ploidiegrade erschienen triploide Sorten als beste Möglichkeit zur Erzeugung stabiler Monogermie, die den gewünschten Leistungs- und Qualitätsvoraussetzungen entsprachen und den bis dahin vorhandenen multigermen Sorten ebenbürtig waren. Seit dem Ende der 70er Jahre wurden diploide, monogerme Sorten entwickelt, die den triploiden in ihren Fähigkeiten nicht nur gleichwertig waren, sondern in speziellen Bereichen, wie z.B. hohe

Samenqualität, die sich u.a. in Form von guter Keimfähigkeit wiederspiegelt, überlegen waren (Oltmann *et al.*, 1984). Beim Anbau von Zuckerrüben sind Eigenschaften, wie Ertrags- und Qualitätsverbesserung von großer Bedeutung. Weitere Zuchtziele werden zum einen von den Landwirten, zum anderen von der verarbeitenden Industrie bestimmt. Dabei steht das Interesse der verarbeitenden Industrie vor allem für die technische Qualität in Form von verlustarmer Zuckergewinnung im Vordergrund. Aus landwirtschaftlicher Perspektive ist die Flächenproduktivität ein zentrales Zuchtziel. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, sind in der Züchtung die Steigerung des Rübenertrags und die Erhöhung des Weißzuckergehalts die elementaren Ziele. Bei der Entwicklung von Sorten müssen Korrelationen zwischen bestimmten Eigenschaften berücksichtigt werden. Beispielsweise besteht zwischen den Merkmalen Zuckerertrag und Rübenertrag eine sehr große positive Korrelation. Die Merkmale Zuckergehalt und Rübenertrag hingegen sind negativ korreliert. Schlussfolgernd aus diesen Korrelationen werden unterschiedliche Sortentypen entwickelt, der Ertragsbetonte E-Typ, der Zuckergehaltbetonte Z-Typ, sowie der intermediäre N-Typ, der mit seinem Zuckergehalt und/oder Zuckerertrag zwischen dem E- und dem Z-Typ liegt. (Oltmann *et al.*, 1984; Draycott, 1991; Becker, 1993).

Die Zuckerrübe ist stark selbstinkompatibel. Sämtliche, derzeit kommerziell erwerbbaren Zuckerrübensorten sind aus der Hybridzüchtung hervorgegangen. Durch die Verwendung der Hybridzüchtung ist die Ausnutzung der Heterosis möglich. Allgemein werden in der Hybridzüchtung bei Zuckerrüben eine mütterliche cytoplasmatisch männlich sterile (CMS) Linie, die zusätzlich die Eigenschaft der Monogermität trägt, mit einer pollenhohen Vaterlinie, die meist multigerm und aufgrund der Mehrblütigkeit eine hohe Pollenmenge besitzt, gekreuzt (Ford-Lloyd *et al.*, 1975; Poehlman, 1986; Bosemark, 1993; Koch, 2006).

#### **1.1.4. Rizomania-Resistenzzüchtung**

Rizomania bezeichnet eine Krankheit an Zuckerrübe, die durch das beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) verursacht und durch den bodenbürtigen Vektor *Polymyxa betae* übertragen wird. Die Rizomaniaresistenzzüchtung beschäftigt sich mit der Entwicklung von BNYVV toleranten Sorten. Toleranz bedeutet, dass Entwicklung, wie auch pflanzenbaulich-relevante Leistungsmerkmale trotz

Virusbefall die Zuckerrübe kaum oder nicht negativ beeinflußt werden. D.h. rizomaniatolerante Sorten tolerieren den Befall mit dem Pathogen und erzielen auch auf befallsfreien Flächen ein Ertragsniveau vergleichbar zu nichtbefallenen Sorten (Hoffmann *et al.*, 1994). Die Möglichkeiten der Bekämpfung des virusübertragenden Vektors *P. betae*, der in Ackerböden weit verbreitet ist, durch chemisch, wie auch thermische Bodenhandlungen ist zum einen nicht wirtschaftlich, zum anderen aus ökologischer Sicht nicht tragbar. Auch eine Weiterstellung der Zuckerrübe in der Fruchfolge lässt aufgrund der Langlebigkeit der *P. betae* Dauersporen von bis zu 15 Jahren (Abe und Tamada, 1996) keinen deutlichen Erfolg erwarten. Die derzeit erwerbbaren rizomaniatoleranten Zuckerrübensorten basieren auf monogenen Resistzenzen und werden im Allgemeinen als rizomaniaresistent bezeichnet. Aus diesem Grund wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausschließlich der Begriff resistant benutzt. Die in den Zuckerrübensorten verwendeten Majorgene *Rz1*, *Rz2* (Kapitel 2) liegen auf Chromosom 3 des Zuckerrübengenoms in einem Abstand von 20-25cM (Scholten *et al.*, 1999; Amiri *et al.*, 2003). Ein wichtiger Entwicklungsschritt in der Etablierung dieser rizomaniaresistenten Sorten war die Erzielung einer ähnlich hohen Ertragsleistung resistenter Sorten unter Nichtbefallsbedingungen im Vergleich mit anfälligen Sorten.

Rizomaniaresistente Zuckerrübensorten werden als CMS-Hybridsorten erzeugt. Die BNYVV Resistenz ist ein qualitatives Merkmal, das dominant über die bereits genannten Majorgene vererbt und zusätzlich durch Minorgene, deren genaue Vererbung ungeklärt ist, beeinflusst wird (Koch, 2006). In der Rizomaniaresistenzzytung stellen die Züchter mittels Handkreuzungen von kastrierten Pflanzen F<sub>1</sub>-Linien her, die anschließend auf Resistenz und Leistung (z.B. Zuckerertrag) geprüft werden. Die Linien mit den besten, gewünschten Eigenschaften werden als Sortenkomponente eingesetzt. Die Rizomaniaresistenz einer Sorte kann sowohl vom Saatelter, der das CMS-Cytoplasma trägt, als auch von den eingesetzten Pollenspenderpflanzen mit fertilem Cytoplasma weitergegeben werden. Bei Sorten mit der Kombinationsresistenz *Rz1/Rz2* kann die Rizomaniaresistenz beidseitig von Vater- und Mutterlinie gleichzeitig vererbt werden (persönliche Mitteilung W. Mechelke, KWS Saat AG). Um die BNYVV Resistenzzytung zu verbessern, werden seit mehreren Jahren molekulare

Marker unterstützend hinzugezogen. Die derzeit meist verwendete Selektionsmethode ist die Anwendung von QTL („quantitative trait loci“) und die Möglichkeit der Identifizierung ihrer genomischen Positionen, bekannt als QTL Kartierung (Hui Liu, 1998). Die Zuckerrübenzüchter haben bereits molekulare Marker entwickelt, die eng mit dem *Rz1* Gen gekoppelt sind (Barzen *et al.*, 1992). Die markergestützte Selektion wird bei der Rizomaniaresistenzzüchtung subsidiär für die Auswahl von resistenten homozygot aufspaltenden F<sub>1</sub>-Linien eingesetzt (Kraft, 2001).

## 1.2. Rizomania im Zuckerrübenanbau

Rizomania ist eine Viruserkrankung an Zuckerrübe, die sehr große wirtschaftliche Bedeutung hat. Im Zuckerrübenanbau führte sie, nach erstem Auftreten 1959 (Canova, 1959) schnell zu einer ökonomischen Bedrohung, da ein Rizomaniabefall hohe Ertragsverluste (bis 70% und mehr) (Johansson, 1985; Richard-Molard, 1985) und stark reduzierte Zuckergehalte bedingen kann.

Rizomaniasymptome sind an der gesamten Zuckerrübenpflanze festzustellen, wobei am Blattapparat auftretende Symptome weitaus seltener zu beobachten sind, im Gegensatz zu deutlich ausgeprägten Symptomen am unterirdischen Rübenkörper. Typische Blattsymptome sind nesterweise auftretende Blattaufhellungen in Feldbeständen sowie seltener vorkommende Welkeerscheinungen trotz ausreichender Bodenfeuchte. Das Symptombild, nachdem BNYVV benannt wurde, ist eine deutliche Blattadernaufhellung am Rübenblatt. Am Rübenkörper kommt es zur Ausbildung eines Wurzelbarthes, der anstelle einer Pfahlwurzel viele Seitenwurzeln ausbildet. Des Weiteren können Einschnürungen der Pfahlwurzel und Verbräunungen der Gefäßleitbündel als Symptom beobachtet werden (Tamada und Baba, 1973; Johansson, 1985; Asher, 1993).

Rizomania, auch bekannt als die „viröse Wurzelbärtigkeit“, wird durch das beet necrotic yellow vein virus verursacht (Tamada und Baba, 1973) (Kapitel 2). Der Überträger des BNYVV, auch Aderngelbfleckigkeitsvirus genannt, ist der bodenbürtige Plasmodiophoromycet *Polymyxa betae* Keskin (Keskin, 1964). Seit der erstmaligen Erwähnung der Krankheit in den fünfziger Jahren (Canova, 1959)

ist das Virus in den wichtigsten Zuckerrübenanbaugebieten Europas sowie auch weltweit, z.B. in Asien und den USA, aufgetreten (Asher, 1993; Tamada, 1999; Lennefors *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2001). Untersuchungen von ca. 1,6 Mio. ha europäischer Zuckerrübenanbaufläche ergaben einen kontinuierlichen Anstieg der Befallsfläche von 15% im Jahr 1990 auf 38% im Jahr 2006 (Varrelmann, 2007). Schätzungen gehen davon aus, dass die befallene landwirtschaftliche Zuckerrübenanbaufläche bis zum Jahr 2010 auf 56% ansteigt (Johansson, 1985; Richard-Molard und Cariolle, 2001). Ertragseinbußen bis zu 70% können durch Rizomaniabefall hervorgerufen werden (Johansson, 1985; Richard-Molard und Cariolle, 2001). Der Zuckergehalt kann in befallenen Speicherwurzeln der Zuckerrüben von den erzielbaren 16-18% auf bis zu 7% reduziert sein (Bongiovanni und Lanzoni, 1964). Die in den letzten Jahren beobachtete schnelle Ausbreitung der Krankheit ist vor allem auf die derzeit verfügbaren BNYVV resistenten Sorten zurückzuführen. Diese sind gegenüber dem Virus nicht unangreifbar. Bei den in den Sorten vorliegenden Resistzenzen handelt es sich um Ausbreitungsresistenzen, nicht um Infektionsresistenzen, d.h. die Infektion der Pflanze durch das Virus wird nicht unterbunden, sondern lediglich die Ausbreitung innerhalb der Pflanze verhindert. Daraus folgt, dass sich die Virusgehalte sowie die beladenen *P. betae* Vektoreinheiten im Boden nicht zwingend verringern (Varrelmann, 2007). Des Weiteren muss auch der Vektor *P. betae* für die Verbreitung mit berücksichtigt werden. Der Wirtskreis beschränkt sich auf die Familien der *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae* und *Portulacaceae* (Rush, 2003; Mouhanna *et al.*, 2008).

Die Virusverbreitung geschieht über vielfältige, schwer kontrollierbare Möglichkeiten. Infizierte Bodenpartikel können mittels Wasser (Beregnung, Grundwasser, etc.), durch Wind, Tiere oder Resterde in landwirtschaftlichen Maschinen verbreitet werden. Deshalb ist ein qualitativ und quantitativ rentabler Zuckerrübenanbau nur durch die Kultivierung von derzeit verfügbaren rizomaniaresistenten Sorten möglich.

### 1.2.1. Beet necrotic yellow vein virus und sein Vektor *Polomyxa betae*

*Beet necrotic yellow vein virus* wurde 1997 durch das „International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)“ als Typspezies dem Genus *Benyvirus* zugeordnet (Hull, 2002). Neben BNYVV gehört das *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV) ebenfalls zum Genus *Benyvirus* (Tamada, 1999; Lee *et al.*, 2001; Rush, 2003). Die, dem Genus zugehörigen Viren BNYVV und BSBMV werden durch den Protisten *P. betae* Keskin (Keskin, 1964) im Boden übertragen und zeigen eine sehr enge Verwandtschaft aufgrund hoher Nukleotidhomologien der viralen Genome (Lee *et al.*, 2001).

Das Genom des Virus besteht in Abhängigkeit vom Isolat aus vier- bzw. fünfstäbchenförmigen Partikeln (Kapitel 2, Abb. 3), die einzelsträngige RNA in Plusstrang-Orientierung tragen. Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen können die verschiedenen Längen der BNYVV Partikel sichtbar gemacht werden (Kapitel 2, Abb. 2). Der Durchmesser der verschiedenen RNAs beträgt 30nm. Die Länge kann dabei zwischen 65 bis 390nm variieren (Putz, 1977). In Feldisolaten werden meist vier (bei besonderen BNYVV Typen bis zu fünf) verschiedene Viruspartikel nachgewiesen. Untersuchungen haben gezeigt, dass die auf RNA3, 4 und 5 kodierten Funktionen nur für die natürliche Infektion notwendig sind. „Housekeeping“ Funktionen, wie Replikation, Zell zu Zell Ausbreitung, Enkapsidierung und „supressor of gene silencing“ sind bereits auf RNA1 und RNA2 kodiert (Tamada, 1999; Dunoyer *et al.*, 2002). Folglich sind RNA1 und RNA2 für die BNYVV Infektion und Replikation und sowie für die künstliche Inokulation von Lokalläsionswirten z.B. *Chenopodium quinoa* ausreichend. Genomorganisation und Funktionen der unterschiedlichen RNA-Fragmente sind in Kapitel 2 dargestellt und ausführlich beschrieben.

### 1.2.2. Variabilität und weltweite Verbreitung

Der Erreger der Rizomania, BNYVV, wird in Europa in drei verschiedene Gruppen differenziert, die als A-, B- und P-Pathotyp bezeichnet werden. Die Identifikation fand durch die Anwendung von molekularen Analysen, wie der Detektion von „restriction fragment length polymorphism“ (RFLP) und „single-stranded

conformation polymorphism“ (SSCP) in der Gensequenz des BNYVV Hüllproteins, statt (Kruse *et al.*, 1994; Koenig *et al.*, 1995).

Der B-Pathotyp ist in Deutschland der am häufigsten auftretende, kommt aber auch in Frankreich, Schweden, China und Japan vor. Dem gegenüber besitzt der A-Pathotyp in den meisten europäischen Ländern, sowie dem Iran, Nordamerika, China und Japan seine Verbreitung (Saito *et al.*, 1996; Miyanishi *et al.*, 1999; Lennefors *et al.*, 2000; Sohi und Maleki, 2004). Die beiden BNYVV Pathotypen A und B können in Abhängigkeit von der untersuchten viralen RNA ca. 3-6% Sequenzunterschied auf Nukleinsäureebene aufweisen. Die Unterschiede zwischen BNYVV Typen wurden mit Hilfe molekularer Diversitätsstudien und damit verbundenen phylogenetischen Analysen beschrieben (Schirmer *et al.*, 2005). Innerhalb dieser beiden Pathotypen sind die Sequenzen äußerst stabil, hoch konserviert und zeigen eine Sequenzidentität von 99% (Koenig und Lennefors, 2000). Im Gegensatz zu den Pathotypen A und B, die vier RNA Segmente besitzen, unterscheidet sich der dritte BNYVV Pathotyp P durch eine zusätzliche RNA5 deutlich gegenüber den zwei zuvor genannten Pathotypen (Koenig *et al.*, 1997; Koenig und Lennefors, 2000). BNYVV Isolate, die zusätzlich eine RNA5 besitzen, wurden erstmals im französischen Pithiviers, dem Namensgeber des P-Pathotyps (Koenig *et al.*, 1997) und in Kasachstan (Koenig und Lennefors, 2000) nachgewiesen. In darauf folgenden Untersuchungen wurden RNA5 tragende Isolate auch in Großbritannien (Harju *et al.*, 2002), China (Koenig und Lennefors, 2000) und Japan (Miyanishi *et al.*, 1999) nachgewiesen. BNYVV P-Pathotyp Isolate weisen im Vergleich zu den A- und B-Pathotypen eine höhere Pathogenität auf (Tamada *et al.*, 1996; Miyanishi *et al.*, 1999) und zeigen einen höheren Virustiter (Tamada *et al.*, 1996; Heijbroek *et al.*, 1999; Pferdmenges und Varrelmann, 2008). Schirmer *et al.* (2005) bezeichneten japanische RNA5 tragende Isolate als J-Pathotypen auf Grund von Sequenzvariabilität bei RNA5 und P26 gegenüber den BNYVV P-Pathotypen.

### 1.2.3. Pathogenitätsfaktor P25 – Einfluss, Tetradenkompositionen und dessen Bedeutung

Eine besondere Bedeutung bezüglich der Pathogenität der Virusisolate kommt der RNA3 des BNYVV zu. Das auf ihr kodierte Protein P25 ist wie zuvor beschrieben neben der Symptomausprägung an Zuckerrüben (1.2.) auch für die Ausbildung von nekrotischen Lokalläsionen auf dem experimentellen Wirt *C. quinoa* verantwortlich (Tamada *et al.*, 1989).

P25 hat in seinem natürlichen Wirt, der Zuckerrübe, Einfluss auf die Intensität der Symptomausprägung (Bildung von Seitenwurzeln und Blattvergilbung, Verbräunung der Leitbahnen) und die Virusverbreitung innerhalb des Wurzelsystems (Tamada *et al.*, 1989; Koenig und Stein, 1990; Commandeur *et al.*, 1991, Koenig *et al.*, 1991; Jupin *et al.*, 1991; Jupin *et al.*, 1992). In anfälligen Zuckerrübensorten ist eine vollständige Virusausbreitung nur dann möglich, wenn P25 anwesend ist (Koenig und Burgermeister, 1989; Koenig und Stein, 1990). In sogenannten teilresistenten Zuckerrübengenotypen kann BNYVV nur die Seitenwurzeln infizieren, sich aber nicht weiter in die Hauptwurzel ausbreiten (Tamada *et al.*, 1999). Untersuchungen von Chiba *et al.* (2008) zeigten bei Zuckerrübenblatt-Inokulationen von anfälligen und resistenten Genotypen (Rizor), dass es entweder zu einer Infektionsresistenz in Form von ausbleibenden Symptomen oder zum Auftreten einer hypersensitiven Reaktion (HR) in Form von nekrotischen Läsionen kommen kann, wenn RNA3 und somit auch P25 anwesend ist.

Die Replikation des BNYVV findet im Cytoplasma statt. Es konnte mittels Immuno-Gold Elektronenmikroskopie festgestellt werden, dass P25 sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern von infizierten Zellen nachweisbar ist (Haeberlé und Stüssi-Garaud, 1995). Des Weiteren haben Vetter *et al.* (2004) gezeigt, dass P25 ein „nuclear shuttle“ Protein ist. Mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie konnten ein „nuclear localisation signal“ (NLS), und ein „nuclear export signal“ (NES) identifiziert werden (Kapitel 2, Abb. 4). GFP::P25 Fusionen aus dem Virus-Wildtyp und künstlich hergestellten P25 Virusmutanten bewiesen, dass das NLS sich an der N-terminalen Hälfte des P25 Proteins befindet. Die Position des NES an C-terminalen Hälfte wurde mittels Alaninscanning-Mutagenese charakterisiert. Die Fähigkeit des P25, sich sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern aufzuhalten,

gibt Hinweise auf eine mögliche Korrelation mit der verstärkten Symptomausprägung in *C. quinoa*.

P25 ist ein hoch konserviertes Protein, das hauptsächlich in der Aminosäuretetraden As 67-70 Sequenzunterschiede zeigt (Schirmer *et al.*, 2005; Acosta-Leal *et al.*, 2008; Chiba *et al.*, 2008; Koenig *et al.*, 2008) (Kapitel 2, Tabelle 1). Des Weiteren wurden auch as135 als weitere, stark variable Position beschrieben (Rush *et al.*, 2006). Liu *et al.* (2005) vermuteten einen Zusammenhang zwischen der Aminosäurezusammensetzung der Tetraden an den Positionen as67, as68 und der Pathogenität bzw. Aggressivität des BNYVV, die im amerikanischen Imperial Valley zu erhöhten Virusgehalten in *Rz1* resistenten Sorten führte. In weiteren Untersuchungen konnte diese Beobachtung jedoch nicht bestätigt werden (Liu und Lewellen, 2007). Die Bedeutung dieser Tetraden wurde auch durch mechanische Blattinokulation von resistenten *B. maritima* unterstützt (Tamada, 2007). Eine weitere Aminosäure an der Position as179 ist ebenfalls für die Blattresistenzreaktionen in Zuckerrübe verantwortlich (Chiba *et al.*, 2008). Die derzeit bekannten Aminosäuretetraden sind in Kapitel 2, Tabelle 2 in einem Überblick zusammengestellt.

### **1.3. Methoden zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen**

Proteine steuern nahezu sämtliche Vorgänge in lebenden Zellen und interagieren dabei mit anderen Proteinen, um ihre Funktionen erfüllen zu können. Diese Proteinwechselwirkungen sind als Basis biologischer Prozesse für alle Aspekte des Lebens essentiell (Alberts, 1998; Bader *et al.*, 2003).

Insofern ist ein wichtiger Bestandteil für die Aufklärung der Funktion eines Proteins die Identifizierung von Proteinen, die mit ihm interagieren. Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Methoden zur Identifizierung und zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen sowie ein kurzer Einblick über das Spektrum weiterer möglicher Methoden gegeben. Differenzierte Vergleiche über die Möglichkeiten und Grenzen der jeweiligen Systeme sind in aktuell erschienenen Übersichtsartikeln (Bhat *et al.*, 2006; Lalonde *et al.*, 2008; Miernyk und Thelen, 2008) ausgeführt.

### 1.3.1. „Yeast two-hybrid“ Systeme

„Yeast two-hybrid“ (YTH), im deutschen als Zwei-Hybrid-System bekannt, ist eine *in vivo* Methode zur Analyse von Protein-Protein Interaktionen und wurde erstmalig von Fields und Song (1989) beschrieben. Das Grundprinzip dieses ersten YTH nutzt den modularen Aufbau von Transkriptionsfaktoren aus zwei voneinander separierbaren Domänen und identifiziert Proteininteraktionen mittels rekonstituierter Transkriptionsaktivierung von einem oder mehreren Reportergenen. Transkriptionsfaktoren bestehen aus zwei Einheiten, die als DNA bindende Domäne (BD) und DNA aktivierende Domäne (AD) räumlich und funktionell voneinander getrennt werden können (Fields und Song, 1989; Chien et al., 1991). Um die Transkription zu aktivieren muss eine physikalische Interaktion zwischen beiden Domänen bestehen, denn keine der beiden Domänen ist allein zur Transkriptionsaktivierung befähigt. Die beiden Domänen werden mit den auf Interaktion zu überprüfenden Proteinen als translationale Fusionen exprimiert, d.h. es werden ein Köderprotein X („bait“) durch Fusion mit der DNA-bindenden Domäne und ein Beuteprotein Y („prey“) durch Fusion mit der transkriptionsaktivierenden Domäne erzeugt. Kommt es zu einer Interaktion der Proteine X und Y, so dimerisieren die beiden Domänen BD und AD. Der durch die Interaktion rekonstituierte Transkriptionsfaktor bindet strangaußwärts an die Bindungsstelle einer Promotorregion („upstream activating sequence“, UAS) für die aktivierende Domäne, welche die Transkription der Reportergene aktiviert.

Im ursprünglichen System von Fields und Song (1989) wurde nur ein einzelnes Reportergen, das *lacZ*, für die Selektion verwendet. In den heute verfügbaren YTH Systemen wird eine Kombination aus mehreren Selektionsmarkern genutzt (Causier und Davies, 2002). Dazu gehören zum einen sogenannte Auxotrophiemarker, die Enzyme der Biosynthese einzelner Aminosäuren (z.B. Histidin, Leucin) kodieren und auf entsprechenden Mangelmedien eine Selektion von Interaktionskandidaten erlauben. Zum anderen werden zusätzliche Marker, wie *lacZ*, *gusA* oder *gfp* benutzt, um über deren visuell erfassbare Reportergenaktivität zu selektieren. Dabei werden diese Selektionsmarker nach ihrer Lokalisation unterschieden. Diese liegen als chromosomal Reporter (Leu2, *lacZ*, *ADE2*, *HIS3*) oder auf Plasmiden (GFP) kodiert vor. Durch die

Verwendung von mindestens zwei Reportergenen wird eine zuverlässigere Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion gewährleistet.

Als Transkriptionsfaktoren finden in YTH-Systemen das aus *Saccharomyces cerevisiae* stammende Gal4-Protein sowie alternativ das Repressorprotein LexA (als BD) in Kombination mit dem B42-Protein (als AD), die beide aus *Escherichia coli* stammen (Gyuris et al., 1993), Anwendung. Ein Vorteil LexA-basierender YTH-Systeme liegt in der Möglichkeit die Sensitivität ihres Auxotrophiemarkers durch die Anzahl der LexA Operatorsequenzen innerhalb des Promoters zu verändern. Dieser kann zwischen zwei und sechs Kopien liegen, wobei sich die Sensitivität mit steigender Kopienanzahl erhöht. Ein weiterer Vorteil LexA basierender YTH Systeme ist der prokaryotische Ursprung der Interaktionsdomänen LexA und B42, die im Gegensatz zum eukaryotischen Gal4 weniger falsch-positive Interaktionen verursachen (van Criekinge und Beyaert, 1999).

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über verschiedene YTH-Systeme gegeben werden.

Mayer et al. (1999) entwickelten ein YTH-System unter Nutzung des Kupferinduzierbaren Transkriptionsfaktors ACE1, welcher ähnlich dem Gal4 in AD und BD geteilt wurde und anschließend mit den, auf Interaktion zu testenden Proteinen fusioniert wird. Voraussetzung für dieses, auf der Nutzung eines Kupferresistenzgen-basierenden YTH Systems ist, dass Kupfer über das Kulturmedium verfügbar ist, damit die Funktionalität und DNA-Bindungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors gegeben ist. Zur Absicherung und Bestätigung der Interaktion verfügt dieses System zusätzlich über ein ebenfalls chromosomal kodiertes kupferinduzierbares *gfp*-Gen, welches durch den rekonstituierten Transkriptionsfaktor ACE1 induziert wird, nachdem durch eine bereits erfolgte ACE1 induzierte Kupferresistenzgenexpression die Interaktion durch Viabilität der Hefezellen selektiert wurde.

Ein weiteres System zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen in Anlehnung an das YTH ist das Cytoplasma-basierende „SOS Recruitment“ System (SOS), welches auf der Rekonstituierung des Ras („Rat sarcoma“) Signalweges basiert (Aronheim et al., 1997). Die Proteininteraktionen werden in

einem temperatursensitiven Hefestamm untersucht, dem es nur bei erfolgreicher Proteininteraktion möglich ist bei höheren Temperaturen zu wachsen. Die zu untersuchenden Proteine („bait“) werden mit dem Protein hSos, einem Protein der RAS-Hitzestressantwort, fusioniert. Das „prey“-Protein wird mit einem Myristylierungssignal fusioniert, welches die Fähigkeit der Membranverankerung vermittelt. Interagieren „bait“ und „prey“ miteinander, so kommt es zu einer Membranverankerung von hSos, die über eine Signalkaskade ein Hefewachstum bei 37°C ermöglicht.

Das „SOS recruitment“ System weißt den besonderen Vorteil auf, dass bei diesem System die Protein-Protein-Interaktionen im Cytoplasma erfolgen und kein Transport der zu untersuchenden Fusionsproteine in den Zellkern erfolgen muss. Daraus leitet sich die besondere Eignung dieses Systems für Untersuchungen mit Membranproteinen und Proteinen, die auf post-translationalen Modifikationen im Cytoplasma angewiesen, ab.

Das Split-Ubiquitin System nutzt das Polypeptid Ubiquitin zur Proteininteraktion (Varshavsky, 1997). Dabei erfolgt durch Proteininteraktion eine Komplementierung des separierten Ubiquitin-Moleküls und veranlasst so den Transport zum 26S Proteasom. Dabei wird das Ubiquitin durch Ubiquitin-spezifische Proteasen wieder freigesetzt und ins Cytoplasma zurückgeführt. Zur Untersuchung der Interaktion von zwei Proteinen, werden die zu testenden Proteine mit den Ubiquitindomänen fusioniert. Nach Rekonstituierung durch Protein-Interaktion wird ein Reporterprotein durch Abspaltung vom Interaktionskomplex dem Zellkern zugeführt und so die Transkription (z.B. des Transkriptionsfaktors LexA) aktiviert.

### **1.3.2. Schwierigkeiten und Adaptionen von Yeast two-hybrid Systemen**

Schwierigkeiten bei der Nutzung von YTH-Methoden für die Identifizierung von Proteininteraktionen ergeben sich, wenn verwendete Köderproteine eigenständig die Transkription aktivieren und dadurch nicht einsetzbar sind (Transkriptionsaktivatoren). Falsch-positive Interaktionen, die in YTH Interaktionen auftreten, können zum Teil anhand ihrer Funktion vermutet werden, da diese bei YTH Interaktionen immer wieder zu finden sind. Dazu zählen u.a. „heat shock“ Proteine, Mitochondrien-Proteine oder auch ribosomale Proteine (Hengen, 1997)

Ein weiteres Problem ist das nicht zustande kommen von Interaktionen. Es muss immer berücksichtigt werden, dass z.B. Interaktionen, die im Normalzustand im Zytosol oder an der Zellmembran gefunden werden zu keiner Interaktion im Hefezellkern führen (Colas und Brent, 1998). Viele Proteine, die im YTH System auf Interaktion getestet werden, kommen aus anderen Zellkompartimenten und zeigen eine veränderte oder unvollständige tertiäre Struktur und verhindern somit eine mögliche Interaktion. Weiterhin wurden Interaktionen mit Membranproteinen als problematisch identifiziert (Xia *et al.*, 2006). Dies gründet sich auf Beobachtungen bei Fusionen von Membranproteinen mit der aktivierenden Domäne. Dabei kann es zu Komplikationen durch Membranen kommen, die diesen Fusionsproteinen den Eintritt in den Zellkern verweigern und somit die Rekonstitution des Transkriptionsfaktors im Zellkern und den zugehörigen Interaktionsnachweis unmöglich machen. Des Weiteren kann es bei der Expression von Membranproteinen in *E. coli* zu toxischen Reaktionen kommen, die folglich zu einer nicht repräsentativen Anzahl von Membranproteinen in cDNA Expressionsbibliotheken für YTH Screens führen (Frommer und Ninnemann, 1995). Protein-Protein Interaktionen mit solchen Membranproteinen werden in der Regel anschließend durch Selektionsschritte als falsch-positive identifiziert. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass weitere potentielle falsch-positive Interaktionen von Proteinen auftreten, die im Zellzyklus räumlich oder zeitlich getrennt vorliegen und deshalb im ursprünglichen Organismus niemals eine Interaktion zeigen.

Einige dieser Probleme des YTH Systems wurden in adaptierten Systemen behoben. Ein Beispiel dafür ist das „yeast three-hybrid“ (Y3H) System. Prinzipiell ist der Ablauf entsprechend dem des YTH Systems. Zwei auf Interaktion zu prüfende Proteine werden wie zuvor beschrieben an AD und BD eines Transkriptionsfaktors (z.B. Gal4) fusioniert und mit einem zusätzlichen dritten Protein, welches ein NLS besitzt, zur Interaktion eingesetzt. Zur Aktivierung des Reportergens kann es im Y3H nur kommen, wenn ein Komplex bestehend aus allen drei Komponenten vorliegt (Causier und Davies, 2002). Ein Vorteil dieses Assays ist, dass Interaktionen, die in YTH Untersuchungen ausbleiben, durch die Anwesenheit eines dritten Proteins möglicherweise erkannt werden können. Denn viele zelluläre Prozesse können nur durch die Anwesenheit mehrerer Proteine

zustande kommen. Außerdem lassen sich die Interaktionen kleinerer Moleküle (<10 kDa) durch ein solches System realisieren (Causier und Davies, 2002; Suter *et al.*, 2008).

Y3H bietet auch die Möglichkeit Interaktionen zwischen RNA und Proteinen *in vivo* nachzuweisen. Interaktionen dieser beiden Komponenten kommen in vielen biologischen Prozessen, u.a. bei der Virusreplikation vor. Dabei wird im Y3H als dritte Interaktionskomponente ein Hybrid-RNA-Molekül verwendet. Für die Interaktion werden zwei Komponenten verwendet. Ein Hybrid-Protein bestehend aus einem gut charakterisierten RNA-Molekül (z.B. Hüllprotein des Bakteriophagen MS<sup>+</sup>) mit Bindung an ein bekanntes Protein wird mit einem anderen Hybrid-Protein bestehend aus einem unbekannten RNA-Molekül und einem zweiten Protein auf Interaktion geprüft (Kraemer *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Jaeger *et al.*, 2004; Hook *et al.*, 2005).

Die Umsetzung des YTH in Zellen anderer Herkunft führte zu Systemen, wie dem „Mammalian two-hybrid“ (M2H) oder dem „Bacterial two-hybrid“ (B2H). Dabei basiert das letztere, bakterielle System ebenfalls auf Transkriptionsaktivierung, entsprechend dem YTH (Joung *et al.*, 2000; Serebriiskii *et al.*, 2000). Wesentlicher Vorteil des B2H im Vergleich zum Hefesystem ist die Möglichkeit des schnelleren Interaktionsnachweises. Dies begründet sich auf leichten Handhabung und der sehr schnellen Wachstumsrate des Bakteriums *E. coli* (Causier und Davies, 2002). Eine weitere Möglichkeit Protein-Protein Interaktion zu testen, bietet das M2H (Dang *et al.*, 1991; Vasavada *et al.*, 1991). Dieses System basiert ebenfalls auf dem Prinzip der Proteinfusionen mit Interaktionsdomänen entsprechend dem YTH. M2H bietet somit die Möglichkeit Interaktionen in einem anderen zellulären Hintergrund zu prüfen. Im Vergleich zu YTH bietet es den Vorteil, dass komplexe posttranskriptionale Modifikationen, die für die Faltung von Proteinen nötig sind in tierischen Zellen korrekter erfolgen als in Hefezellen. Die Anwendung dieses Systems für pflanzenbiologische Untersuchungen ist aber aufgrund der mit M2H verbundenen höheren Kosten nur bedingt geeignet (Causier und Davies, 2002).

### **1.3.3. Systeme für die Bestätigung von Protein-Protein Interaktionen**

Aufgrund der beschriebenen Charakteristika von Hefesystemen und der damit verbundenen Möglichkeit der Selektion falsch-positiver Interaktionen sollten

Protein-Protein Interaktionen immer durch ein zusätzliches Proteininteraktions-Assay bestätigt werden. Dabei ist es empfehlenswert eine Methode zu nutzen, die unter anderen Bedingungen z.B. *in vitro* oder *in planta* durchgeführt wird. Von diesen Systemen soll im Rahmen dieses Abschnitts ein kurzer Überblick gegeben werden.

Zu den *in vitro* Proteinnachweisen zählen u.a. die Verfahren der Co-Immunopräzipitation (Co-IP), wie auch *in vitro* Säulenbindungsassays („GST-pull-down“). Bei diesen physikalisch-biochemischen Methoden werden die Nachweise mit Hilfe von Antikörpern durchgeführt.

Die Co-IP basiert auf der Bildung von Protein-Protein Interaktionen gefolgt von einem Nachweis durch spezifische Antikörperbindung an eines der Interaktionsproteine (Vitale, 2002). Der Antikörper ist in der Lage, dass gesuchte Protein, welches mit dem zweiten Protein interagiert, zu erkennen. Als Resultat bildet sich ein Protein-Protein-Antikörper-Komplex. Durch Waschschritte nach Protein-Komplex-Bindung werden diese Protein-Protein-Interaktionen von nicht gebundenen Proteinen getrennt. Zum Nachweis der positiven Protein-Protein Interaktionen wird ein immunologischer Nachweis durchgeführt. Für diesen werden z.B. Hämaggglutinin (HA)- oder c-myc-tag mit einem der interagierenden Proteine fusioniert und anschließend mit spezifischen Antikörpern bei Proteinkomplexbildung nachgewiesen.

Der Glutathion-S-Transferase (GST) Bindungsassay („pull-down“) ist eine weitere Möglichkeit, um Protein-Protein Interaktionen *in vitro* zu identifizieren (Kaelin *et al.*, 1991). Erste Anwendungen zur Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* wurden bereits 1988 von Smith und Johnson (1988) beschrieben. Die Protein-Protein Interaktion basiert auf einer Fusion des zu untersuchenden Proteins mit Glutathion-S-Transferase (GST), die in *E. coli* synthetisiert werden und einer Bindung an Sepharose für den anschließenden Antikörpernachweis. Im „pull-down“ bindet die GST an Glutathion. Um die, an das Glutathion gebundenen Proteinkomplexe zurückzugewinnen, wird reduziertes Glutathion hinzugefügt, das aufgrund hoher Affinität zu GST eine Freisetzung der Proteinkomplexe verursacht. Liegt eine Proteininteraktion zweier Proteine vor, so werden die gemeinsam an die Sepharose gebundenen Proteinkomplexe anschließend im immunologischen Nachweis mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

„Fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) ist ein *in vivo* System, das zur Identifikation sowohl intra- als auch intermolekularer Interaktionen in lebenden Zellen verwendet wird (Kuroda *et al.*, 2006). FRET basiert auf einem physikalischen Prozess, bei dem Energie eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher sich in einem angeregten Zustand befindet (Donor) auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor) weitergegeben wird. Diese energetische Wechselwirkung kann für Proteininteraktionen nutzbar gemacht werden. Dazu wird ein Protein mit einem Donorfluoreszenzmarker, das andere mit dem zugehörigen Akzeptorfluorophor ausgestattet. Damit die Möglichkeit der Energieübertragung und somit zur Interaktion gegeben ist, ist eine Überlappung des emittierenden Spektrums des Donors mit dem absorbierenden Spektrum des Akzeptors die Voraussetzung (Lalonde *et al.*, 2008). Dabei stehen mehrere verschiedenen fluoreszierende Proteine wie GFP, YFP etc. zur Verfügung, die zuvor auf die Verwendbarkeit ihrer Spektren überprüft werden sollten. Eine genaue Darstellung möglicher Donor-Akzeptor Kombinationen wurde von Wallrabe und Periasamy (2005) zusammengestellt. Interagieren Proteine miteinander, so kann ein FRET Signal detektiert werden. Dabei können sogar Rückschlüsse auf die Nähe der beiden Proteine gezogen werden, da das FRET-Signal bei geringer Entfernung der Proteine wesentlich stärker ist, als bei weiter entfernten Proteinen.

"Bimolecular fluorescence complementation" (BiFC) oder Split-System ist eine in den letzten Jahren entwickelte Methode, die es leicht und schnell möglich macht, Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* und *in planta* durch Rekonstitution von Fluoreszenzmarkergenen zu detektieren (Hu *et al.*, 2002). Erstmalig wurde BiFC zum Nachweis der Lokalisation von Interaktionen zwischen Transkriptionsregulatoren der bzip-Familie („basic region-leucine zipper“) angewendet (Hu *et al.*, 2002). Dieses ursprüngliche System basiert auf der Zusammenführung von zwei nichtfluoreszierenden Peptidhälften des "yellow fluorescent protein" (YFP) zu einem funktionellen Chromophor, sobald die Proteineinheiten in direkte räumlich Nähe gebracht werden. Die Rekonstitution des YFP erfolgt durch die Expression von amino- bzw. carboxylterminalen Fusionen von miteinander interagierenden Proteinen an den Chromophorhälften (Hu *et al.*, 2002; de Virgilio *et al.*, 2004). BiFC wurde u.a. in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* (Bracha-Drori *et al.*, 2004) sowie in Zellen von *Allium cepa*

erfolgreich angewendet (Bracha-Drori *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004). Die Nutzung der Methode wurde ebenfalls durch transiente Agroexpression in Parenchymzellen von *Nicotiana benthamiana* gezeigt. Walter *et al.* (2004) demonstrierten hier die Homo-Dimerisierung des Transkriptionsfaktors bzip. Ein deutlicher Vorteil des Fluorophor-basierenden Splitsystems ist, dass keine exogenen Farbstoffe oder Färbetechniken angewendet werden müssen und die Fluoreszenz schnell und stabil zu beobachten ist.

Des Weiteren wurden Systeme, die Kombinationen verschiedener Fluoreszenzproteine verwenden, entwickelt, um Interaktionen mehrerer Proteine zu charakterisieren, denn viele zelluläre Proteine haben die Möglichkeit mit einer Vielzahl von Proteinen zu interagieren. Um Interaktionen mehrerer Proteine in derselben Zelle sichtbar zu machen, wurde das „Multicolor BiFC“ System entwickelt (Hu und Kerppola, 2003). Dieses System basiert auf der Zusammenführung von Fluorophor-Hälften, (s.o. BiFC System), durch die Verwendung mehrerer unterschiedlicher Farbspektren. Das „Multicolor BiFC System“ ermöglicht die Untersuchung der Interaktion mehrerer Proteine zum gleichen Zeitpunkt mit demselben Protein. Darüber hinaus kann Konkurrenzverhalten, d.h. Interaktion von zwei Proteinen mit einem dritten gemeinsamen Partner analysiert werden (Hu und Kerppola, 2003; Jach *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008). Eine Übersicht über die Möglichkeiten und deren Anwendungen von den unterschiedlichen BiFC Systemen wurde von Kerppola (2008) ausführlich dargestellt.

#### **1.3.4. Untersuchungen von Protein-Protein Interaktionen zur Charakterisierung von Virus-Wirt-Beziehungen**

Von den zahlreichen methodischen Möglichkeiten zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen stellt das YTH System neben der massenspektrometrischen Analyse nach wie vor die am besten geeignete Methode dar, um effiziente Hochdurchsatz-Durchmusterungen auf Proteinebene durchzuführen (von Mehring *et al.*, 2002). YTH ist besonders geeignet für die Untersuchung gesamter Transkriptome z.B. von cDNA Bibliotheken (Legrain und Selig, 2000; Uetz und Hughes, 2000). Die unvermeidbaren Falsch-positiven und

Falsch-negativen Ergebnisse, die durch auftretenden falsch-positiven und falsch-negativen Interaktionen im YTH entstehen, können durch nachfolgende Sequenzanalysen und Verifizierungen von Interaktionsreaktionen in YTH-unabhängigen Methoden reduziert werden (1.3.3.).

Viele Beispiele aus der Literatur zeigen, dass YTH eine effektive Methode ist, um das Zusammenspiel der Virus-Wirt Interaktionen auf Proteinebene zu charakterisieren und durch das Screening von cDNA Bibliotheken näher zu bestimmen.

Die Helferkomponenten-Proteasen (HC-Pro) der Potyviren sind in diesem Zusammenhang des Öfteren in YTH-basierenden Untersuchungen verwendet worden. Das HC-Pro des potato virus A wurde in einem Gal4 basierenden Hefesystem auf Interaktion mit einer Kartoffel cDNA Bibliothek überprüft. Resultierend konnte ein RING Finger Protein (HIP1) identifiziert werden, welches an der viralen Infektion der Pflanze beteiligt sein könnte (Guo *et al.*, 2003). Daraus resultierend ist eine Funktion beim Proteinabbau ebenfalls denkbar (Freemont, 2000).

Die HC-Pro des potato virus Y (PVY) wurde zur Durchmusterung einer cDNA Bibliothek aus *N. tabacum* verwendet. Der als "chloroplast division-related protein" (*AtMinD*) identifizierte Kandidat zeigt Homologie zum Polypeptid *NtMinD*, welches für die Chloroplastenteilung verantwortlich ist (Jin *et al.*, 2007). Die Autoren vermuteten, dass die HC-Pro-NtMinD Interaktion zur Hemmung der Chloroplastenteilung führt und somit die Chloroplastenanzahl in infizierten Pflanzen sinkt, was das Auftreten von Chlorosen zur Folge haben kann (Pompe-Novak *et al.*, 2001). Als weitere Interaktionspartner der HC-Pro des PVY wurden in Untersuchungen von Jin *et al.* (2008) drei Untereinheiten des 20S Proteasom von *A. thaliana* identifiziert.

Das am Zell zu Zell Transport beteiligte NSm Protein des tomato spotted wilt virus (TSWV) wurde auf Interaktion gegen verschiedene cDNA Bibliotheken aus Tomate, Tabak und *A. thaliana* in Gal4 basierenden Systemen geprüft (Soellick *et al.*, 2000; von Bargen *et al.*, 2001; Paape *et al.*, 2006). Dabei konnte u.a. eine Übereinstimmung durch die Identifikation von Proteinen der DNAJ Familie gefunden werden. DNAJ Proteine sind Schlüsselregulatoren der Hitzeschockproteine Hsp70 Chaperone, Proteine die u.a. für Proteinfaltung

verantwortlich sind. Diese Interaktion deutet darauf hin, dass eine mögliche Beteiligung am Hsp70 abhängigen Mechanismus für das TSWV vorliegt. Des Weiteren wurde ein Protein aus *A. thaliana* als Interaktionspartner identifiziert, welches am intra- und interzellulären Transport in Zellen beteiligt ist und somit die Funktion des Zell zu Zell Transport des NSm Proteins bestätigt (Soellick *et al.*, 2000; von Bargen *et al.*, 2001; Paape *et al.*, 2006).

Eine Bibliotheks durchmusterung wurde mit dem P0 Protein des beet western yellows virus (BWYV) im Gal4 basierenden YTH System gegen eine cDNA Bibliothek von *A. thaliana* durchgeführt (Pazhouhandeh *et al.*, 2006). P0 ist silencing suppressor und Pathogenitätsfaktor des BWYV. Die Autoren konnten im Rahmen dieser Arbeit herausstellen, dass P0 ein F-box Motiv besitzt und zusätzlich mit zwei Proteinen der E3 Ligase Interaktion zeigt. Als Schlussfolgerung dessen wird P0 die Funktion eines F-box Proteins zugesprochen, welches für die Rekrutierung von Abbauproteinen verantwortlich ist.

Das CI-Protein des plum pox virus (PPV) wurde als virales Protein für einen LexA basierenden YTH Screen gegen eine cDNA Bibliothek aus *N. benthamiana* verwendet. Als entscheidendes Ergebnis konnte die Interaktion mit einem Protein des Photosystems I, PSI-K identifiziert werden. Die Interaktion des CI Proteins mit diesem Protein aus Chloroplasten zeigte, dass PSI-K einen negativen, hemmenden Einfluss auf die virale Infektion des PPV hat (Jimenez *et al.*, 2006).

Das Hüllprotein P2 des rice dwarf virus konnte im Gal4 Hefesystem beim Durchmustern einer cDNA Bibliothek aus Reis auf Protein-Protein Interaktion untersucht werden. Resultierend wurde eine Interaktion mit einer Reis „ent-kaurene“ Oxidase identifiziert, die an der Biosynthese des Phytohormons Gibberellin beteiligt ist. Aufgrund des Symptoms der Zwergwüchsigkeit, das durch das Virus verursacht wird und den nachgewiesenen Interaktionsergebnissen, schlussfolgern die Autoren, dass P2 eine entscheidende Rolle für die Verringerung des Pflanzenwachstums spielt (Zhu *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse der hier nur in Auszügen, beispielhaft vorgestellten Arbeiten von Protein-Protein Interaktionen bei der Durchmusterung pflanzlicher cDNA-Banken mit pflanzenviralen Proteinen als „bait“ zeigen, dass Hinweise auf funktionelle Wechselwirkungen in Virus-Wirt-Interaktionen aus diesen Untersuchungen

abgeleitet werden können. Es ist somit denkbar, dass die Durchmusterung einer cDNA Bibliothek aus Zuckerrübe mit dem Pathogenitätsfaktor P25 Rückschlüsse auf den bislang unvollständig geklärten Resistenzmechanismus der Pflanze bzw. Pathogenitätsmechanismus des Virus ermöglicht.

#### **1.4. Zielstellung dieser Arbeit**

Das Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeföhrten Untersuchungen bestand in der Charakterisierung des Pathosystems BNYVV-Zuckerrübe bezüglich der noch ungeklärten Resistenz- bzw. Pathogenitätsmechanismen.

P25 wurde als Avirulenzprodukt des BNYVV identifiziert (Chiba *et al.*, 2008). Dadurch bestand das Ziel der Arbeit in der Identifizierung von Interaktionen zwischen dem Proteom einer BNYVV-infizierten *Rz2* resistenten Zuckerrübenlinie und dem viralen Pathogenitätsfaktor P25. Daraus sollte ein besseres Verständnis des Funktionsmechanismus von P25 in Zuckerrübe resultieren.

Die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen wurde in einem LexA-basierenden YTH Screen durchgeführt. Dazu wurde in Kooperation mit vertis Biotechnologie AG (Freising) eine cDNA-Zuckerrübenbibliothek erstellt und auf Proteininteraktionen mit P25 durchmustert. Die identifizierten potentiellen Interaktionspartner des P25 sollten in Datenbankanalysen auf ihre funktionelle Identität analysiert und hinsichtlich ihrer biologischen Relevanz für die Virus-Wirt-Interaktion bewertet werden. In weiterführenden Untersuchungen sollten aus dem Yeast two-hybrid Screen selektierte Interaktionskandidaten mit Hilfe eines zusätzlichen Interaktionsassays auf ihre Wechselwirkung mit P25 verifiziert werden.

## Kapitel 2: Molecular Biology of the Beet necrotic yellow vein virus

*Plant Viruses* (2008) Vol. 2(1) 14-24

Claire Peltier<sup>1</sup>, Kamal Hleibieh<sup>1</sup>, Heike Thiel<sup>2</sup>, Elodie Klein<sup>1</sup>, Claude Bragard<sup>3</sup>, & David Gilmer<sup>1\*</sup>

\* david.gilmer@ibmp-ulp.u-strasbg.fr

<sup>1</sup> Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, laboratoire propre du CNRS (UPR 2357) conventionné avec l'Université Louis Pasteur (Strasbourg 1), 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France

<sup>2</sup> University of Goettingen, Department of Crop Sciences, Plant Virology, Grisebachstrasse 6, D-37077 Goettingen, Germany

<sup>3</sup> Unité de Phytopathologie, Université Catholique de Louvain, Croix du Sud 2bte3, B1348, Louvain-La-Neuve, Belgium

**Abbreviations:** **BNYVV**, *Beet necrotic yellow vein virus*, **CP**, coat protein; **ORF**, open reading frame ; **RB**, resistance breaking ; **TGB**, Triple Gene Block.

**Key words:** *Benyvirus*, rhizomania, *Polymyxa betae*, pathogenicity, ICTVdB Virus

### ABSTRACT

*Beet necrotic yellow vein virus* is the etiological agent of one of the most devastating sugar beet viral diseases: rhizomania. This review describes the molecular biology of the rhizomania disease, the functions of the BNYVV encoded proteins, the consequences of their expression as well as the biology of the BNYVV vector, *Polymyxa betae*. Root proliferation is an important part of the well-known characteristics of the viral infection that leads to yield and sugar losses. The extensive use of sugar beet cultivars displaying partial resistance or tolerance against virus infection allows containment of sugar yields. However, such extensive uses also permit viruliferous vector to be amplified and therefore the appearance of resistance breaking isolates. We review as well the defence strategies that may be used against rhizomania.

## INTRODUCTION

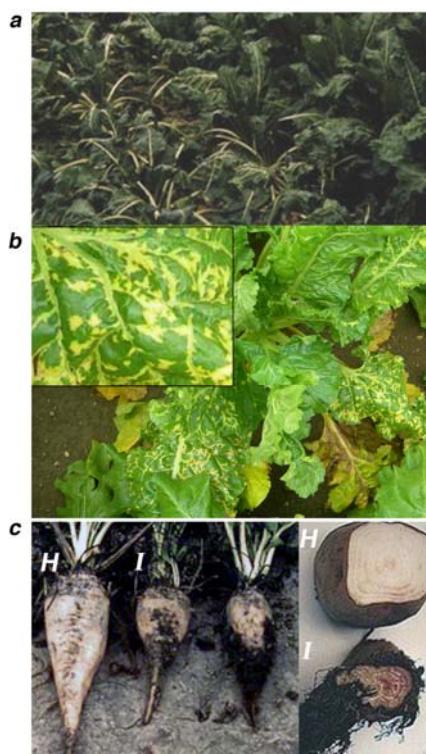
Sugar beet rhizomania possesses the potential to lower the sugar contents in the roots of susceptible sugar beet cultivars up to 20%. However, sugar companies report yield losses of 50 to 70% during sugar purification (Richard-Molard 1985). Rhizomania was first reported during the fifties in Italy (Canova 1959). Nowadays the disease is present in almost every sugar beet growing area in the world. The etiological agent was discovered by Tamada and Baba in 1973 who demonstrated that rhizomania was induced by the phytopvirus named *Beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV (Tamada and Baba 1973). Such pathogen classified among the alphavirus-like supergroup is assigned to the genus *Benyvirus* (ICTVdB, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>). BNYVV is transmitted by the soil-borne obligate parasite *Polymyxa betae* Keskin (Keskin 1964), a protist initially classified in the fungus kingdom. *P. betae* is able to form spores that are extremely resistant to biodegradation, drought and pesticides treatment, that allow viruliferous spores to rest for more than two decades in the infested soils. Breeding efforts were carried out in order to maintain the sugar production yields, resulting in the development of sugar beet hybrids partially resistant to BNYVV systemic infection. Such crops are commonly used for commercial production. Their intensive uses among the infested soils applied a positive selection pressure that raised RB isolates. Interestingly, emerging viral species possess sequence variation particularly within RNA-3; the viral component that encodes the pathogenicity determinant p25, involved in root proliferation (Koenig *et al.* 1991; Tamada *et al.* 1999).

Actual molecular studies of the rhizomania syndrome tend to reveal the resistance mechanism mediated by the *Rz* resistance gene products as well as the virus induced processes, leading to the root proliferation, particularly by the study of the RNA-3-encoded p25 protein. However, the identification of other *P. betae*-transmitted viruses associated with the rhizomania syndrome rise new questions about the disease etiology. As an example, *Beet black scorch virus* has been shown to induce rhizomania-like symptoms (Weiland *et al.* 2007).

## RHIZOMANIA DISEASE

### Symptoms

The Rhizomania syndrome refers to root madness (Rhizo: root; Mania: madness). Infected sugar beets display more or less a dwarfism that reduces the taproot size, which harbours necrosis (**Fig. 1c**). Infection shapes a wine-glass-like taproot and induces rootlet proliferations that become necrotic, abundant and fragile. These root symptoms reduced water uptake that provoke leaf fading (**Fig. 1a**). Sometimes, when the infection becomes systemic, vein yellowing, necrosis and foliar local lesions appear (**Fig. 1b**). Beet necrotic yellow vein virus was named according to these systemic symptoms.



**Fig. 1 Symptoms of sugar beet rhizomania.** (a) During warm period, water deficiencies induced by rhizomania disease provokes plant wilt. (b) Foliar symptoms are rather rare and correspond to plant systemic infection. Vein yellowing and yellow chlorotic spots are induced by the expression of the RNA-3-encoded p25 protein. (c) Typical root symptoms: infected taproot (I) are shorter, wine glass shaped and display characteristic necrosis and root proliferation compared to healthy plant (H). (Photos a and c: INRA-Colmar, b: Institut Technique de la Betterave, Paris)

Histological and biochemical properties of rhizomania diseased plants

Histological sections performed on infected taproot suggested that the infection and/or the necrosis of lateral roots induce the reprogramming of the pericycle cells to meristematic cells, which might cause the synthesis of new rootlets (Pollini and Giunchedi 1989). Moreover, viral sequences could also induce a modulation of the cellular messenger and protein expression profiles leading to root morphogenesis. Thus, root proliferation favors the viral replication and transmission. Indeed, rootlet cells are the targets of BNYVV vector, the parasite *P. betae*.

The plant hormone auxine plays a major role in plant development and particularly on root morphogenesis. Indol-3-acetic acid assays performed onto susceptible and tolerant sugar beet varieties revealed auxin level three times higher in infected plants (Pollini *et al.* 1990). Interestingly, tolerant crops possess lower auxin contents than susceptible plants. One of the questions that still need an answer is to determine if auxin variations are the initiator or the consequence of the cellular disorders induced by BNYVV infection. Comparisons of the root transcriptome of healthy beets with rhizomania infected beets lead to the identification of auxin, cell cycle, defence signalling and ubiquitin-related regulated genes (Schmidlin *et al.* 2008).

## BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS

### Taxonomy

BNYVV possesses a multipartite linear positive-sense single-stranded RNA genome that consists of four to five RNAs possessing 5' cap and polyadenylated 3' ends. BNYVV belongs to the supergroup of alphavirus-like and is the type species of the *Benyvirus* genus, which contains as well the *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV, ICTVdB: 00.088.0.01.002) (Lee *et al.* 2001). BNYVV and BSBMV are rod-shaped, share a similar genomic organization (Lee *et al.* 2001), host range, and are transmitted by the protist vector *P. betae*. However, BSBMV has only been detected within North America. BSBMV and BNYVV are closely related but are distinct viruses since *Rz* resistant genes have no effect on BSBMV accumulation (Wisler *et al.* 2003) and no cross reaction with coat protein antisera, nor cross protection have been described. Recent studies demonstrated that

BNYVV RNA-1 and -2 were able to amplify BSBMV RNA-3 and -4, but only in the absence of BNYVV small RNAs (Claudio Ratti and David Gilmer, unpublished). Both viruses could compete for similar host factors. Such hypothesis will be tested as soon as full-length infectious clones of BSBMV RNA-1 and -2 will be available. Tentative members within *Benyviruses* are *Burdock mottle virus* (BdMV, ICTVdB: 00.088.0.01.004) (Rush 2003) and *Rice stripe necrosis virus* (RSNV, ICTVdB: 00.088.0.01.003) (Morales *et al.* 1999; Van Regenmortel *et al.* 2000; Fauquet *et al.* 2005).

#### Host range

BNYVV infects plants within *Amaranthaceae*, *Chenopodiacea* and *Tetragoniaceae* families. Systemic infection occurs naturally onto *Beta vulgaris* (sugar beet) and *Beta macrocarpa*. *Nicotiana benthamiana* and *Spinacia oleracea* are systemically infected even in the absence of RNA-3 and -4. On experimental hosts, BNYVV is propagated onto *Chenopodium quinoa* or *Tetragonia expansa* that respond to the infection by chlorotic or necrotic local lesions, depending on the inoculum composition (Tamada *et al.* 1989; Koenig *et al.* 1991; Jupin *et al.* 1992).

#### Structure

Viral particles display a right-handed helical symmetry (**Fig. 2**) with a 2.6 nm pitch, 49 capsid protein subunits per repetition of 4 turns, with each subunit interacting with 4 nucleotides (Steven *et al.* 1981). The particles are not enveloped and have a diameter of 20 nm with lengths proportional to the sizes of the encapsidated RNAs, i.e, 390, 265, 105, 89 and 80 nm (Putz 1977; Tamada *et al.* 1989). Coat proteins constitute about 95% of the particle weight. The minor coat protein, a CP amber readthrough gene product (CP-RT) is present at one extremity of particles and participates both to the morphogenesis (Schmitt *et al.* 1992; Haeberle *et al.* 1994) and to the transmission of the virions (Tamada *et al.* 1996).

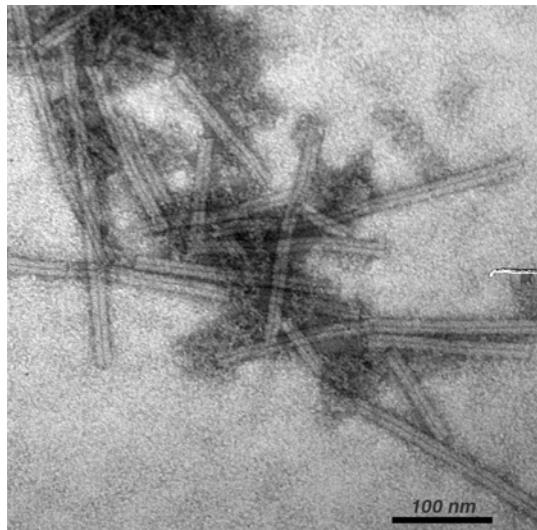


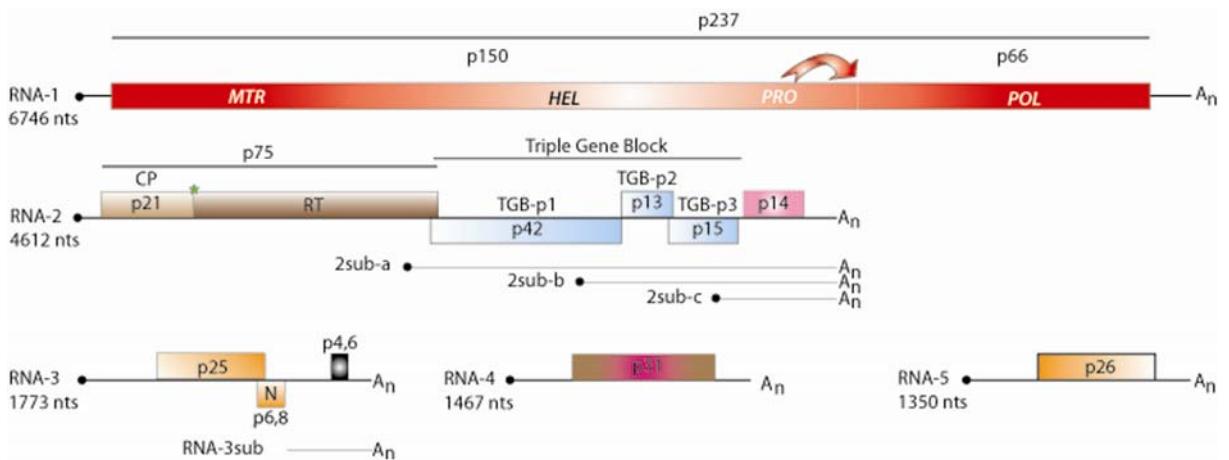
Fig. 2 Immunocaptured BNYVV particles observed by electron microscopy. (Photo M. Erhardt, IBMP).

#### Genomic organization

BNYVV has a segmented RNA genome composed of 4 to 5 genomic components (Tamada 1999). All components possess a 5' Cap ( $m^7GpppG$ ) and a 3' polyA tail. Sequencing together with the full-length infectious clones (Quillet *et al.* 1989; Link *et al.* 2005) permitted to decipher the viral genomic organization and the main functions of virally encoded proteins (Fig. 3).

RNA-1 is involved in the replication of viral RNAs (Gilmer *et al.* 1992a) and RNA-2 is necessary for encapsidation, cell-to-cell movement and RNA silencing suppression (RNA-2), as proven by protoplast and mechanical infection of leaves. RNA-1 and -2 are necessary and sufficient for the infection following leaf mechanical inoculations where small components are dispensable and, if they are present, can undergo deletion or disappear (Bouzoubaa *et al.* 1991). In natural infection, however, these small components are required. Indeed, RNA-3 allows the viral amplification in sugar beet roots and its expression influences symptoms (Tamada *et al.* 1989; Jupin *et al.* 1992), whereas RNA-4 is involved in viral transmission (Tamada and Abe 1989). Moreover, RNA-4-encoded p31 is described as a root specific silencing suppressor (Rahim *et al.* 2007). Therefore, BNYVV is a unique virus as it behaves as a bipartite virus when rub inoculated or as a tetra or pentapartite virus in natural infection. Such a property has been utilized to obtain viral expression vectors, named replicons, and derived from

RNA-3 and RNA-5 (Schmidlin *et al.* 2005). Such replicons allow the expression of various sequences within infected tissues (Schmidlin *et al.* 2005).



**Fig. 3 BNYVV genomic organization.** The sizes of the five genomic RNAs are presented. Black dot represents Cap structure and A<sub>n</sub>, the polyadenylated sequence. Squares correspond to ORF. Arrow designates the *cis* proteolysis of the RNA-1-encoded p237 polyprotein leading to the p150 and the p66 proteins. MTR, Methyltransferase domain; HEL, Helicase domain; PRO, Protease domain; POL, Polymerase domain. Star denotes the CP amber readthrough mechanism leading to the expression of minor CP-RT protein.

#### Genomic functions

**RNA-1** is 6746 nts long (without polyA) and harbours only one open reading frame (ORF). It encodes a 237 kDa polypeptide (Bouzoubaa *et al.* 1987) that contains consensus methyl-transferase (MTR), helicase (HEL), papain-like protease (PRO) and polymerase (POL). Autoproteolysis of p237 between the domains PRO and POL leads to two proteins: p150 and p60, which contain respectively the MTR, HEL, PRO and the POL motifs (Hehn *et al.* 1997). This proteolytic cleavage of the replicase protein is the significant feature of the *Benyviruses*. However, the stoichiometry of replication complex is not known.

**RNA-2** is 4612 nts long and encodes for six proteins.

The first cistron drives the synthesis the 21 kDa major capsid protein, CP. In about 10% of the translation events, CP of amber stop codon is suppressed and the

resulting readthrough leads to the synthesis of the 75 kDa minor coat protein, CP-RT (Niesbach-Klosgen *et al.* 1990; Haeberle *et al.* 1994). CP-RT is needed for the viral transmission (Tamada *et al.* 1996) and for the transient anchoring of the viral particles around mitochondria (Erhardt *et al.* 2001; Valentin *et al.* 2005). These latter studies suggest that the viral genome packaging occurs around mitochondria.

Following the structural protein encoding ORFs, a cluster of three genes, partially overlapping, known as “triple gene block” (TGB) ensures the viral cell-to-cell movement. TGB clusters are also found on other plant viral species, including *Pomo*-, *Peclu*-, *Potex*-, *Carla*- and *Hordeivirus* (Morozov and Solovyev 2003). For BNYVV, these three proteins are encoded by subgenomic RNA-2sub-a for TGB-p1 (42 kDa) and RNA-2sub-b for TGB-p2 (13 kDa) and TGB-p3 (15 kDa) (Gilmer *et al.* 1992a). TGB-p1 protein contains a helicase domain and is able to bind nucleic acids *in vitro* (Bleykasten *et al.* 1996).

Complementation studies of TGB-p1 protein with a virally expressed GFP::TGB-p1 fusion protein permitted to localize TGB-p1 in plasmodesmata only in the presence of the TGB-p2 and -p3 proteins (Erhardt *et al.* 2000). Moreover, TGB-p2 and -p3 are detected within plasmodesmata only when all the TGB proteins are expressed in the same cell (Erhardt *et al.* 2005).

ORF VI product encodes for a cystein-rich protein of 14 kDa. P14 is expressed from RNA-2sub-c. This protein is involved in the regulation of the virus replication (Gilmer *et al.* 1992a), enhances the expression of CP protein (Hehn *et al.* 1995) and acts as a weak silencing suppressor (Dunoyer *et al.* 2002).

**RNA-3** is 1773 nts long and is involved in viral pathogenicity. Its presence exacerbates root and foliar symptoms (Tamada *et al.* 1989; Jupin *et al.* 1992). This RNA is also necessary for the long distance movement of the virus (Lauber *et al.* 1998) and is responsible for the rhizomania phenotype on *Beta vulgaris* (Tamada *et al.* 1989; Koenig *et al.* 1991).

p25

The p25 protein is expressed from RNA-3 and modulates foliar (Jupin *et al.* 1992) and root symptoms (Tamada *et al.* 1999). No sequence homology is found with known proteins, except with BNYVV RNA-5-encoded p26, which only shares the Fx<sub>3</sub>FRGPGNx<sub>2</sub>L motif with p25. (**Fig. 4**).

Nucleo-cytoplasmic localization of p25 has been shown (Haeberle and Stussi-Garaud 1995). Its nuclear addressing involves the N-terminal  $_{57}\text{KRIRFR}_{62}$  NLS (Vetter *et al.* 2004). Moreover, a nuclear export sequence (NES),  $_{169}\text{VYMVCLVNTV}_{178}$ , has been found in the C-terminal part of the protein. Hence, such two sequences allow p25 to shuttle between the two compartments by the way of importin alpha and exportin 1, independantly of other viral factors (Vetter *et al.* 2004). Foliar symptom variations observed with p25 mutants suggest a partial correlation between p25 function and its subcellular localization (Vetter *et al.* 2004). If all of the p25 functions are not yet unraveled, the protein displays some common properties with transcription activators (nuclear localization, Zinc-finger-domain, acidic domain). Indeed, in yeast, its fusion to GAL4BD or LexA allows a weak transcription activation of reporter genes (Klein *et al.* 2007), as it has been reported previously for NAC transcription factor (Xie *et al.* 2000). The domain responsible for such transcription activation has been mapped between amino acid residues 103 and 160 (Klein *et al.* 2007). P25 is able to form multimers as well, only if full-length proteins are maintained (Klein *et al.* 2007). Post-translational modifications of p25 have been evidenced by its electrophoretic mobility (Niesbach-Klosgen *et al.* 1990; Klein *et al.* 2007) and its immunodetection after two dimensional gel eletrophoresis reveals different isoforms that mainly differ by their isoelectric point corresponding to phosphate group addition (unpublished). Aspartic acid and alanine scanning mutagenesis of predicted phosphorylation sites revealed the importance of such phosphorylation for the multimerization, nuclear import as well as the transcription activation. Only mass spectrometry analyses will permit the exact identification of such phosphorylation events on the p25 sequence.

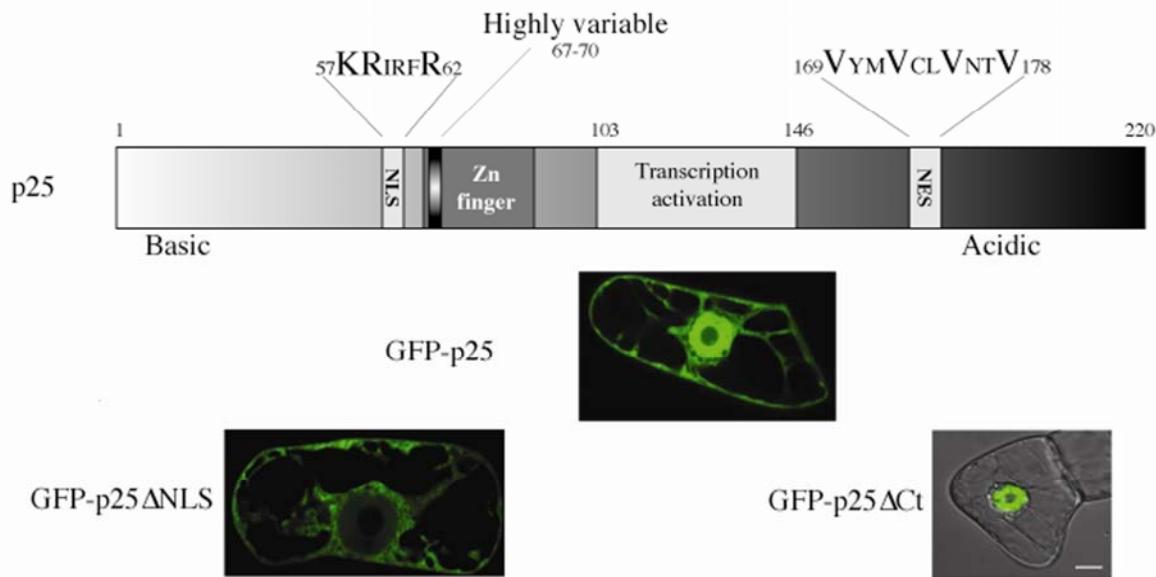


Fig. 4 Characteristics of the RNA-3-encoded p25: Line drawing representation of the p25 protein and of its known functional domains. (Top) The basic N-terminal domain contains a nuclear localization signal (NLS, 57-62), the highly variable 'Tetrad' sequence (67-70) and a Zinc finger domain. The acidic C-terminal part of the protein encompasses a domain responsible for the transcription activation (103-146) and the nuclear export sequence (NES, 169-178). (Center) Transient expression of a GFP-p25 fusion leads to the localization of the protein in the nucleus and in the cytoplasm of the cell, whereas removal of the NLS (GFP-p25 $\Delta$ NLS, bottom left) prevents the nuclear addressing of the fusion protein. Deletion of the C-terminal domain that contains the NES motif leads to the accumulation of the fusion protein in the nucleus (GFP-p25 $\Delta$ Ct, bottom right).

RNA-3 potentially encodes two other proteins

BNYVV RNA-3 as well as BSBMV RNA-3 encode potentially for two other proteins. The N-gene could allow the synthesis of a 6.8 kDa protein that has been found expressed only from RNA-3 truncated forms, fused or not with p25 ORF (Jupin *et al.* 1992). In such situations, expression of the protein induces severe necrosis on *T. expansa* and *C. quinoa* leaves (Jupin *et al.* 1992). Fused to GFP protein, p6.8 is localized to cortical reticulum even in the absence of viral infection (David Gilmer, unpublished). However, its expression has never been detected under natural conditions, leading to the hypothesis that this ORF is cryptic. The

last ORF encodes potentially for a 4.6 kDa polypeptide (p4.6). Such protein could be expressed from the so-called RNA-3 subgenomic species (RNA-3 sub) that corresponds to the last 550 nts of the RNA (Balmori *et al.* 1993). The functions of this short RNA and its encoded peptide, if it is expressed, are still unknown.

#### A particular function for RNA-3

BNYVV RNA-3 has been used to map 5' and 3' *cis* acting elements required for its replication and encapsidation and for the characterization of their secondary structure in solution (Jupin *et al.* 1990; Gilmer *et al.* 1992b, 1993; Lauber *et al.* 1997, 1999). However, such RNA possesses another function, which seems independent of its expression. Onto *B. macrocarpa*, RNA-3 is absolutely required for systemic spread of the virus. The RNA-3 sequence required for such systemic movement was located between nts 1033 and 1257 (Lauber *et al.* 1998). Curiously, complementation of BNYVV Stras12 strain, which contains only RNA-1 and -2, with BSBMV RNA-3 allows systemic movement of the viral particles. (Claudio Ratti and David Gilmer, unpublished). A common sequence of 20 nts is found between both RNA species. Complementary experiments will allow deciphering the exact mechanism that permits the long distance movement.

**RNA-4** is 1467 nts long and encodes for a 31 kDa protein (p31), which is essential for the efficient transmission of the virus by *P. betae* (Tamada and Abe 1989; Rahim *et al.* 2007). RNA-4-encoded protein could act in synergy with the minor p75 coat protein. P31 modulate foliar symptoms, and has been recently described as a root specific silencing suppressor (Rahim *et al.* 2007).

**RNA-5** is present only within particular isolates (see below) and is 1350 nts long. It encodes a 26 kDa protein (p26), which induces severe rhizomania symptoms, reducing sugar yields (Heijbroek *et al.* 1999). Full-length infectious cDNA clone allowed the analysis of RNA-5 expression upon viral pathogenesis and the obtention of a new viral expression vector (Link *et al.* 2005; Schmidlin *et al.* 2005). Viral expression of p26 induces severe necrosis onto *C. quinoa* leaves. P26 protein is localized in the nucleus and in the cytoplasm of infected cells. Moreover, when p26 is fused to GAL4DB or LexA, the fusion proteins are able to strongly activate the transcription in yeast (Link *et al.* 2005).

#### Sequence variations

Restriction fragment length polymorphism, single-strand conformation polymorphism, sequence analyses and the presence or the absence of a fifth RNA in viral isolates permitted to classify BNYVV in different groups that are serologically identical (Kruse *et al.* 1994; Koenig *et al.* 1995). The distinction between A and B-type is possible by the characterization of amino acid residues variations of the RNA-2-encoded CP in position 62, 103 and 172 (**Table 1**). Eight variable residues within RNA-5-encoded p26 permit the distinction between European (P-type) or Asian (J-type) RNA-5 (**Table 1**). European P-type RNA-5s have a shorter 5'UTR and their coding region is four codons longer than J-type RNA-5s (**Table 1**). Such composition and size differences do not interfere on the known properties of p26 (Link *et al.* 2005): both proteins induce similar foliar symptoms, localize in the nucleus and in the cytoplasm and are able to activate the transcription in yeast (Link *et al.* 2005) (David Gilmer, unpublished). It should be noted here that RNA-5-containing isolates could harbour an A or B-type RNA-2 (Miyanishi *et al.* 1999; Koenig and Lennefors 2000; Schirmer *et al.* 2005). A-type viruses are found in European countries, Iran, USA, China and Japan. B-type is particularly present in France, Germany, Switzerland, Sweden as well as in China and Japan (Miyanishi *et al.* 1999; Suarez *et al.* 1999; Lennefors *et al.* 2000; Sohi and Maleki 2004). RNA-5 containing isolates were discovered in Japan (Tamada *et al.* 1989; Kiguchi *et al.* 1996), France (Koenig *et al.* 1997), China (Dawei *et al.* 1999), Kazakhstan (Koenig and Lennefors 2000) and in England (Harju *et al.* 2002; Ward *et al.* 2007). Phylogenetic studies were performed on RNA-3 (Schirmer *et al.* 2005). Characterisation of RNA-3-encoded p25 sequences permitted the identification of a highly variable sequence motif between position 67 and 70 named 'tetrad' (**Table 1**) (Schirmer *et al.* 2005). Recently, new tetrad motifs have been found (Ward *et al.* 2007) (Audrey Schirmer, unpublished). RNA viruses endorse strong mutation rates that allow them to adapt rapidly to various situations (Domingo 2000), keeping their genetic robustness and their infectivity even in the presence of mutations (Drake and Holland 1999). Analysis of selective pressure on p25 sequences revealed that 'tetrad' sequence as well as amino acid residue 198 were submitted to high positive selection pressures (Schirmer *et al.* 2005) similar to those described for animal viruses bypassing mammalian immunity system (Fares *et al.* 2001). Such a positive selection could explain the adaptation

of BNYVV to resistance genes (Schirmer *et al.* 2005) and has recently been validated for the tetrad motif (Acosta-Leal *et al.* 2008).

**Table 1** Sequence variation within BNYVV RNA-2 encoded structural protein CP and RNA-3 and -5 encoded pathogenicity factors p25 and p26, respectively. Δ, deletion; \* and \*\* refer to the presence of P-type or J-type respectively. (adapted from Schirmer *et al.* 2005)

<b>CP<sup>1</sup></b>										
<i>Position</i>	62	10	172							
			3							
<i>B-type</i>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>F</b>							
<i>A-type</i>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>L</b>							
<b>p25 'Tetrad'<sup>2</sup></b>										
<i>Position</i>	67	68	69	70						
<i>A-type</i>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>G</b>						
<i>A-type</i>	<b>A</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>G</b>						
<i>A-type</i>	<b>A</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>R</b>						
<i>B-type</i>	<b>A</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>R</b>						
<i>A-type</i>	<b>A</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>G</b>						
<i>A-type</i>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>H</b>	<b>G</b>	*					
<i>A-type</i>	<b>A</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>G</b>						
<i>B-type</i>	<b>A</b>	<b>Y</b>	<b>H</b>	<b>R</b>						
<i>A/B-type</i>	<b>A</b>	<b>Y</b>	<b>H</b>	<b>G</b>	**	C. Bragard, unpublished				
<i>A-type</i>	<b>A</b>	<b>Y</b>	<b>P</b>	<b>R</b>		A. Schirmer, unpublished				
<i>A-type</i>	<b>A</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>	<b>V</b>	**					
<i>A-type</i>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>H</b>	<b>G</b>	*					
<i>A-type</i>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>H</b>	<b>G</b>	*	(Ward <i>et al.</i> 2007)				
<i>A-type</i>	<b>V</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>G</b>						
<i>A-type</i>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>H</b>	<b>G</b>						
<b>p26<sup>3</sup></b>										
<i>Position</i>	30	69	77	10	142	14	14	174	200	227-229
				3		6	9			
<i>P-type</i>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>NNN</b>
<i>J-type</i>	<b>H</b>	<b>F</b>	?	<b>D</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>R</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	?

<sup>1</sup> Amino acid sequence variation within the coat protein that permit the distinction between A- or B-type of BNYVV.

<sup>2</sup> Amino acid sequence variation observed within the hypervariable Tetrad sequence of the BNYVV p25 protein. Some of those sequence variations are specific to A or B-type strains.

<sup>3</sup> Differences observed between asian (J-type) and P-type p26 proteins.

## PATHOGENICITY

Root alterations occur similarly when A- or B-type viruses set the infection; however, isolates that contain RNA-5 are more aggressive, particularly onto resistant crops, accumulate at higher concentration and induce severe rhizomania symptoms (Heijbroek *et al.* 1999). Such a pathogenicity was retrieved onto host plants with artificial isolates (Link *et al.* 2005). However, the presence of RNA-5 is not sufficient to explain the increased virulence of some isolates as RB occurred in the U.S., where RNA-5 is absent (Liu *et al.* 2005). Molecular analyses of RB isolates revealed the presence of amino acid variation within the p25 tetrad sequence (Acosta-Leal and Rush 2007; Liu and Lewellen 2007) as well as amino acid residue 135 (Acosta-Leal and Rush 2007). Using artificial isolates that mimics such changes, virologists will be able to conclude if tetrad motif by itself is sufficient or requires another viral partner (e.g. encoded by RNA-1 or -2) to overcome *Rz* effect. Some preliminary experiments performed onto p25 revealed the importance of the tetrad motif upon the protein properties. Changing a B-type p25 tetrad sequence by one of the identified motifs drastically modifies the foliar symptoms, transcription activation and multimerization properties of p25 (Klein *et al.* 2007). Klein *et al.* suggested that p25 could behave as an avirulence gene product that could modify host responses. Chiba *et al.* (2008) recently demonstrated that p25 is indeed an *Avr* protein in *B. vulgaris*.

### The Polymyxa betae vector

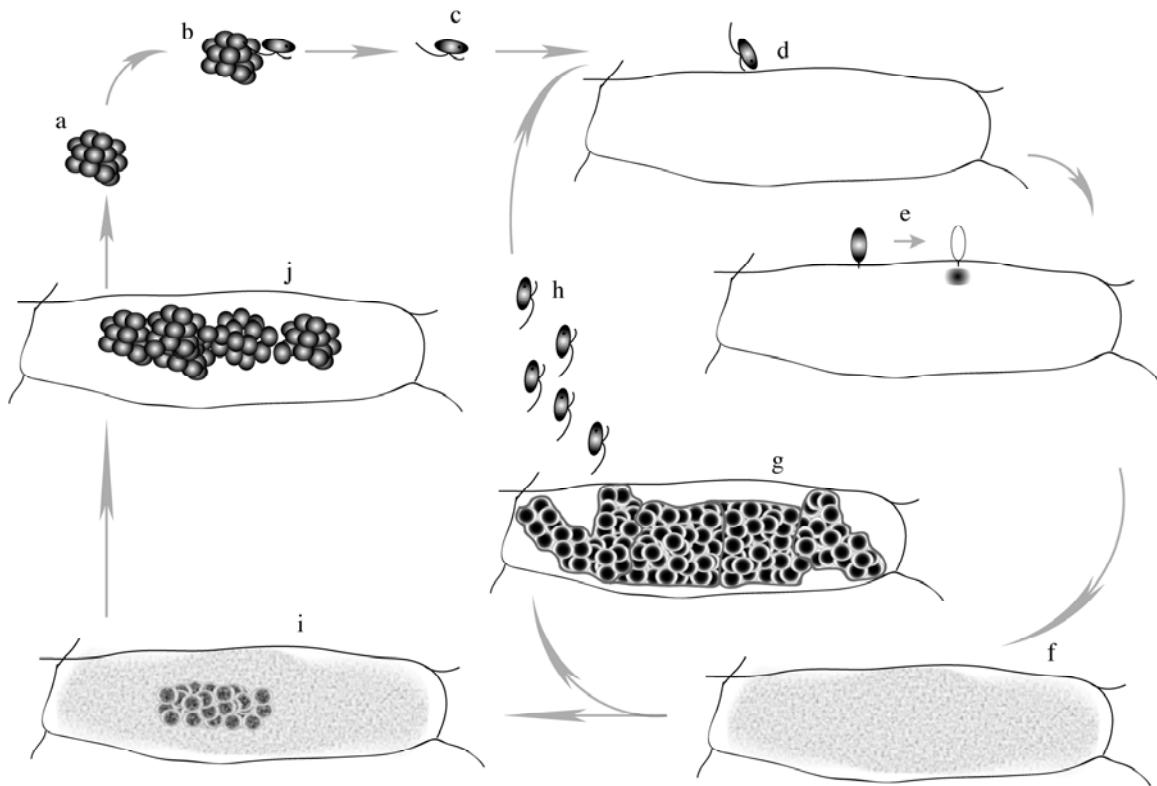
Besides BNYVV, three other viruses are also linked with rhizomania, namely the *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV), the *Beet soil-borne virus* (BSBV) and the *Beet virus Q* (BVQ) (Meunier *et al.* 2003). All these viruses are transmitted to beet by the vector *P. betae* Keskin, an obligate parasite that develops in the epidermal and cortical root cells. The *Polymyxa* genus is represented by two economically very significant species: *P. graminis* Ledingham is specific to cereals (rice, wheat,

barley) and *P. betae* to the *Chenopodiaceae* (*Beta vulgaris*, *Spinacia oleracea*, *Atriplex patula*, *Chenopodium bonus-henricus*, *C. hybridum* and *C. polyspermum*) and species like *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae* and *Portulaceae* (Abe and Tamada 1986; Barr 1988; Legrèvre *et al.* 2000, 2005). Recent molecular studies of the characterization of the ITS (internal transcribed spacers) regions of the ribosomal DNA support species separation (Legrèvre *et al.* 2002). *P. betae* is ubiquitous. Its distribution covers all beet-growing areas (Rush 2003). *P. betae* belongs to the *Plasmodiophoridae*, a monophyletic group including ten genera. For a long time ranked among the lower fungi, it is now classified as a protist (Archibald and Keeling 2004). The host range of *P. betae*, long considered to be narrow, now appears to be wider. *P. betae* was recently detected by RT-PCR in the roots of some species of *Brassicaceae*, *Papaveraceae*, *Poaceae* and *Urticaceae* (Anne Legrèvre, unpublished). Although only a low level of infection was detected in these species, it could facilitate viral recombination or help to maintain the viral load in the vector.

#### *P. betae* cycle

The viruses transmitted by *Polymyxa* spp. are internalised by the vector (Chen *et al.* 1991; Rysanek *et al.* 1992; Campbell 1996; Verchot-Lubicz *et al.* 2007). The biological cycle of the viral diseases they transmit thus depends on the vectors life cycle (**Fig. 5**). This vectors great capacity for survival explains, firstly, the recurrence of viral diseases in contaminated fields and, secondly, their dissemination either through the soil adhering to agricultural machinery and produce or via drainage and irrigation water. In the absence of host plant radicles, *P. betae* survives in the soil in the form of sporosores (which may be viruliferous). Sporosores are spore clusters of 5 to 7 µm in diameter with a very thick, strong wall that can live for many years in the soil (Adams 1990; Maraite 1991). In the presence of host plants, resting spore germination releases biflagellated zoospores 4-5 µm in size which move through the free water in the soil before encysting on a root hair or epidermal cell of a host plant root. In order to penetrate the cell, a dagger-like structure called “Stachel (sting)” is formed in the encysted zoospore (Keskin and Fuchs 1969) and a sticky tube develops between the cyst and the plant cell wall. The Stachel, which is injected into the host cell through the

tube, pierces the cell wall and the plasma membrane and allows the zoospore content to be transferred into the cytoplasm of the host cell (Barr 1988). Cruciform nuclear divisions indicative of mitosis lead to the formation of a multinucleate plasmodium surrounded by a thin membrane. In the sporangial phase this plasmodium develops into a multi-lobed zoosporangium enclosed by a thin wall within which the secondary zoospores are formed. The latters are released outside the root, or sometimes into the deeper root cells, by small plasmodial cells, which dissolve a hole in the cell wall (Barr 1988). In the sporogenic phase non-cruciform nuclear divisions are observed, with the formation of synaptonemal complexes characteristic of meiosis (Braselton 1988). The plasmodium divides into mononucleate cells by forming membrane layers within the cytoplasm. A four to five-layer wall is then deposited between the cells, with adjacent spores remaining connected by bonds between the two outermost layers (Chen *et al.* 1998). The sporosores formed remain in the root debris and are released into the soil by root decomposition. Within this life cycle the moments of cell fusion and karyogamy have not yet been pinpointed. Observation of double size quadriflagellate zoospores (Ledingham 1939) suggests fusion of two zoospores, but the moment of nuclear fusion is not known. The determinants for development of the various phases are likewise unknown (Braselton 1995). However, the host and the degree of root colonisation appear to be significant (Legrèvre *et al.* 1998). Three conditions are essential for root infection by this parasite: (1) presence of a host plant; (2) presence of free water in the soil to promote germination and facilitate zoospore access to the roots, and (3) a sufficiently high temperature between 10 and 30°C, ideally between 20 and 25°C according to the origin of the strains (Legrèvre *et al.* 1998; Webb *et al.* 2000). Hot, wet springs are therefore propitious to early infections, as are light, sandy, well-drained soils as these heat up faster than heavy organic soils with high retention capacity (Webb *et al.* 2000). The soil pH and calcium content also affect vector activity. Spore germination and root infection by zoospores are affected by acid pH conditions (Abe and Tamada 1987). They are promoted in neutral or alkaline pH soils, especially if the calcium and magnesium levels are greater than 350 and 20 mg/100 g of soil respectively (Goffart and Maraite 1991). Managed liming and practices for regulating soil pH and calcium levels would probably result in better control of rhizomania.



**Fig. 5 Drawing of the *Polymyxa* spp. life cycles and its developing states.** (a) sporosore; (b) germinating zoospore; (c), swimming zoospore to a (d) cortical or epidermal cell; (e) the zoospore encyst on the cell and injects its contents through the cell wall and the cellular membrane via the “satchel”; (f), developing plasmode that will tend to a zoosporangium (g) that will issue either (h) the secondary zoospores able to infect new cells or (i) to the sporogenous plasmod (j) leading to new sporosores. Such sporosores will be further released in soil after root decomposition

#### Vector detection

Plant infection by *P. betae* is not apparent from any particular symptoms. Until the early 1990s this parasite was detected in roots by observing the roots under the microscope following colouring with Lactophenol Cotton Blue. This fairly laborious method was initially used to study the vectors ecological requirements and the soil infectious potential levels by the most probable number technique, growing trap

crops on soil dilutions (Tuitert 1990). Molecular techniques (DNA probes, PCR, nested PCR, ELISA) have greatly facilitated rapid detection of *P. betae* in roots and even in soil (Mutasa *et al.* 1996; Kingsnorth *et al.* 2003; Ward *et al.* 2005). Multiplex RT-PCR enables the presence of *P. betae*, BNYVV, BSBV and BVQ to be revealed in a single test using a root RNA extract (Meunier *et al.* 2003).

### Virus-vector interactions

Modes of virus acquisition and transmission by plasmodiophorids have been described (Rochon *et al.* 2004). These viruses survive in the spores in a form that has not yet been clarified. However, accumulated RNA and movement proteins of *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) and capsid proteins of *Wheat spindle streak virus* (WSSMV) within the resting spores of the vector, *P. graminis*, probably denote the presence of ribonucleoprotein complexes (Driskel *et al.* 2004). In the case of BNYVV, both the sporosores and the plasmodia of *P. betae* are labelled using antibodies against the viral capsid protein (Doucet 2006). Structural and non-structural proteins have been detected in *P. betae* spores and zoospores. These results suggest that this vector could also be a BNYVV host (Verchot-Lubicz *et al.* 2007). When transmitted by the viruliferous zoospores, the virus is present in particle form. Virus transmission by plasmodiophorids was for many years regarded as a passive mechanism, which occurred during mixing of plant cell cytoplasms and the protozoan, prior to membrane formation (Campbell 1996). However, recent research has revealed the special role played by some viral proteins in the process of transmission by the vector. The BNYVV capsid protein readthrough (RT) domain plays an important part in the transmission process, since deletions in the C-terminal portion of this domain are correlated to loss of virus transmission. Substituting the four KTER amino acids located in position 553 to 556 of the RT domain by the ATAR motif completely blocks transmission (Tamada *et al.* 1996). A comparative analysis of the viral genomes transmitted by plasmodiophorids, which do not have the same genomic organisation, has identified the presence of two complementary transmembrane domains in the RT domains of the capsid protein of *Beny-*, *Furo-* and *Pomovirus* and in the P2 proteins of *Bymovirus* (Adams *et al.* 2001). Deletion or substitution of the second domain also blocks transmission by the vector. The molecular model is not yet

detailed, but the transmembrane helical sequences may perhaps determine a particular structure facilitating membrane invagination and virus movement through the membrane of the vector (Adams *et al.* 2001). Although the molecular mechanism of the interaction is far from fully explained, the involvement of protein p31, coded by RNA-4, is strongly suspected. Two independent studies of comparative transmission of wild or mutated viruses in the coding sequence for protein p31 have in fact shown a big decrease in protein p31 mutant transmission (Rahim *et al.* 2007) (Anne Legrèvre, personal communication). In addition to its role in transmission, protein p31 is also thought to play a part both in inducing symptoms in *Nicotiana benthamiana* and in suppressing RNA silencing in roots, without affecting viral RNA accumulation (Rahim *et al.* 2007).

#### Genetic resistance strategies used against rhizomania disease

One of the major goals of the sugar beet industry is to stabilize the sugar yields. Due to the large area covered by rhizomania infested fields, calculated to span approx. 610,000 ha in 2000 (Richard-Molard and Carriolle 2001), a qualitative and quantitative high yielding sugar beet production is only given by growth of resistant cultivars. Since the first attempts in achieving rhizomania resistant breeding material, resistance sources were found in germplasms or wild type *B. vulgaris* ssp. *maritima*, which all confer phenotypes of quantitative resistance (**Table 2**). Involvement of additional minor genes for the expression of the rhizomania resistance trait is most likely (Biancardi *et al.* 2002). Nowadays, hybrid varieties (**Table 2**) that do not or poorly develop symptoms, display reduced virus content have replaced susceptible varieties.

The first selection of partial resistant BNYVV sugar beet genotypes started at the end of the seventies. Sugar beets characterized by reduced virus symptoms, increased white sugar content and increased processing quality were subsequently selected (de Biaggi 1987; Lewellen *et al.* 1987). Although these sugar beet genotypes were also infected with BNYVV, the symptoms were less pronounced and plants displayed a better performance in field trials (Bürcky 1987). In 1983, the US-American Holly Sugar Company identified the “Holly” resistance representing the first described BNYVV resistance source (Lewellen *et al.* 1987; Biancardi *et al.* 2002). ‘Holly’ carries the resistance gene *Rz*, which was renamed

*Rz1* (Scholten *et al.* 1999). Holly does not show rhizomania symptoms, but allows the virus to replicate as shown by the viral titer contents in such varieties (Scholten and Lange 2000). ‘Rizor’ was the first diploid hybrid partially resistant to rhizomania (Richard-Molard 1985; de Biaggi 1987). In the eighties, further resistance sources were identified in Danish tests of *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (L.) Arcang wild-beet germplasms leading to WB41 and WB42 sources (**Table 2**) representing *Rz3* and *Rz2* resistance genes, respectively (Lewellen *et al.* 1987; Whitney 1989). Greenhouse tests performed applying severe infestation conditions have revealed the better performance of *Rz2* versus *Rz1* resistance genes suggesting a different origin of both genes (Scholten *et al.* 1999). However, these genes are present within ChrIII at a distance range of 20 cM (Scholten *et al.* 1994, 1999) to 35 cM (Amiri *et al.* 2003). *Rz3* resistance gene (**Table 2**) has been also mapped on ChrIII at about 5 cM from *Rz1*, suggesting that *Rz2* and *Rz3* might be allelic (Gidner *et al.* 2005). Recently, the use of the hybrid line R36 permitted the identification of a new QTL named *Rz4* (**Table 2**), which confers partial resistance to BNYVV infection (Grimmer *et al.* 2007). *Rz1* or *Rz2* carrying cultivars reduce viral titer up to  $6 \times 10^4$  fold when compared to susceptible lines (Acosta-Leal *et al.* 2008). However, their systematic use might favor genetic drift of viral population that seems to accumulate nucleotide variation twice rapidly, leading to high probability for the emergence of RB isolates (Acosta-Leal *et al.* 2008).

Growing of BNYVV resistant sugar beet cultivars is generally accepted as the only strategy to keep sugar beet cultivation in infested fields profitable. Reports about increased aggressiveness of BNYVV P-type (France) and appearance of new BNYVV A-types (USA: Imperial Valley, California and Minnesota) have been published (Liu *et al.* 2005; Liu and Lewellen 2007). These interesting studies show the viral overcome of *Rz1* carrying cultivars in the field and measure increased BNYVV levels in hair-roots of *Rz1* plants in greenhouse resistance tests.

Artificially generated resistance represents an alternative to the natural resistance (**Table 2**). The transgenic expression of virus-derived sequences that form double-stranded RNA (dsRNA) has been obtained and lead to BNYVV resistance (Lennefors *et al.* 2006, 2008). Expression of dsRNA induces RNA silencing (Baulcombe 2004, 2005; Filipowicz *et al.* 2005), an innate defense mechanism

against invasive nucleic acids that leads to the sequence specific degradation of RNA. High levels of resistance to rhizomania were obtained in sugar beets expressing a 0.4 kb inverted repeat construct based on a partial BNYVV replicase gene derived sequence (**Table 2**) (Lennefors *et al.* 2006).

Transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein (Scholten and Lange 2000), or a mutated form of one of the tree movement protein TGB-p3 (Lauber *et al.* 2001) or the sequence derived from RNA-1 (Lennefors *et al.* 2006, 2008) both generate higher protection levels than *Rz1*.

**Table 2** Characteristics of the *Rz* resistance genes and transgenic sequences (underlined) used in sugar beet crops. All *Rz* genes are located on Chr. III; PDR: pathogen-derived resistance.

Hybrid variety	Origin	Resistance gene	Nature	Resistance level
Holly	<i>B. vulgaris</i> ssp. <i>vulgaris</i> (California)	<i>Rz1</i>	Dominant	Low < good depending on inoculum
WB42	<i>B. vulgaris</i> ssp. <i>maritima</i> (Denmark)	<i>Rz2</i>	Dominant	<i>Rz2</i> > <i>Rz1</i>
WB41	<i>B. vulgaris</i> ssp. <i>maritima</i> (Denmark)	<i>Rz3</i>	Partially dominant	Variable Allelic to <i>Rz2</i> ?
R36	<i>B. vulgaris</i> ssp. <i>maritima</i>	<i>Rz4</i>	Allelic to other <i>Rz</i> ?	Partial resistance
4D6834	<i>B. vulgaris</i>	<i>Movement protein</i>	PDR	Excellent
G018	<i>B. vulgaris</i>	<i>Replicase</i>	PDR/PTGS	Excellent
-	<i>B. vulgaris</i>	<i>CP</i>	PDR	Good

## CONCLUSIONS

BNYVV RNA-3 and in particular the p25 protein constitutes the rhizomania disease keystones. New emerging isolates tend to bypass resistance genes by the modification of the p25 gene sequence. Sequence variations within p25 combined with the post-translational modifications make the study of this protein rather difficult. Further studies will aim to characterize the major functions of p25 protein and the cellular genes involved in the root proliferation and the parasitic infection. Thereby, such studies will be performed within and out viral context. The characterization of the p25-deregulated cellular functions should allow the identification of cellular markers that in term could help breeders for the selection of resistant crops. Before the extensive use of such new resistant varieties, prophylactic treatments are used to limit the infection. Indeed, the presence of *P. betae* in soils, crop transportation and scattering of soil by the mean of farming activities are the main factors that ensure the persistence and the spread of the virus. Even with some adapted crop rotations, the presence of highly resistant viruliferous vector spores prevents any reduction of the infection. Soil fumigation with methyl bromide reduces inoculum intensity but the Montreal protocol prevents its use as it depletes the ozone layer. Crop selection and the use of new tolerant varieties having many resistant genes (i.e. for the virus and the vector) and also the use of efficient pathogen-derived resistance may represent the most powerful alternative to grow sugar beet and maintain sugar yields.

## ACKNOWLEDGEMENTS

C.P. and K.H. contributed equally to this review. C.P was supported by SESVanderHave under a CIFRE program, K.H. was supported by a Franco-Syrian grant. The authors thank reviewers and Prof. Dr. Mark Varrelmann for their critical reading and comments.

## REFERENCES

- Abe H, Tamada T** (1986) Association of *Beet necrotic yellow vein virus* with isolates of *Polomyxa betae* Keskin strains in rhizomania infested soils of sugar beet in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **52**, 235-247
- Abe H, Tamada T** (1987) A test tube culture system for multiplication of *Polomyxa betae* and *Beet necrotic yellow vein virus* in rootlets of sugar beet. In: *Proceedings of the Sugar Beet Research Association*, Date and location of meeting, Japan, **29**, 34-38
- Acosta-Leal R, Fawley MW, Rush CM** (2008) Changes in the intraisolate genetic structure of *Beet necrotic yellow vein virus* populations associated with plant resistance breakdown. *Virology* **376**, 60-68
- Acosta-Leal R, Rush CM** (2007) Mutations associated with resistance-breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* and their allelic discrimination using taqman technology. *Phytopathology* **97**, 325-330
- Adams MJ** (1990) Epidemiology of fungally-transmitted viruses. *Soil Use and Management* **6**, 184-189
- Adams MJ, Antoniw JF, Mullins JG** (2001) Plant virus transmission by plasmodiophorid fungi is associated with distinctive transmembrane regions of virus-encoded proteins. *Archives of Virology* **146**, 1139-1153
- Amiri R, Moghaddam M, Mesbah M, Sadeghian SY, Ghannadha MR, Izadpanah K** (2003) The inheritance of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in *B. vulgaris* subsp. *maritima*, accession WB42: statistical comparisons with Holly-1-4. *Euphytica* **132**, 363-373
- Archibald JM, Keeling PJ** (2004) Actin and ubiquitin protein sequences support a cercozoan/foraminiferan ancestry for the plasmodiophorid plant pathogens. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **51**, 113-118

**Balmori E, Gilmer D, Richards K, Guilley H, Jonard G** (1993) Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on *Beet necrotic yellow vein virus* RNA3. *Biochemie* **75**, 517-521

**Barr DJS** (1988) Zoosporic plant parasites as fungal vectors of viruses: Taxonomy and life cycles of species involved. In: Cooper JI, Asher MJ (Eds) *Developments in Applied Biology II Viruses with Fungal Vectors*, Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK, pp 123-137

**Baulcombe D** (2004) RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363

**Baulcombe D** (2005) RNA silencing. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 290-293

**Biancardi E, Lewellen RT, Biaggi MD, Erichsen AW, Stevanato P** (2002) The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica* **127**, 383-397

**Bleykasten C, Gilmer D, Guilley H, Richards KE, Jonard G** (1996). *Beet necrotic yellow vein virus* 42 kDa triple gene block protein binds nucleic acid in vitro. *Journal of General Virology* **77**, 889-897

**Bouzoubaa S, Niesbach-Klosgen U, Jupin I, Guilley H, Richards K, Jonard G** (1991) Shortened forms of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA3 and 4: Internal deletions and a subgenomic RNA. *Journal of General Virology* **72**, 259-266

**Bouzoubaa S, Quillet L, Guilley H, Jonard G, Richards K** (1987) Nucleotide sequence of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA1. *Journal of General Virology* **68**, 615-626

**Braselton JP** (1988) Karyology and systematics of plasmodiophoromycetes. In: Cooper JI, Asher MJ (Eds) *Developments in Applied Biology II Viruses with Fungal Vectors*, Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK, pp 139-152

**Braselton JP** (1995) Current status of the plasmodiophorids. *Critical Review in Microbiology* **21**, 263-275

**Bürcky K** (1987) BNYVV-Resistenz induzierende Merkmale und deren mögliche Nutzung zur Selektion Rizomaniatoleranter Zuckerrüben. In: International Institute for Beet Research (IIBR) (Ed) *Proceedings of the 50<sup>th</sup> Congress of the IIRB*, 11-12 February 1987, IIRB, Brussels, pp 3-7

**Campbell RN** (1996) Fungal transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 87-108

**Canova A** (1959) On the pathology of sugarbeet. *Informatore Fitopatologico* **9**, 390-396

**Chen JP, Swaby AG, Adams MJ, Ruan YL** (1991) Barley mild mosaic-virus inside its fungal vector, *Polymyxa graminis*. *Annals of Applied Biology* **118**, 615-621

**Chen JP, Wang ZQ, Hong J, Collier CR, Adams MJ** (1998) Ultrastructural studies of resting spore development in *Polymyxa graminis*. *Mycological Research* **102**, 687-691

**Chiba S, Miyanishi M, Andika IB, Kondo H, Tamada T** (2008) Identification of amino acids of the *Beet necrotic yellow vein virus* P25 protein required for induction of the resistance response in leaves of *Beta vulgaris* plants. *Journal of General Virology* **89**, 1314-1323.

**Dawei L, Jialin Y, Chenggui H, Tao L, Shucui Q, Koenig R, Yi L** (1999) Detection and nucleotide analysis of RNA5 of *Beet necrotic yellow vein virus* isolated in China. *Chinese Journal of Biotechnology* **15**, 253-257

**De Biaggi M** (1987) Méthodes de sélection, un cas concret. In: International Institute for Beet Research (IIBR) (Ed) *Proceedings of the 50th Congress of the IIRB*, 11-12 Februray 1987, IIRB, Brussels, pp 157-163

**Domingo E** (2000) Viruses at the edge of adaptation. *Virology* **270**, 251-253

**Doucet, D.** (2006). Characterization of the pecluvirus movement in plant roots (development of a model and comparison with a benyvirus). PhD thesis, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium, 226 pp.

**Drake JW, Holland J** (1999) Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**, 13910-13013

**Driskel BA, Doss P, Littlefield LJ, Walker NR, Verchot-Lubicz J** (2004) Soilborne wheat mosaic virus movement protein and RNA and wheat spindle streak mosaic virus coat protein accumulate inside resting spores of their vector, *Polymyxa graminis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 739-748

**Dunoyer P, Pfeffer S, Fritsch C, Hemmer O, Voinnet O, Richards KE** (2002) Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by Peanut clump virus. *The Plant Journal* **29**, 555-567

**Erhardt M, Dunoyer P, Guille H, Richards K, Jonard G, Bouzoubaa S** (2001) Beet necrotic yellow vein virus particles localize to mitochondria during infection. *Virology* **286**, 256-262

**Erhardt M, Morant M, Ritzenthaler C, Stussi-Garaud C, Guille H, Richards K, Jonard G, Bouzoubaa S, Gilmer D** (2000) P42 movement protein of Beet necrotic yellow vein virus is targeted by the movement proteins P13 and P15 to punctate bodies associated with plasmodesmata. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 520-528

**Erhardt M, Vetter G, Gilmer D, Bouzoubaa S, Richards K, Jonard G, Guilley H** (2005) Subcellular localization of the triple gene block movement proteins of *Beet necrotic yellow vein virus* by electron microscopy. *Virology* **340**, 155-166

**Fares MA, Moya A, Escarmis C, Baranowski E, Domingo E, Barrio E** (2001) Evidence for positive selection in the capsid protein-coding region of the Foot-and-mouth disease virus (FMDV) subjected to experimental passage regimens. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 10-21

**Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA** (2005). In Virus Taxonomy: VIIIth report of the ICTV. (London: Elsevier/Academic Press)

**Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS** (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 331-341

**Gidner S, Lennefors BL, Nilsson NO, Bensefelt J, Johansson E, Gyllenspetz U, Kraft T** (2005) QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome* **48**, 279-285

**Gilmer D, Allmang C, Ehresmann C, Guilley H, Richards K, Jonard G, Ehresmann B** (1993) The secondary structure of the 5'-noncoding region of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA3: Evidence for a role in viral RNA replication. *Nucleic Acids Research* **21**, 1389-1395

**Gilmer D, Bouzoubaa S, Hehn A, Guilley H, Richards K, Jonard G** (1992a) Efficient cell-to-cell movement of *Beet necrotic yellow vein virus* requires 3' proximal genes located on RNA2. *Virology* **189**, 40-47

**Gilmer D, Richards K, Jonard G, Guilley H** (1992b) Cis-active sequences near the 5'-termini of *Beet necrotic yellow vein virus* RNAs 3 and 4. *Virology* **190**, 55-67

**Goffart JP, Maraite H** (1991) Soil and agronomic factors affecting the inoculum potential of *Polomyxa betae* keskin in Belgium. *Parasitica* **47**, 165-192

**Grimmer M, Trybush S, Hanley S, Francis S, Karp A, Asher M** (2007) An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus*. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 1151-1160

**Haeberle AM, Stussi-Garaud C** (1995) *In situ* localization of the non-structural protein P25 encoded by *Beet necrotic yellow vein virus* RNA3. *Journal of General Virology* **76**, 643-650

**Haeberle AM, Stussi-Garaud C, Schmitt C, Garaud JC, Richards KE, Guilley H, Jonard G** (1994) Detection by immunogold labelling of P75 readthrough protein near an extremity of *Beet necrotic yellow vein virus* particles. *Archives of Virology* **134**, 195-203

**Harju VA, Mumford RA, Bockley A, Boonham N, Clover GRG, Weekes R, Henry CM** (2002) Occurrence in the united kingdom of *Beet necrotic yellow vein virus* isolates which contain RNA5. *Plant Pathology* **51**, 811

**Hehn A, Bouzoubaa S, Bate N, Twell D, Marbach J, Richards K, Guilley H, Jonard G** (1995) The small cysteine-rich protein P14 of *Beet necrotic yellow vein virus* regulates accumulation of RNA2 in *cis* and coat protein in *trans*. *Virology* **210**, 73-81

**Hehn A, Fritsch C, Richards KE, Guilley H, Jonard G** (1997) Evidence for *in vitro* and *in vivo* autocatalytic processing of the primary translation product of beet necrotic yellow vein virus RNA1 by a papain-like proteinase. *Archives of Virology* **142**, 1051-1058

**Heijbroek W, Musters PMS, Schoone AHL** (1999) Variation in pathogenicity and multiplication of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in relation to the resistance of sugarbeet cultivars. *European Journal of Plant Pathology* **105**, 397-405

**Jupin I, Guilley H, Richards KE, Jonard G** (1992) Two proteins encoded by *Beet necrotic yellow vein virus* RNA3 influence symptom phenotype on leaves. *The EMBO Journal* **11**, 479-488

**Jupin I, Richards K, Jonard G, Guilley H, Pleij CW** (1990) Mapping sequences required for productive replication of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA3. *Virology* **178**, 273-280

**Keskin B** (1964) *Polomyxa betae* n.Sp., a parasite in the roots of *Beta vulgaris* tournefort, particularly during the early growth of the sugar beet. *Archiv für Mikrobiologie* **19**, 348-374

**Keskin B, Fuchs WH** (1969) The process of infection by *Polomyxa betae*. *Archiv für Mikrobiologie* **68**, 218-226

**Kiguchi T, Saito M, Tamada T** (1996) Nucleotide sequence analysis of RNA5 of five isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* and the identity of a deletion mutant. *Journal of General Virology* **77**, 575-580

**Kingsnorth CS, Asher MJC, Keane GJP, Chwarszczynska DM, Luterbacher MC, Mutasa-Gottgens ES** (2003) Development of a recombinant antibody ELISA test for the detection of *Polomyxa betae* and its use in resistance screening. *Plant Pathology* **52**, 673-680

**Klein E, Link D, Schirmer A, Erhardt M, Gilmer D** (2007) Sequence variation within *Beet necrotic yellow vein virus* P25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on *Tetragonia expansa*. *Virus Research* **126**, 53-61

**Koenig R, Haeberle AM, Commandeur U** (1997) Detection and characterization of a distinct type of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA5 in a sugarbeet growing area in Europe. *Archives of Virology* **142**, 1499-1504

**Koenig R, Jarausch W, Li Y, Commandeur U, Burgermeister W, Gehrke M, Luddecke P** (1991) Effect of recombinant *Beet necrotic yellow vein virus* with different RNA compositions on mechanically inoculated sugarbeets. *Journal of General Virology* **72**, 2243-2246

**Koenig R, Lennefors BL** (2000) Molecular analyses of european A, B and P type sources of *Beet necrotic yellow vein virus* and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Archives of Virology* **145**, 1561-1570

**Koenig R, Luddecke P, Haeberle AM** (1995) Detection of *Beet necrotic yellow vein virus* strains, variants and mixed infections by examining singlestrand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *Journal of General Virology* **76**, 2051-2055

**Kruse M, Koenig R, Hoffmann A, Kaufmann A, Commandeur U, Solovyev AG, Savenkov I, Burgermeister W** (1994) Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Journal of General Virology* **75**, 1835-1842

**Lauber E, Guilley H, Richards K, Jonard G, Gilmer D** (1997) Conformation of the 3'-end of *beet necrotic yellow vein Benyvirus* RNA3 analysed by chemical and enzymatic probing and mutagenesis. *Nucleic Acids Research* **25**, 4723-4729

**Lauber E, Guilley H, Tamada T, Richards KE, Jonard G** (1998) Vascular movement of *Beet necrotic yellow vein virus* in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA3 sequence domain rather than a gene product. *Journal of General Virology* **79**, 385-393

**Lauber E, Janssens L, Weyens G, Jonard G, Richards KE, Lefebvre M, Guilley H** (2001) Rapid screening for dominant negative mutations in the *Beet necrotic yellow vein virus* triple gene block proteins P13 and P15 using a viral replicon. *Transgenic Research* **10**, 293-302

**Lauber E, Jonard G, Guilley H, Gilmer D** (1999) Effects of structural modifications upon the accumulation *in planta* of replicons derived from *Beet necrotic yellow vein virus* RNA3. *Archives of Virology* **144**, 1201-1208

**Ledingham GA** (1939) Studies of *Polymyxa graminis*, n. Gen. N. Sp., a plasmodiophoraceous root parasite of wheat. *Canadian Journal of Research* **17**, 38-51

**Lee L, Telford EB, Batten JS, Scholthof KB, Rush CM** (2001) Complete nucleotide sequence and genome organization of *Beet soilborne mosaic virus*, a proposed member of the genus *Benyvirus*. *Archives of Virology* **146**, 2443-2453

**Legrèvre A, Delfosse P, Maraite H** (2002) Phylogenetic analysis of *Polymyxa* species based on nuclear 5.8s and internal transcribed spacers ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* **106**, 138-147

**Legrèvre A, Delfosse P, Vanpee B, Goffin A, Maraite H** (1998) Differences in temperature requirements between *Polymyxa* sp. of Indian origin and *Polymyxa graminis* and *Polymyxa betae* from temperate areas. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 195-205

**Legrèvre A, Schmit JF, Bragard C, Maraite H** (2005) The role of climate and alternative hosts in the epidemiology of rhizomania. In: Rush CM (Ed) *International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, 5-7 September 2005, American Society of Sugar Beet Technologists, Bologna, Italy, pp 125-128

**Legrèvre A, Vanpee B, Delfosse P, Maraite H** (2000) Host range of tropical and sub-tropical isolates of *Polymyxa graminis*. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 379-389

**Lennefors BL, Lindsten K, Koenig R** (2000) First record of A and B type *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beets in Sweden. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 199-201

**Lennefors BL, Savenkov EI, Bensefelt J, Wremerth-Weich E, Roggen P, Tuveson S, Valkonen JP, Gielen J** (2006) DsRNA-mediated resistance to beet necrotic yellow vein virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*). *Molecular Breeding* **18**, 313-325

**Lennefors BL, van Roggen PM, Yndgaard F, Savenkov EI, Valkonen JP** (2008) Efficient dsRNA-mediated transgenic resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beets is not affected by other soilborne and aphidtransmitted viruses. *Transgenic Research* **17**, 219-228

**Lewellen RT, Skoyen IO, Erichsen AW** (1987) Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: Evaluation of host-plant reactions and selection for and inheritance. In: International Institute for Beet Research (IIRB) (Ed) *Proceedings of the 50th Congress of the IIRB*, 11-12 February 1987, IIRB, Brussels, pp 139-156

**Link D, Schmidlin L, Schirmer A, Klein E, Erhardt M, Geldreich A, Lemaire, Gilmer D** (2005) Functional characterization of the *Beet necrotic yellow vein virus* RNA5 encoded P26 protein: Evidence for structural pathogenicity determinants. *Journal of General Virology* **86**, 2115-2125

**Liu H-Y, Lewellen RT** (2007) Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* in the United States. *Plant Disease* **91**, 847-851

**Liu HY, Sears JL, Lewellen RT** (2005) Occurrence of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* of sugar beet. *Plant Disease* **89**, 464-468

**Maraite H** (1991) Transmission of viruses by soil fungi. In: Beemster ABR, Bollen GH, Gerlagh M, Ryuissen MA, Schipper B, Tempels A (Eds) *Developments in Agricultural and Managed-Forest Ecology: Biotic Interactions and Soil-Borne Diseases*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, NL, pp 67-82

**Meunier A, Schmit JF, Stas A, Kutluk N, Bragard C** (2003) Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet soilborne virus*, and *Beet virus Q* and their vector *Polymyxa betae* Keskin on sugar beet. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 2356-2360

**Miyanishi M, Kusume T, Saito M, Tamada T** (1999) Evidence for three groups of sequence variants of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA5. *Archives of Virology* **144**, 879-892

**Morozov SY, Solovyev AG** (2003) Triple gene block: Modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology* **84**, 1351-1366

**Morales FJ, Ward E, Castaño M, Arroyave JA, Lozano I, Adams MJ** (1999). Emergence and partial characterization of *Rice stripe necrosis virus* and its fungus vector in South America. *European Journal of Plant Pathology* **105**, 643-650

**Mutasa ES, Chwarszczynska DM, Asher MJ** (1996) Single-tube, nested PCR for the diagnosis of *Polymyxa betae* infection in sugar beet roots and colorimetric analysis of amplified products. *Phytopathology* **86**, 493-497

**Niesbach-Klosgen U, Guille H, Jonard G, Richards K** (1990) Immunodetection *in vivo* of *Beet necrotic yellow vein virus* encoded proteins. *Virology* **178**, 52-61

**Pollini CP, Giunchedi L** (1989) Comparative histopathology of sugar beets that are susceptible and partially resistant to rhizomania. *Phytopathologia Mediterranea* **28**, 16-21

**Pollini CP, Masia A, Giunchedi L** (1990) Free indole-3-acetic acid in sugarbeet root of rhizomania-susceptible and moderately resistant cultivars. *Phytopathologia Mediterranea* **29**, 191-195

**Putz C** (1977) Composition and structure of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Journal of General Virology* **35**, 397-401

**Quillet L, Guille H, Jonard G, Richards K** (1989) *In vitro* synthesis of biologically active *Beet necrotic yellow vein virus* RNA. *Virology* **172**, 293-301

**Rahim MD, Andika IB, Han C, Kondo H, Tamada T** (2007) RNA4 encoded P31 of *Beet necrotic yellow vein virus* is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *Journal of General Virology* **88**, 1611-1619

**Richard-Molard M** (1985) Rhizomania: A world-wide danger to sugar beet. *Span* **28**, 92-94

**Richard-Molard M, Carriolle M** (2001) Biotic and abiotic stress and genetic improvement in France. In: International Institute for Beet Research (IIBR) (Ed) *Proceedings of the 64th Congress of the IIRB*, 26-27 June 2001, IIRB, Brussels, pp 153-158

**Rochon D-A, Kakani K, Robbins M, Reade R** (2004) Molecular aspects of plant virus transmission by olpidium and plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 211-241

**Rush CM** (2003) Ecology and epidemiology of *Benyviruses* and plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 567-592

**Rysanek P, Stocky G, Haeberle AM, Putz C** (1992) Immunogold labelling of *Beet necrotic yellow vein virus* particles inside its fungal vector, *Polymyxa betae* K. *Agronomie* **12**, 651-659

**Schirmer A, Link D, Cognat V, Moury B, Beuve M, Meunier A, Bragard C, Gilmer D, Lemaire O** (2005) Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *Journal of General Virology* **86**, 2897-2911

**Schmidlin L, De Bruyne E, Weyens G, Lefebvre M, Gilmer D** (2008). Identification of differentially expressed root genes upon rhizomania disease. *Molecular Plant Pathology* **9**, 741-751.

**Schmidlin L, Link D, Mutterer J, Guillet H, Gilmer D** (2005) Use of a *Beet necrotic yellow vein virus* RNA5 derived replicon as a new tool for gene expression. *Journal of General Virology* **86**, 463-467

**Schmitt C, Balmori E, Jonard G, Richards KE, Guillet H** (1992) *In vitro* mutagenesis of biologically active transcripts of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA2: Evidence that a domain of the 75-kDa readthrough protein is important for efficient virus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**, 5715-5719

**Scholten OE, Bock TSMD, Klein-Lankhorst RM, Lange W** (1999) Inheritance of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* in *Beta vulgaris* conferred by a second gene for resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 740-746

**Scholten OE, Lange W** (2000) Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review. *Euphytica* **112**, 219-231

**Scholten OE, Paul H, Peters D, Van Lent JW, Goldbach RW** (1994) *In situ* localisation of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in rootlets of susceptible and resistant beet plants. *Archives of Virology* **136**, 349-361

**Sohi H, Maleki M** (2004) Evidence for presence of types A and B of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in Iran. *Virus Genes* **29**, 353-358

**Steven A, Trus B, Putz C, Wurtz M** (1981) The molecular organization of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Virology* **113**, 428-438

**Suarez MB, Grondona I, Garcia-Benavides P, Monte E, Garcia-Acha I** (1999) Characterization of *Beet necrotic yellow vein Furovirus* from Spanish sugar beets. *International Microbiology* **2**, 87-92

**Tamada T** (1999) *Benyviruses*. In: Webster R, Granoff A (Eds) *Encyclopedia of Virology* (2nd Edn), Academic Press, New York, N.Y., pp 154-160

**Tamada T, Abe H** (1989) Evidence that *Beet necrotic yellow vein virus* RNA4 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *Journal of General Virology* **70**, 3391-3398

**Tamada T, Baba T** (1973) *Beet necrotic yellow vein virus* from rhizomania-affected sugar beet in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 325-332

**Tamada T, Schmitt C, Saito M, Guille H, Richards K, Jonard G** (1996) High resolution analysis of the readthrough domain of *Beet necrotic yellow vein virus* readthrough protein: A KTER motif is important for efficient transmission of the virus by *Polymyxa betae*. *Journal of General Virology* **77**, 1359-1367

**Tamada T, Shirako Y, Abe H, Saito M, Kigushi T, Harada T** (1989) Production and pathogenicity of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* with different numbers of RNA components. *Journal of General Virology* **70**, 3399-3409

**Tamada T, Uchino H, Kusume T, Saito M** (1999) RNA3 deletion mutants of *Beet necrotic yellow vein virus* do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology* **89**, 1000-1006

**Tuitert G** (1990) Assessment of the inoculum potential of *Polymyxa betae* and *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in soil using the most probable number method. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **96**, 331-341

**Valentin C, Dunoyer P, Vetter G, Schalk C, Dietrich A, Bouzoubaa S** (2005) Molecular basis for mitochondrial localization of viral particles during *Beet necrotic yellow vein virus* infection. *Journal of Virology* **79**, 9991-10002

**Van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB** (Eds.) (2000) Virus taxonomy: Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses (NewYork: Academic Press)

**Verchot-Lubicz J, Rush C, Payton M, Colberg T** (2007) *Beet necrotic yellow vein virus* accumulates inside resting spores and zoosporangia of its vector *Polymyxa betae* BNYVV infects *P. betae*. *Virology Journal* **4**, 37

**Vetter G, Hily JM, Klein E, Schmidlin L, Haas M, Merkle T, Gilmer D** (2004) Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA3-encoded P25 protein. *Journal of General Virology* **85**, 2459-2469

**Ward E, Kanyuka K, Motteram J, Korniyukhin D, Adams MJ** (2005) The use of conventional and quantitative real-time PCR assays for *Polymyxa graminis* to examine host plant resistance, inoculum levels and intraspecific variation. *New Phytologist* **165**, 875-885

**Ward L, Koenig R, Budge G, Garrido C, McGrath C, Stubble H, Boonham N** (2007) Occurrence of two different types of RNA5 containing *Beet necrotic yellow vein virus* in the UK. *Archives of Virology* **152**, 59-73

**Webb CR, Gilligan CA, Asher MJC** (2000) Modelling the effect of temperature on the development of *Polymyxa betae*. *Plant Pathology* **49**, 600-607

**Weiland JJ, Van Winckle D, Edwards MC, Larson RL, Shelves WL, Freeman TP, Liu H-Y** (2007) Characterization of a US isolate of *Beet black scorch virus*. *Phytopathology* **97**, 1245-1254

**Whitney ED** (1989) Identification, distribution, and testing for resistance to rhizomania in *Beta maritima*. *Plant Disease* **73**, 287-290

**Wisler GC, Lewellen RT, Sears JL, Wasson JW, Liu HY, Wintermantel WM** (2003) Interactions between *Beet necrotic yellow vein virus* and *Beet soilborne mosaic virus* in sugar beet. *Plant Disease* **87**, 1170-1175

**Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua NH** (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes and Development* **14**, 3024-3036

**Kapitel 3: Identification of beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor interacting sugar beet proteins which represent putative virus targets or components of plant resistance**

Manuscript in press - *Molecular Plant Microbe Interactions*

**Heike Thiel and Mark Varrelmann**

**Address**

Department of Crop Sciences, Section Plant Virology, University of Göttingen, Grisebachstrasse 6, D-37077 Göttingen, Germany

**Corresponding author**

Mark Varrelmann, e-mail: varrelmann@ifz-goettingen.de

**ABSTRACT**

Beet necrotic yellow vein virus induces the most important disease threatening sugar beet. The growth of partially resistant hybrids carrying monogenic dominant resistance genes stabilize yield but are unable to entirely prevent virus infection and replication. P25 is responsible for symptom development and previous studies have shown that recently occurring resistance breaking isolates possess increased P25 variability. To understand the viral pathogenicity factor's interplay with plant proteins better and to possibly unravel the molecular basis of sugar beet antivirus resistance, P25 was applied in a yeast two-hybrid screen of a resistant sugar beet cDNA library. This screen identified candidate proteins recognized as orthologues from other plant species which are known to be expressed following pathogen infection and involved in plant defense response. Most of the candidates potentially related to host-pathogen interactions were involved in the ubiquitylation process, plants response to stress as well as part of cell and metabolism

components. The interaction of several candidate genes with P25 was confirmed in *Nicotiana benthamiana* leaf cells by transient agrobacterium-mediated expression applying bimolecular fluorescence complementation assay. The putative functions of several of the candidates identified support previous findings and present first targets for understanding the BNYVV pathogenicity and antivirus resistance mechanism.

Additional keywords: rhizomania, benyvirus, Beta vulgaris

## INTRODUCTION

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) (Tamada and Baba, 1973) is the type species of the genus *Benyvirus* accepted by International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) in 1997 (Tamada, 1999). BNYVV, transmitted by the soil-borne plasmodiophoromycete *Polymyxa betae* (Adams et al., 2001; Dessens and Meyer 1996; Keskin 1964; Rush 2003), is the causal agent of rhizomania. Rhizomania is the sugar beet disease with the greatest economic significance because it possesses the ability to severely reduce plant (up to 90%) and sugar yield (up to 70%) in susceptible cultivars (Johansson, 1985; Richard-Molard, 1985; Tamada, 1999). For details about the worldwide distribution of rhizomania infested areas, see Gidner et al. 2005; Richard-Molard and Cariolle 2001.

BNYVV damages sugar beet by the symptoms it induces. BNYVV causes susceptible sugar beets to develop an extensive proliferation of additionally formed but necrotic root hairs which form a root beard. The tap root often reveals a stunted wine glass shape with brownish vasculature. When leaves are invaded, which rarely occurs, leaf veins become yellow and eventually necrotic (Koenig 2008). Little is known about the molecular mechanisms and the virus induced physiological alterations which form these symptoms. Pollini and Giunchedi (1989) have described the virus induced histological changes of BNYVV infested sugar beet root hairs and (Pollini et al. 1990) reported an increase of free auxin exclusively in susceptible infested sugar beet root hairs. Molecular data, supplying an insight into the differential expression of sugar beet root genes following

BNYVV infection, were recently generated by Schmidlin and co-workers (2008). Their extensive differential transcriptomic analysis revealed virus and host plant specific expression of candidate genes linked to cell cycle, ubiquitin/proteasome system (UPS), general metabolism, defense signaling and oxidative stress response. Larson et al. (2008) analyzed proteome changes evaluated with multidimensional liquid chromatography from different sugar beet accessions induced by BNYVV. Results suggested involvement of systemic resistance elements and the role of phytohormones needed for symptom development. The BNYVV genome organization and detailed known functions of virus encoded proteins are summarized in (Koenig 2008). In general the BNYVV multi-component genome consists of four, in some isolates five, positive single-stranded RNAs. RNA1 and RNA2 contain all the house-keeping genes, necessary for replication, encapsidation, suppression of RNA silencing and virus movement. RNA4 is involved in vector-mediated transmission and root specific suppression of RNA silencing (Rahim et al. 2007). RNA3 encoded P25 protein is responsible for rhizomania symptom development in sugar beet and the formation of severe symptoms in leaves of mechanically inoculated sugar beets and *Chenopodium quinoa* (Chiba et al. 2008; Klein et al. 2007; Koenig et al. 1991; Tamada et al. 1989; Tamada 1999; Tamada 2007). RNA5 (present mainly in Asia and in limited geographic regions in France and UK) encodes another pathogenicity factor P26 involved in symptom expression (Koenig et al. 1997; Link et al. 2005; Miyanishi et al. 1999; Schirmer et al. 2005; Schmidlin et al. 2005; Ward et al. 2007), which may act synergistically with RNA3 encoded P25 (Tamada et al. 1996a).

Due to the severe damage induced by the virus and lack of viable alternative control measures between virus and sugar beet production is entirely dependant on resistant cultivars to control the disease. Lewellen et al. (1987) reported the identification of partial resistant germplasm in field trials of the Holly Sugar Company. Currently the "Holly" source still contains the most important major dominant resistance gene named *Rz1* (reviewed by Biancardi et al. 2002; Scholten and Lange 2000). Additionally, wild beet (*B. vulgaris* ssp. *maritima*) accessions served as sources for further major resistance genes (*Rz2 - Rz4*) (Gidner et al. 2005; Grimmer et al. 2007; Scholten et al. 1994; Scholten et al. 1999; Whitney 1989). The resistance mechanism remains largely unknown, *Rz1*,

*Rz2* and *Rz3* plus a combination of the genetic background and additional minor genes, possess the ability to reduce the virus replication and content in hairy roots and restrict virus spread to the tap root (Heijbroek et al. 1999; Luterbacher et al. 2005; Scholten et al. 1994; Tamada et al. 1996b). However, alone or in combination, all known major resistance genes provide only quantitative resistance and do not seem to entirely prevent BNYVV replication and cell-to-cell movement from the initial vector infected cells in sugar beet root cells.

Several recent publications provided indirect evidence that P25 might be the target of recognition of the sugar beet antivirus resistance. Even though the different pathotypes A, B and P of BNYVV possess highly conserved RNA1 and RNA2 components, several studies reported a high variability in the P25 pathogenicity factor amino acid tetrad 67-70, especially in A-type isolates (Chiba et al. 2003; Koenig and Lesemann 2005; Schirmer et al. 2005; Tamada et al. 2003; Ward et al. 2007; Yilmaz et al. 2007). Moreover this tetrad composition determines lesion type reflecting resistance response in mechanically inoculated *B. vulgaris* "Rizor" and *B. maritima* leaves, suggesting that P25 functions as an avirulence (*Avr*) gene product (Chiba et al. 2008; Tamada 2007). In addition, Klein et al. 2007 supplied other evidence for the role of P25 aa 67-70 tetrad in BNYVV symptom severity in leaves of the host *Tetragonia expansa*. BNYVV P25 represents a nuclear shuttling protein, containing nuclear localization (NLS) and nuclear export (NES) signals (Vetter et al. 2004). Klein et al. (2007) additionally found evidence for P25 oligomerization and an influence of the tetrad composition on this ability.

Recently, BNYVV isolates capable of overcoming *Rz1* resistance in the field have been reported from several independent field locations in the USA and Europe (Liu et al. 2005; Liu and Lewellen 2007; Pferdmenges et al. 2008), indicating that the durability of rhizomania resistance in sugar beet seems to be threatened through the large scale cultivation of a single resistance source (*Rz1*) (Acosta-Leal et al. 2008).

The objectives of this study were to detect BNYVV cellular targets and to identify resistance factors involved in the recognition of P25 in an incompatible *Rz2*-based interaction. Both interrelations are probably based on physical protein-protein interactions and their identification and functional analysis of the partners might result in a first understanding of the molecular and cellular mechanisms of this

plant-virus interplay. To achieve this yeast two-hybrid (YTH) has proven itself invaluable as a sensitive molecular genetic approach in the mapping of protein-protein interactions *in vivo*. We have screened for P25 interacting sugar beet proteins by applying a cDNA library from a homozygous *Rz2* carrying sugar beet line. Many candidate proteins were identified, displaying no detectable transcriptional autoactivation and physical interaction of variable intensity in yeast cells. Subsequent *in planta* analysis in *N. benthamiana* leaf cells resulted in proof of expression and interaction, applying a BiFC system based on *Agrobacterium tumefaciens* transient expression.

## RESULTS

### **Identification of sugar beet *Rz2* candidate proteins interacting with BNYVV B-type P25 in yeast cells following a LexA YTH cDNA library screen.**

P25 sugar beet proteome interaction of an incompatible host-pathogen interaction (BNYVV B-type versus *Rz2* sugar beet genotype) was studied in a LexA based YTH system. A cDNA library from a BNYVV B-type infected *Rz2* harboring sugar beet breeding line, consisting of  $1.4 \times 10^6$  independent clones, was chosen. 420 green fluorescing colonies were picked out of approximately  $1 \times 10^6$  transformed yeast colonies and used for further characterization. De-selection of transcriptional autoactivators, re-transformation and repetition of the interaction assay resulted in a total number of 36 P25 interacting candidates (Fig. 1) with an insert size varying from approximately 300 bp to 1200 bp (Table 1) remained. The strength of the P25-cDNA encoded candidate interactions was monitored indirectly by quantification of the Leu-driven GFP expression. As shown in Figure 1B, GFP expression was detectable in all different cDNA library candidate P25 interaction tests; significant differences in strength of the interaction were observed.

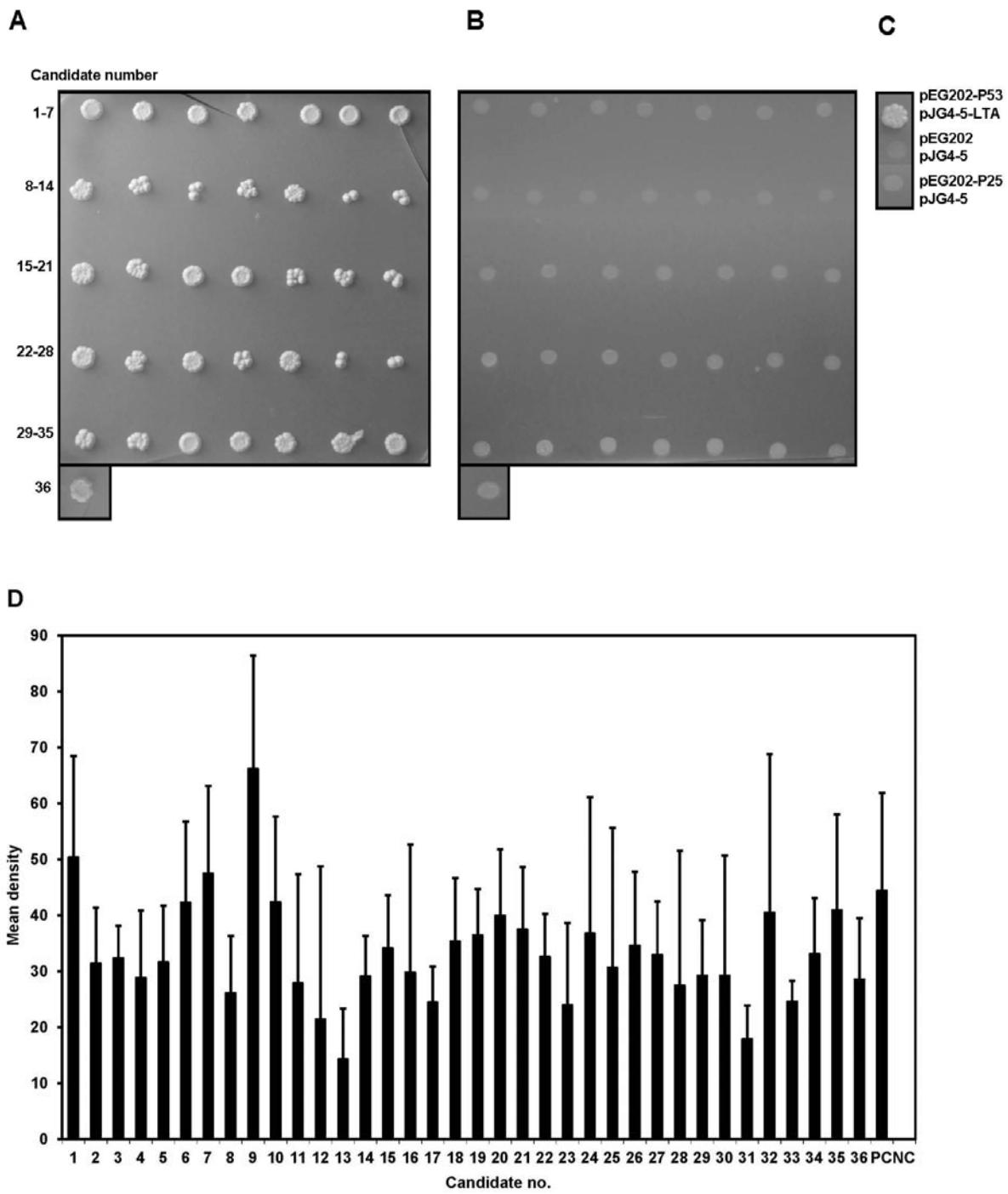


Fig. 1.

**A**, Yeast two-hybrid interaction assay of BNYVV P25 with 36 different *Rz2* sugar beet candidate proteins. P25 was fused to LexA-BD (pEG202-P25) and *Rz2* sugar beet cDNA library clones to B42-AD (pJG4-5-library- no. 1-36). The bait and prey combinations, co-transformed into yeast, were selected on medium containing galactose and lacking -Leu, -Trp, -Ura and -His.

**B**, Test for transcriptional autoactivation of the -Leu reporter gene: pEG202 co-transformed with pJG4-5-library-no. 1 to 36. **C**, YTH interaction positive control (PC) LTA (pJG4-5-LTA) with P53 (pEG202-P53), negative control (NC) and autoactivation control (both pJG4-5 + pEG202). **D**, Relative quantification of Leu-driven GFP fluorescence in yeast cell matings expressing the same P25 and cDNA (no. 1-36) as in (A) measured by display total area density of the mean yeast cell fluorescence signal (total of 20 cells) measured in epifluorescence microscopy

Nucleotide sequences of the cDNAs were obtained, and coding sequences were used for NCBI Genbank database homology BLAST search using BLASTn algorithm. The cDNA sequences were translated and the amino acid sequences additionally applied for a database search making use of the “Simple Modular Architecture Research Tool” (SMART 5) for identification and analysis of domain architectures. The results of these database analyses including functional categorization and prediction of putative role in the virus-host interaction i.e. involvement in virus life cycle or antivirus resistance are summarized in Table 1.

**Table 1.** NCBI Genbank sequences (accession no., function and conserved domains) displaying significant sequence homology to sugar beet Rz2 candidate cDNA clones identified to show LexA-YTH interaction with BNYVV encoded P25 pathogenicity factor and prediction of putative candidate function and possible involvement in virus-host interaction.

No. <sup>a</sup>	cDNA length (bp)	Accession no. of the best matched sequences	NCBI Blastn	Predicted, putative or known function(s) (Organism)	e-value <sup>b</sup>	Conserved signalling or functional domain(s)	e-value <sup>c,d</sup>	Putative function	Functional category		Involvement in life cycle
									SMART	Virus Resistance	
1	1149	NM_126342.3	Kelch repeat-containing F-box family protein ( <i>A. thaliana</i> )	1e-85	Kelch domains	6.71e-01 , 1.77e-09	Substrate recognition for ubiquitylation	a	x	x	
2	533	NM_100310.5	Thioesterase family protein ( <i>A. thaliana</i> )	2e-52	Protein phosphatase 2A homologues, catalytic domain.	3.66e-02	Exhibit Esterase activity specifically at a thiol group	d	x	x	
3	535	AY589695.1	Putative universal stress protein family protein/ethylene responsive ( <i>Mirabilis jalapa</i> )	1e-49			Stress induced protein	b	x		
4	535	NM_115492.3	40S ribosomal protein S26 ( <i>A. thaliana</i> )	1e-41			Ribosomal protein	d	x		
5	260	NM_180927.3	Protein (serine/threonine) phosphatase 7 (PP7) ( <i>A. thaliana</i> )	1e-101			Regulator of cryptochrome mediated blue light signalling	d	x	x	
6	404	AY906938.1	Actin ( <i>Carica papaya</i> )	2e-69	Actin domain	5.27e-03	Structure protein	e	x		
7	311	NM_103837.1	Leucine rich repeat family protein/extensin family protein ( <i>A. thaliana</i> )	5e-19			Accumulation in response to wounding, pathogen infection, treatment with elicitor Metabolizing compounds	b	x	x	
8	429	DQ335796.1	Cytochrome P450 monooxygenase ( <i>Medicago truncatula</i> )	5e-08				e	x		
9a	442	AI507317.1	Polyviral helper component protease-interacting protein 2 (hip2 gene) ( <i>Solanum tuberosum</i> )	3e-22			Unknown function	c	x	x	
9a		NM_118840.4	TOR1 (TORTIFOLIA 1) ( <i>A. thaliana</i> )	1e-13			Microtubule associated protein	c	x	x	
10	453	NM_112733.2	CCAAT displacement protein-related/CDP-related (ATCASP) ( <i>A. thaliana</i> )	3e-87			Predicted Golgi apparatus structural component	c	x	x	
11	571	U15657.1	Jasmonate-induced protein ( <i>Atriplex canescens</i> )	1e-04			Homolog of a jasmonate-induced protein from barley, function unknown	b	x		

12	508	NM_102054.3	Kelch repeat-containing F-box family protein ( <i>A. thaliana</i> )	5e-36	Substrate recognition for ubiquitylation	a	x
13	349	NM_115171.3	Low expression of osmotically responsive genes 1 (LOS4) ( <i>A. thaliana</i> )	2e-25	Helicase superfamily c-terminal domain	1.05e-06	Encodes a putative DEAD-Box RNA Helicase and has RNA-dependent ATPase Activity; similar to eukaryotic translation initiation factor 4A
14	477	NM_101941.2	RNA recognition motif (RRM)-containing protein ( <i>A. thaliana</i> )	3e-30	RNA recognition motif	3.43e-22	Nucleotide binding motif possibly involved in developmental and signaling pathways
15	560	NM_001111723.1	SET domain-containing protein SET104 ( <i>Zea mays</i> )	4e-61	N-terminal to some SET domains SET (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax) domain	9.88e-18	Regulating gene expression through histone methylation
16	564	U89609.1	Fiber annexin ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	3e-94	Annexin repeats	1.34e-15 6.40e-02	Interaction with phospholipid membranes (Ca <sup>2+</sup> -dependent)
17	307	NM_113308.5	Hydroxyethylthiazole kinase ( <i>A. thaliana</i> )	1e-19			Thiamine metabolism
18	335	AB040471.1	Bzip transcriptional activator RSG (Repression of shoot growth) ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	3e-18			Transcriptional activator
19	454	NM_102305.1	Zinc finger protein 7 (ZFP7) (C2H2 type) ( <i>A. thaliana</i> )	4e-16	Zinc finger	9.96e-01	CCCH-type zinc finger motifs regulate RNA stability
20	388	AY191304.1	Ethylene responsive element binding protein ( <i>Sesuvium portulacastrum</i> )	2e-38			DNA binding
21	578	NM_113083.4	Cyclin-dependent protein kinase (CYCP2.1) ( <i>A. thaliana</i> )	2e-53	Domain present in cyclins	1.58e-01	Cell-cycle progression
22	698	NM_129754.3	Zinc finger (CCCH-type) family protein ( <i>A. thaliana</i> )	4e-05			Nucleic acid binding; transcription factor, zinc ion binding
23	589	NM_127633.3	Lumazine-binding protein ( <i>A. thaliana</i> )	2e-22			Riboflavin synthase
24a	751	EF091878.1	ACRE 276-like protein ( <i>S. tuberosum</i> )	1e-120	Armadillo/beta-catenin-like repeats (ARM)	4.03e-01 3.52e-00 1.08e-00	Ubiquitylation of protein substrates
24b		AY220483.1	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 276 ( <i>ACRE276</i> ) ( <i>N. tabacum</i> )	3e-109			a
24c		NM_102674.3	PUB17 (PLANT U-BOX17); ubiquitin-protein ligase (PUB17) ( <i>A. thaliana</i> )	5e-74			a
25	751	AF123508.1	Nt-iaa28 deduced protein ( <i>N. tabacum</i> )	3e-17			Auxin responsive gene/transcription factor
26	431	DQ200399.1	Triosephosphate isomerase ( <i>S. tuberosum</i> )	4e-106			Role in glycolysis; essential for efficient energy production
27	417	AK230200.1	Clathrin binding protein ( <i>A. thaliana</i> )	5e-08			Cell trafficking

<sup>a</sup> Division into subclasses (a-c) of genebank sequences with significant homology but different functions<sup>b</sup> Expect (E) values of less than 1e-2 usually indicate homology and those of less than 1e-6 almost always indicate homology (Altschul et al. 1997)<sup>c</sup> Expect (E) values of less than 1 usually indicate homology (Schultz et al., 2004)<sup>d</sup> The candidates no. 1, 15, 16, 24 are homologue to two or three functional domain repeats, every domain is illustrated by its E-value<sup>e</sup> Functional categories: (a) ubiquitin/proteasome system, (b) stress and pathogen response, phytohormone signalling , (c) cell structure, cell cycle, cell signalling and protein modification, (d) translation and protein modification, (e) metabolism,<sup>f</sup> regulator of gene expression, (g) not determined

Out of 36 cDNA sequences analyzed, 27 cDNA encoded sugar beet candidate P25 interacting proteins displayed significant ( $E$  value below  $1e^{-04}$ ) homology to plant gene products with known functions. Nine candidate clones did not display significant homology to plant sequences with known functions (pJG4-5-28 to -36). The cDNA inserts of these clones displayed a length of 602 bp (no. 28), 454 bp (no. 29), 527 bp (no. 30), 433 bp (no. 31), 497 bp (no. 32), 541 bp (no. 33), 788 bp (no. 34), 452 bp (no. 35) and 505 bp (no. 36), respectively. SMART database analysis revealed conserved functional or signaling domains for 10 out of 27 candidates (candidate no. 1, 2, 6, 13, 14, 15, 16, 19, 21 and 24). In most cases, the SMART analysis confirmed the results of the BLAST search. The proteins identified in the Genbank BLAST search, showing significant homology to the P25 interacting sugar beet candidates, displayed known or at least putative functions. In accordance to their biological role all database matches corresponding to candidate no. 1-27 were classified into the following categories: a) ubiquitin/proteasome system, b) stress, pathogen response and phytohormone signaling, c) cell-structure, cell cycle and cell trafficking, d) translation and protein modification, e) (general) metabolism, f) regulators of gene expression. Interestingly, 3 out of 27 candidates, no.1 (1149 bp), 12 (508 bp) and 24 (751 bp) displayed significant homology to plant proteins involved in the ubiquitin/proteasome system (UPS), a key regulator for many biological processes in plants. In principle, the system regulates protein stability by covalently attaching ubiquitin to target proteins for 26S proteasome degradation. Besides phytohormone signaling, light signaling, organ initiation and patterning, UPS is now known to be essential for plant defense against pathogens. The candidates 1 and 12 are similar to kelch repeat-containing F-box family proteins from *A. thaliana* responsible for substrate recognition in the ubiquitylation process as member of the E3 ligase complex. No. 24, a candidate with high homology to three different known sequences is also involved in the ubiquitylation process as plant U-box protein from *A. thaliana* known as an E3 ligase.

Candidate proteins interacting with P25 in yeast displaying homology to proteins involved in stress and pathogen response as well as phytohormone signaling (candidate no. 3, 7, 11, 20, 25) were summarized in one category. Candidate no. 3 matched best in Genbank analysis with an ethylene responsive putative universal

stress protein from *A. thaliana*. Leucine rich repeat family proteins/extensin family proteins (*A. thaliana*), to which candidate no. 7 possessed highest homology, are essential for cell wall assembly and growth by cell extension and expansion and are known to be induced by auxin, biotic or abiotic stress. Candidate no. 11 revealed significant homology to a plant jasmonate-induced protein with unknown function. An ethylene responsive element binding protein with putative DNA binding/transcription factor abilities (*S. portulacastrum*) resulted from candidate no. 20 Genbank search. Candidate no. 25 showed high homology to a putative auxin responsive gene/transcription factor from *N. tabacum* belonging to the early auxin-responsive Aux/IAA gene family.

From rhizomania root-proliferation symptomatology it has been deduced that BNYVV influences root hair morphogenesis, cell division and elongation. Therefore, candidates with a putative participation in cell structure, cycle and trafficking were classified into one category. Candidate no. 6 showed high homology to actin (*Carica papaya*) and no. 9 to a microtubule associated protein named TOR1 (*A. thaliana*) which regulates the orientation of cortical microtubules and the direction of organ growth. The protein plays a role in control of microtubule dependent anisotropic cell elongation. The homologue with the highest expected value to candidate no. 10 is predicted to represent a structural component of the Golgi apparatus which is known to be involved in protein modification as well as in synthesis and modification of membranes and cell walls. This cDNA candidate displayed homology to a regulator of gene expression: CCAAT displacement protein-related/ CDP-related (ATCASP - defined as 'cut alternatively spliced product' from *A. thaliana*). Candidate no. 16 displayed homology to fiber annexin and candidate no. 27 to a clathrin binding protein (*A. thaliana*), known to be involved in membrane vesicle formation.

Four candidates were classified into the category 'translation and protein modification'. Candidate no. 2 revealed high homology to thioesterase proteins (*A. thaliana*), which belong to the class of hydrolases, however, SMART search resulted in the identification of a conserved protein phosphatase domain. In addition candidate no. 5 showed homology to another *A. thaliana* serine/threonine protein phosphatase. Candidate no. 13 revealed high homology to an eukaryotic translation initiation factor (*A. thaliana*).

Following Genbank search, three sugar beet encoded proteins isolated within the P25 YTH screen were found to be putatively involved in cell metabolism, namely: no. 8 with high homology to a Cytochrome P450 monooxygenase (*M. truncatula*), no. 23 with a putative involvement in riboflavin synthesis (*A. thaliana*) and no. 26, displaying high homology to a triosephosphate isomerase (*S. tuberosum*).

In total, four candidates (14, 15, 19 and 22) could be associated with regulation of gene expression. The best match sequence to candidate no. 14 revealed an RNA-recognition motif (*A. thaliana*), which has been found in splicing factors, translation initiation factors and other RNA-binding proteins. The SET-domain, identified in SMART search of candidate no. 15 is regularly found in methyltransferases i.e. histone methyltransferases which regulate gene expression (*Z. mays*). Candidate no. 18 displayed homology to a transcriptional activator from *N. tabacum*. Finally two candidates (no. 19 and 22) were significant homologues to Zinc-finger (C2H2- and CCCH-type respectively) motifs which can be found in transcription and splicing factors (*A. thaliana*).

### **P25 interacts with several YTH identified candidate proteins in living plant cells.**

To confirm the interaction of sugar beet candidate proteins with P25 using an *in planta* BiFC with monomeric red fluorescent protein (mRFP1) was selected (Jach et al. 2006; Walter et al. 2004). Two binary vectors for agrobacterium-mediated transient expression were constructed, expressing P25 or a cDNA encoded candidate fused to the N-terminal 177 amino acids or the C-terminal 66 amino acids of mRFP1, respectively, driven by the *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter and polyadenylation signal. To validate the system for its suitability to detect the physical interactions of two proteins, a positive control was developed. As *E. coli* β-glucuronidase (GUS) is known to form tetramers (Bracey and Paigen, 1987), it was applied for the *in planta* BiFC analysis using the newly constructed vectors. Agroinfiltration of mRFP-C-GUS and -N-GUS led to visible reconstitution of mRFP fluorescence at 5 dpi (Fig. 2A), whereas infiltration of mRFP-N-GUS plus mRFP-C-empty did not (Fig. 2B) as observed under epifluorescence microscopy (FM). GUS expression was verified in total leaf protein extracts with HA and c-myc specific antibodies at the expected size of 75 kDa (plus the mRFP-C or mRFP-N)

(Fig. 3). Subsequently all 36 sugar beet encoded cDNA candidate genes were cloned into pBin-mRFP-N. The assay was repeated with mRFP-C-P25 plus mRFP-N-expressing each of the different (YTH-selected) cDNA-candidates. 10 of 36 candidates namely candidate no. 6, 7, 9, 10, 14, 16, 22, 26, 27, 28 and 33 displayed reconstitution of mRFP fluorescence at 5 dpi when co-infiltrated with P25 (Fig. 2C-L). This fluorescence based detection of *in planta* interaction was not detected when P25 or the candidate was transiently expressed alone (data not shown). In all cases, detectable mRFP red fluorescence coincided with detection of the candidate-mRFP fusion expression (Fig. 3). Remarkably, the expression level correlated roughly with the strength of the fluorescing signal (e.g. candidate no. 14, 16, 22). Strong interactions of cDNA-P25 showed lower fluorescence (i.e. candidate no. 14 and 16) than the others. All remaining 26 mRFP-N-candidate fusions did not result in detectable mRFP reconstitution, when co-infiltrated with mRFP-P25. Out of the candidates where interaction in yeast could not be confirmed, expression of eight candidates (no. 3, 4, 5, 22, 29, 31, 32, and 33) were detectable in western blot analysis of total leaf protein extracts following *N. benthamiana* agroinfiltration. Therefore these were considered to represent additional false-positive P25 interactors and were excluded from further evaluation. Although independent repetitions were performed, the other 18 candidates did not show any expression beyond western blot detection level.

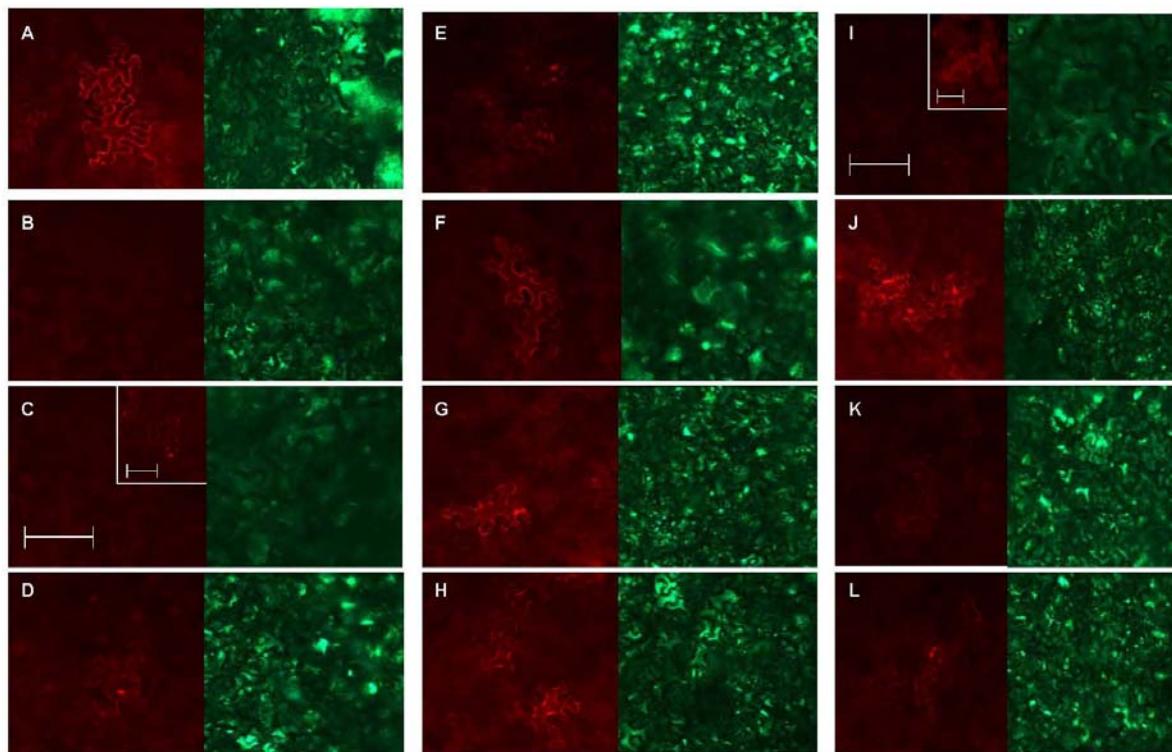


Fig. 2.

Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) visualization of BNYVV P25 *in planta* interaction with several *Rz2* sugar beet cDNA encoded candidate proteins initially identified in YTH library screen.

Photos of epifluorescence microscopy (200x) mRFP analysis and bright field microscopy of BiFC assay. *N. benthamiana* leaf epidermis cells at 5 dpi following agroinfiltration with mRFP-C and -N, fused to P25 and sugar beet candidate interactors respectively. **A**, positive control: *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase (GUS) tetramerization, **B**, negative control: mRFP-N-GUS plus mRFP-C-empty, **C-L**, mRFP-C-P25 plus mRFP-N-cDNA-candidate, **C**, no. 6; **D**, no. 9; **E**, no. 10; **F**, no. 14; **G**, no. 16; **H**, no. 22; **I**, no. 26; **J**, no. 27; **K**, no. 28; **L**, 33; bar in photos C and I represent a length of 50 nm

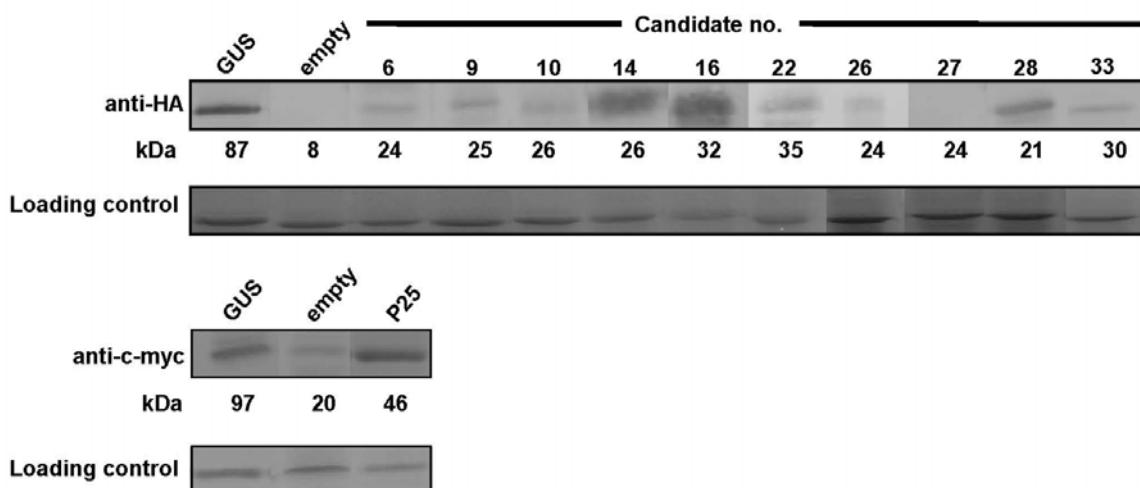


Fig. 3.

Immunodetection of transiently expressed mRFP-C-P25 and mRFP-N-candidate fusions tagged with haemagglutinin (HA) and c-myc respectively in BiFC assay in total *N. benthamiana* leaf proteins. **A**, HA based detection (with specific antiserum) of mRFP-N-candidate fusions (sizes in kDa indicated below the signals) and mRFP-N-GUS positive control. **B**, C-myc based detection (with specific antiserum) of mRFP-C-P25 and mRFP-C-GUS positive control. **C**, SDS-PAGE Coomassie-stained loading control corresponding to (A) and (B)

## DISCUSSION

In this study we aimed to obtain first insights into the virus-host interaction by identifying sugar beet proteins from a resistant genotype showing physical interaction with P25 and to deduce their putative biological role. To our knowledge, this study represents the first systematic YTH cDNA library screen of sugar beet using a viral pathogenicity factor as bait. Although the proof of biological significance of the interactions detected is missing, the data represent a first step towards understanding of cellular life cycle of BNYVV and gives a first indication of how the resistance might control virus replication and systemic spread.

The sugar beet genome consists of 758 Mbp encoding approximately 25,000 genes (Kole 2007). The cDNA library containing ca.  $1.4 \times 10^6$  independent clones resulted in a calculated 18-fold coverage of the sugar beet proteome, which is

comparable to cDNA libraries applied in other successful YTH-studies [e.g. *N. tabacum* cDNA library,  $1.55 \times 10^6$  clones, 15-fold coverage (Soellick et al. 2000) and *A. thaliana* library  $1 \times 10^6$  clones, 13-fold coverage (Pazouhandeh et al. 2006)]. The high redundancy might explain the fact that no P25 interacting protein was isolated more than once from the library, although several hundred colonies were picked for further analysis. The de-selection process of false-positive candidates with transcription autoactivation ability can be considered as highly quantitative because it was performed in two repetitions in independent assays using liquid and solid media with different plating densities, respectively, leading to 85% (384/450) de-selected candidates. As in the BiFC approach 18 translational fusions of candidate proteins with mRFP did not lead to detectable transient expression, which might be explained by protein instability, we will not exclude these candidates from evaluation. These 18 BiFC non-expresser candidates and the remaining eight candidates, which did not display *in planta* BiFC interaction, although being expressed should be used in further studies to confirm the yeast interaction. Remarkably, many of the candidates could be assigned to a function with a plausible relation to the virus life cycle or plant resistance.

The screen revealed three different P25 interactors with high homology to F- and U-box proteins (no. 1, 12 and 24) placed in category a. Multiple studies have found evidence that mammalian as well as plant viruses try to overcome the stoichiometric imbalance of host proteins over virus proteins by directing their target plant proteins to the 26S proteasome, acting mainly at the point of substrate recognition (reviewed in Banks, 2003). Among plant RNA (and DNA) virus proteins, this function has been identified as an additional mode of action and was demonstrated to be connected to proteins with various functions including silencing suppressor proteins (Jin et al. 2007; Pazhouhandeh et al. 2006), movement proteins (Reichel & Beachy 2000) and cell cycle regulators (Aronson et al. 2000). In contrast to virus proteins which mimic an F-box (Aronson et al., 2000; Pazhouhandeh et al. 2006) an F-box motif was not predicted in P25 (data not shown). The biological relevance of the interference of BNYVV P25 with the proteasome remains unknown but a connection of P25's role in enhancing virus replication and spread mediated by influencing the turnover of host proteins seems plausible. Interestingly, upregulation of a sugar beet ubiquitin gene following

BNYVV infection was reported in the recent transcriptome analysis of a susceptible genotype (Schmidlin et al. 2008).

Necrotic root hairs and a taproot with brownish vasculature are indicative for a resistance reaction which is unable to limit the virus spread and reflects a stressed tissue status. This is supported by the results of the studies on the effect of BNYVV changes in the sugar beet proteome, where several phytohormone and stress response related proteins were identified, including auxin-related proteins and one abscisic acid induced protein (Larson et al. 2008). The elevated auxin contents monitored in early studies (Pollini et al. 1990) and the abnormal root hair synthesis and proliferation are probably induced by the virus to increase the number of host cells for the obligate biotrophic *P. betae* vector. Consistently, Schmidlin et al. (2008) detected virus induced increased expression of the sugar beet auxin binding protein 1 gene (*ABP1*). As virus symptoms are dependant on P25 presence, it was not surprising to find a P25 interaction with proteins related to phytohormone metabolism (category b) like candidate no. 25 with high homology to Nt-iaa deduced protein known as auxin responsive gene product (Dargeviciute et al. 1998). The authors described that *Aux/IAA*-related proteins play a regulatory role in auxin-induced events during cell elongation. The high homology of candidate no. 20 to an ethylene responsive element binding protein with key regulatory functions in developmental processes (Jiménez et al. 2005; Leubner-Metzger et al. 1998) suggests another phytohormone related gene to be a P25 target. The coincidence of candidate no. 7 identification with high homology to an LRR-extensin family protein is striking, and in agreement with the findings of Schmidlin et al. (2008) who detected BNYVV induced upregulation of a sugar beet extensin gene. Extensin is known to be a key regulatory element of cell-wall development (Cassab 1998) that can be induced by wounding and pathogen infection or abiotic stress (Merkouropoulos et al. 1999; Merkouropoulos and Shirsat 2003; Takemoto et al. 2001). Hence, it seems plausible that P25 targets this protein to suppress a stress response. When we subjected the best matched candidate no. 7 sequence (NM\_103837.1) to BLAST search (Blastn algorithm, data not shown), another *Arabidopsis* LRR-extensin that regulates root hair morphogenesis and elongation was identified (acc. no. NM\_101076). Interestingly, null mutants of this allele developed root hairs that frequently abort, swell, or

branch (Baumberger et al. 2001) suggesting that P25 might interfere with candidate no. 7 to induce virus symptoms. Future studies using the allele from susceptible plants will be necessary to detect a polymorphism and to confirm the biological relevance of this hypothesis.

Consistent with the proteomic study which identified BNYVV upregulation of cell-cycle and cell structure related transcripts and proteins (Larson et al. 2008), we isolated six P25 interacting candidates putatively connected to these processes (category c). Actin (no. 6) and fiber annexin (no. 16) are components of the cytoskeleton. Members of the actin multigene family are differentially expressed during plant development (Li et al. 2005) whereas plant annexins are involved in membrane processes and represent an important element of the calcium signaling pathway (Konopka-Postupolska et al. 2007). Annexin was found to function in plant stress response (e.g. osmotic stress) and due to annexin-actin interaction a signaling function was proposed (Calvert et al. 1996). We therefore suggest the hypothesis that P25 targets these proteins as an additional interference to root hair morphogenesis and cell wall synthesis or alternatively influence a possible actin-annexin mediated signal transduction. Candidate no. 27 displayed significant homology to an *Arabidopsis* clathrin binding protein. As clathrin possesses a key position in cell division and protein trafficking through endocytic pathways and controls formation of membrane internalization (Pérez-Gómez and Moore, 2007). Clathrin-coated vesicles have been associated with rapidly growing cells like root hair tips (Holstein, 2002) this pathway might represent another P25 target for the interference with root morphogenesis. In addition to P25 proteasome interference, possible similarities to a potyvirus silencing suppressor (HC-Pro) are given (Jin et al. 2007). To our surprise, another candidate with homology to a HC-Pro interacting protein was revealed in our screen. Candidate no. 9 showed homology to a HC-Pro interacting protein (HIP2) with unknown functions previously isolated from potato (Guo et al. 2003). The second match of this BLAST search however was an *Arabidopsis* protein responsible for cortical microtubules playing an important role in the regulation of the direction of cell expansion (TOR1). Although the virus genera (*Potyvirus* and *Benyvirus*) do not show close phylogenetic relation and their gene expression strategies are divergent, these results suggest a similar mode of action of both pathogenicity factors.

The candidates assigned to the categories d, e and f show similarity to genes with common functions in the translation and protein modification, cell metabolism and gene expression. Therefore the biological significance of the P25 interaction for them remains speculative. For example Larson et al. (2008) also identified proteins induced in primary and secondary metabolism, without any associated role in relation to viral-host interactions.

The YTH screen of an *Rz2* sugar beet cDNA library of high quality with the BNYVV encoded P25 in comparison to screens with other viral pathogenicity factors (Guo et al. 2003, Pazhouhandeh et al. 2006, Jin et al. 2007, Anandalakshmi et al. 2000) uncovered an outstanding number of candidates possibly involved in virus pathogenicity/virus life-cycle or plant resistance response in sugar beet. There is no doubt that additional interaction tests with each of the candidates, where BiFC assay failed, are necessary to prove these interactions. With high probability, isolation of full-length sequences from susceptible and resistant genotypes for sequence comparison and YTH repetition, as well as, genomic mapping will reveal sugar beet antiviruse resistance factors leading to a better understanding of this plant virus interplay.

## MATERIALS AND METHODS

### **Yeast two-hybrid (YTH) system, yeast strains, plasmids and medium.**

*Saccharomyces cerevisiae* strains EGY48 (MAT $\alpha$ , *trp1 his3 ura3 leu2::6 LexAop-LEU2*) (Estojak et al. 1995) and RHY206 (MAT $\alpha$  *trp1D::hisG his3D200 ura3-52 lys2D201 leu2-3*) were obtained from MoBiTec (Göttingen, Germany) and Origene Technologies Inc. (Rockville, MD., U.S.A.) respectively. Yeast full media, selective drop-out media and amino acid (aa) stock solutions (YPD and YNB-DOB) supplemented with glucose or galactose (glu/gal) were prepared using standard protocols (Ausubel et al. 1993, Origene *DupLEX-A<sup>TM</sup>*User manual). Mobitec Grow'n'Glow GFP Two-Hybrid System (MoBiTec, GmbH Göttingen, Germany) is a modified version of the LexA/B42 YTH system originally developed by (Fields and Song, 1989). It consists of the bait plasmid pEG202, the prey plasmid pJG4-5 (Gyuris et al. 1993) and a reporter plasmid pGNG1 (Cormack et al. 1998) containing the GFPuv variant (Cramer et al. 1996) under control of four copies of

the *lexA* operators within a minimal *GAL1,10* promotor. Plasmids were propagated in *E. coli* DH5α.

### **Molecular biology techniques.**

All plasmid manipulations were performed according to standard techniques (Sambrook et al. 1989) unless otherwise specified. Manipulations were verified through sequencing (MWG Biotech AG, Martinsried, Germany).

### **Cloning of the P25 ORF into pEG202 YTH bait plasmid.**

Plants of a BNYVV susceptible sugar beet hybrid (cultivar Tatjana, kindly supplied by KWS Einbeck, Germany) were grown in a German field soil sample infected with rhizomania pathotype B (soil origin: Büttelborn) for 4 weeks in the greenhouse. Total RNA (Hamilton et al. 2002) was prepared from (BNYVV infected) lateral roots and the entire BNYVV P25 of RNA3 encoded open reading frame (ORF) (nt. 447-1103 in Genbank Acc. no. M36894) was RT-PCR amplified with specific primers P25-up (5'-TTGAATTCATGGGTGATTATTAGGCG-3', restriction sites in italics and viral nucleotides underlined) and P25-low (3'-TACCTCGAGCTAATCATCATCATCAACAC-5') introducing restriction sites *Eco*RI and *Xba*I and subsequently cloned into the plasmid pEG202 to obtain a translational fusion of P25 with the LexA DNA binding domain (BD). The B-type P25 ORF insert was verified through sequencing revealing a composition of the amino acid tetrad pos. 67-70 of AYHR.

### **Construction of a sugar beet cDNA library.**

Plants of a homozygous sugar beet breeding line (8T\_0015, kindly supplied by KWS, Einbeck, Germany) carrying the *Rz2* BNYVV resistance gene, were grown in the above described BNYVV B-type infested soil for 4 weeks. Root and leaf tissue was harvested and used together for preparation of 2 µg total RNA. Generation of the cDNA library in pJG4-5 was carried out by "vertis" Biotechnology AG (Freising-Weihenstephan, Germany). The cDNA synthesis was carried out with M-MLV RT and a random linker primer containing an *Xba*I restriction site. Synthesis of the second strand was achieved with a second linker primer containing *Eco*RI (5'-GAATTCCATCAGGCAGAGGACGAGACAGAACGCA-3',

restriction site in italics) and Klenow Polymerase. After PCR amplification, normalization and size fractionation of cDNAs greater than 0.4 kb, the library was EcoRI-Xhol cloned into pJG4-5 to obtain a translational fusion of the cDNAs with the activation (AD) domain B42 and hemagglutinin epitope tag (HA-tag). In total, the library contained a number of  $1.4 \times 10^6$  recombinant clones.

**Yeast transformation and YTH sugar beet *Rz2* cDNA library interaction screen with BNYVV P25 applying quantitative liquid mating.**

The pJG4-5 cloned sugar beet cDNA library ( $1.4 \times 10^6$  independent clones) was quantitatively transformed into yeast strain EGY48 (MAT $\alpha$ ) following the "High-Efficiency Transformation Protocol" of (Gietz and Woods, 2002) with slight modifications. As carrier DNA, denatured Herring Testes DNA (Clontech), (10 mg/ml) was used, the incubation time was increased to 1 hour and centrifugation was carried out at  $3.000 \times g$ . Approximately  $5.2 \times 10^8$  colonies growing on selective medium [YNB-DOB-(glu)-trp] were propagated, pooled and stored in aliquots at -70°C, following the method described in (Soellick and Uhrig 2001). 50% of the cells in thawed aliquots were determined to be viable. pEG202-P25 and pGNG1 were co-transformed into RHY206 (MAT $\alpha$ ) selected on YNB-DOB-(glu)-ura-his and tested for transcriptional autoactivation of LexA controlled (pGNG1 encoded) GFPuv and (genome integrated) LEU2 reporter genes. The empty plasmid pJG4-5 was supertransformed into RHY206 (pEG202-P25, pGNG1) and re-tested for autoactivation [YNB-DOB-(glu)-ura-his-trp]. Quantitative liquid mating under optimized conditions of freshly grown RHY206 (pEG202-P25, pGNG1) with a melted long-term culture aliquot of EGY48 (pJG4-5-cDNA-library) was carried out as described in (Soellick and Uhrig 2001) and double transformed zygotes were selected [YNB-DOB-(gal)-ura-his-trp-leu]. Both cultures were mixed for mating at a ratio Mata:Mat $\alpha$  of 2,5:1 with a cell density of  $6 \times 10^8$  (Bait/GFP cells  $3.75 \times 10^8$ : prey cells:  $\sim 1.5 \times 10^8$ ). The mating reaction was plated [YNB-DOB-(gal)-ura-his-trp-leu] at a density of  $2 \times 10^5$  cells\*cm $^{-2}$  resulting in a mating efficiency calculated by numbers of zygotes in ratio to total cells (including dead cells) of 11%. The number of double transformants was calculated as  $7 \times 10^8$ . GFP-fluorescing colonies (450) were identified with a hand-held long-wave ultraviolet (UV) lamp (Blak Ray model B 100 AP, 100W, UV products Upland, CA),

re-streaked on solid selective media and tested for autoactivation in liquid medium [YNB-DOB-(glu)-ura-his-trp-leu] to de-select transcriptional autoactivator cDNAs. 37 candidate interactors with no detectable autoactivation activity were applied for further analysis. Plasmid DNA from yeast was recovered using the protocol described in (Origene *DupLEX-A<sup>TM</sup>*User manual). To selectively recover only pJG4-5 cDNA library plasmids, each isolated yeast plasmid DNA was transformed into *E. coli* strain KC8 (*pyrF*, *leuB600*, *trpC*, *hisB463*) auxotrophic for tryptophane and re-isolated on minimal media (M9, (Sambrook and Russell 2001) lacking tryptophan and supplemented with Ampicillin. All candidate pJG4-5 cDNA library plasmids were re-transformed into EGY48 and liquid mated with RHY206 (pGNG1+pEG202-P25) following the method described (Yeast Protocols Handbook 2008, Clontech Laboratories Inc.) For each interaction mating of a candidate with P25, a test for autoactivation was performed by mating with RHY206 (pGNG1+pEG202-empty). 5 µl of dilutions series ( $10^0$  -  $10^{-5}$ ) of the mating reaction was spotted on selective medium. At 5-7 days incubation, both matings were checked for interaction and autoactivation respectively. Only candidates displaying yeast growth at 100-fold higher dilution than the autoactivation control were considered to be non-transcriptional autoactivators. In all yeast two-hybrid interaction assays, appropriate positive controls consisting of mouse P53 (Iwabuchi et al. 1993) fused with DNA-BD (pEG202-P53) and LTA fused with DNA-AD (pJG4-5-LTA) were included (Li and Fields, 1993). Total area optical density analysis of GFP fluorescence was carried out using epifluorescence microscopy of yeast cells carried out with Gel-Pro analyser software 6.0 (Media Cybernetics).

#### **Total yeast and plant protein extraction, SDS-PAGE, electroblot.**

Proteins were extracted from yeast cells following the method of (Horvath and Riezman, 1994) with modified extraction/SDS-sample buffer (0.02 M Tris pH8.0, 0.2 mM EDTA, 2% SDS, 10% mercaptoethanol, 20% glycercol, 0.05% (w/v) bromphenolblue).

Extraction of total plant proteins was carried out by grinding 100 mg agroinfiltrated *N. benthamiana* leaf tissue in liquid nitrogen. The frozen leaf powder was transferred into 1.5 ml tube and filled up with 500 µl extraction buffer (95°C). The

homogenized sample was boiled for 5 min and centrifuged for 5min at 11.000 x g. The protein samples (20µl) were separated by 15% SDS-PAGE and electroblotted on nitrocellulose (Amersham) for LexA-detection or PVDF (Roche) membranes for HA- and c-myc detection.

#### **Immunodetection of HA, LexA and c-myc tagged proteins.**

After blocking the membrane with 2% (HA and c-myc) or 1% (LexA) skimmed milk, immunodetection of HA was carried out using anti HA-high affinity rat monoclonal antibody (Roche 11 867 423 001, 1/800) and alkaline phosphatase (AP) - conjugated goat anti-rat IgG (whole molecule) (Sigma A9654, 1/7000). LexA was detected with polyclonal rabbit anti-LexA (Invitrogen 46-0710, 1/5000) and AP-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibody (Sigma A3687, 1/10000). C-myc was probed with anti c-myc mouse monoclonal IgG (Roche 11 667 149 001, 1/500) and AP-conjugated goat anti-mouse IgG (BioRad 170-6520, 1/500). Detection was performed using chromogenic substrates BCIP (5-Bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt) and NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) reagents (Applichem).

#### **Sequence analysis.**

The entire cDNA inserts of library derived candidate genes were determined by a commercial company (MWG Biotech AG, Martinsried, Germany) with standard primers flanking the multiple cloning site of pJG4-5 and applied for database comparison using the nucleotide blast program with the Blastn algorithm within the basic local alignment search tool (BLAST) using the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (Altschul et al. 1997). The search was limited to sequences from the taxa Viridiplantae (taxid:33090).

cDNA sequences were translated with VectorNTI software (Invitrogen, Germany) and applied for the Web-based “Simple Modular Architecture Research Tool” (SMART 5) analysis (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) to identify functional and signaling domains within the sugar beet protein sequences (Schultz et al. 1998; Letunic et al. 2006).

***In planta* bimolecular fluorescence complementation assay (BiFC).**

The red BiFC system based on improved monomeric red fluorescent protein (mRFP1-Q66T) (Jach et al. 2006) was adapted to the specific needs of the library clones. The coding sequence of mRFP1-Q66T mutant was kindly provided by J. Uhrig (University of Cologne, Germany). In accordance to (Jach et al., 2006) the coding sequences for the N-terminal aa 1-168 and C-terminal aa 169-225 were PCR amplified using specific primers. Between mRFP-N and P25, a c-myc tag and between mRFP-C and sugar beet coding region, a HA-tag was inserted by attaching the coding sequence to the lower mRFP-N and -C primers. A binary vector pBIN19 (Bevan, 1984) was supplied with an enhanced cauliflower mosaic virus 35S-promoter and polyA-terminator cassette (kindly supplied by E. Maiss, Leibniz University Hannover) (pBIN19-35S-pA). The mRFP-N-c-myc and mRFP-C-HA PCR products were cloned into pBIN19-35S-pA, leading to pBIN19-mRFP-N-c-myc and -C-HA. Primer sequences and plasmids are available on request.

The BNYVV P25 ORF was *Eco*RI-*Xba*I cloned into pBIN19-mRFP-N-c-myc. cDNAs from pJG4-5 clones displaying P25 interaction in yeast but no transcriptional autoactivation were cloned similarly into pBIN19-mRFP-C-HA. To obtain a BiFC positive control, the *E. coli* β-glucuronidase (GUS) open reading frame (Vancanneyt et al. 1990) was PCR reamplified from a GUS plant expression vector (pTQ-GUS-N, kindly supplied by E. Maiss) with specific primers introducing *Eco*RI and *Xba*I restriction sites to obtain a translational N-terminal fusion with mRFP-N and mRFP-C for use in BiFC. Cloned sequences were verified by sequencing.

***Agrobacterium* mediated transient expression BiFC assay.**

Binary vectors were electrotransformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 (pGV2260). *A. tumefaciens* cultures were prepared for agroinfiltration essentially as described (Voinnet et al. 2003) with an OD<sub>600</sub> adjusted to 1.0. To suppress RNA silencing, a potyviral HC-Pro (35S-HC-Pro, (Varrelmann et al. 2007) of plum pox virus (PPV) was co-expressed by *A. tumefaciens* at an OD<sub>600</sub> of 1.0 diluted (1:50). For transient expression assay, leaves of 4 weeks old *Nicotiana benthamiana* plants were co-infiltrated together with the helper component of PPV into epidermis cells of *N. benthamiana* and leaf patches were examined for mRFP

fluorescence using epifluorescence microscopy (FM) at 3-5 dpi. As negative control pBIN-mRFP-N-GUS and pBIN-mRFP-C-cDNA and as positive control pBIN-mRFP-N-GUS and pBIN-mRFP-C-GUS were carried out. mRFP fluorescence was detected with FM (Leica DMR) using specific DsRed filters (Emitter HQ 620/60, Beamsplitter Q 585 LP, Exciter HQ 565/30). Photographs were taken using Leica DFC camera, DFC300 FX.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research project has been carried out with the financial support of the Federal Ministry of Economics and Technology (BMWi), administered via the Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen e.V. (AiF) and the Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP).

## LITERATURE CITED

- Acosta-Leal, R., Fawley, M.W., and Rush, C.M. 2008. Changes in the intraisolate genetic structure of Beet necrotic yellow vein virus populations associated with plant resistance breakdown. *Virology* 376:60-68.
- Adams, M.J., Antoniw, J.F., and Mullins, J.G.L. 2001. Plant virus transmission by plasmodiophorid fungi is associated with distinctive transmembrane regions of virus-encoded proteins. *Arch Virol.* 146:1139-1153.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J.M. Jr, Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L., and Vance VB. 2000. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 290:142-144.

Aronson, M.N., Meyer, A.D., Györgyey, J., Katul, L., Vetten, H.J., Gronenborn, B., and Timchenko ,T. 2000. Clink, a nanovirus-encoded protein, binds both pRB and SKP1. *J Virol.* 74:2967-72.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1994. Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc.) Vol. 1, Chap. 5.

Baumberger, N., Ringli, C., and Keller, B. 2001The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*.*Genes Dev.* 15:1128-1139.

Banks, L., Pim, P., and Thomas, M. 2003 Viruses and the 26S proteasome: hacking into destruction. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 28: 452-459.

Bevan, M. 1984. Binary Agrobacterium Vectors for Plant Transformation. *Nucleic Acids Res* 12:8711-8721.

Biancardi, E., Lewellen, R.T., De Biaggi, M., Erichsen, A.W., and Stevanato, P. 2002. The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica* 127:383-397.

Bracey L.T., and Paigen, K.1987 Changes in translational yield regulate tissue-specific expression of beta-glucuronidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:9020-9024.

Calvert, C.M., Gant, S.J., and Bowles, D.J.1996. Tomato annexins p34 and p35 bind to F-actin and display nucleotide phosphodiesterase activity inhibited by phospholipid binding. *Plant Cell.* 8:333-342.

Cassab, G.I. 1998. Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 281–309.

Chiba, S., Miyanishi, M., Kondo, H. and Tamada, T. 2003. Single amino acid changes in the P25 protein gene of Beet necrotic yellow vein virus are involved in resistance responses in Beta vulgaris ssp. maritima. . 5th Symp. of the Int. Working Group of Plant Viruses with Fungal Vectors, Zürich, Schweiz.

Chiba, S., Miyanishi, M., Andika, I.B., Kondo, H. and Tamada, T. 2008. Identification of amino acids of the beet necrotic yellow vein virus p25 protein required for induction of the resistance response in leaves of Beta vulgaris plants. J. Gen. Virol. 89:1314-1323.

Cormack, R.S., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E. 1998. Isolation of putative plant transcriptional coactivators using a modified two-hybrid system incorporating a GFP reporter gene. Plant J. 14:685-692.

Crameri, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. and Stemmer, W.P.C. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. Nat. Biotechnol. 14:315-319.

Dargeviciute, A., Roux, C., Decreux, A., Sitbon, F., and Perrot-Rechenmann, C. 1998. Molecular cloning and expression of the early auxin-responsive Aux/IAA gene family in Nicotiana tabacum. Plant Cell Physiol. 39:993-1002.

Dessens, J.T., and Meyer, M. 1996. Identification of structural similarities between putative transmission proteins of Polymyxa and Spongospora transmitted bymoviruses and furoviruses. Virus Genes 12:95-99.

Estojak, J., Brent, R., and Golemis, E.A. 1995. Correlation of 2-Hybrid Affinity Data with in-Vitro Measurements. Mol Cell Biol.5:5820-5829.

Fields, S., and Song, O.K. 1989. A Novel Genetic System to Detect Protein Protein Interactions. Nature 340:245-246.

- Gidner, S., Lennefors, B.L., Nilsson, N.O., Bensefelt, J., Johansson, E., Gyllenspetz, U., and Kraft, T. 2005. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome* 48:279-285.
- Gietz, R.D., and Woods, R.A. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350:87-96.
- Grimmer, M.K., Trybush, S., Hanley, S., Francis, S.A., Karp, A., and Asher, M.J.C. 2007. An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to Beet necrotic yellow vein virus. *Theor Appl Genet.* 114:1151-1160.
- Guo, D., Spetz, C., Saarma, M., and Valkonen ,J.P. 2003 Two potato proteins, including a novel RING finger protein (HIP1), interact with the potyviral multifunctional protein HCpro. *Mol Plant Microbe Interact.* 16:405-410.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. 1993. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75:791-803.
- Hamilton, A.J., Voinnet, O., Chappell, L., and Baulcombe, D.C. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21:4671-4679.
- Heijbroek, W., Musters, P.M.S., and Schoone, A.H.L. 1999. Variation in pathogenicity and multiplication of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in relation to the resistance of sugar-beet cultivars. *Europ.J. Plant Pathol* 105:397-405.
- Holstein, S.E.H. 2002. Clathrin and plant endocytosis. *Traffic* 3: 614–620.
- Horvath, A., and Riezman, H. 1994. Rapid Protein Extraction from *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Yeast* 10:1305-1310.

- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., and Fields, S. 1993. Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8:1693–1696.
- Jach, G., Pesch, M., Richter, K., Frings, S., and Uhrig, J.F. 2006. An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. *Nat Methods* 3:597-600.
- Jiménez, J.A., Rodriguez, D., Calvo, A.P., Mortensen, L.C., Nicolás, G., and Nicolás 2005. Expression of a transcription factor (FsERF1) involved in ethylene signalling during the breaking of dormancy in *Fagus sylvatica* seeds. *Physiol Planta* 125: 373–380.
- Jin, Y., Ma, D., Dong, J., Jin, J., Li, D., Deng C., and Wang, T. 2007. HC-Pro protein of Potato virus Y can interact with three *Arabidopsis* 20S proteasome subunits in planta. *J Virol* 81:12881-12888.
- Johansson, E. 1985. Rizomania in sugar beet - a threat to beet growing that can be overcome by plant breeding. *Sver. Utsädesfören. Tidsk* 95:115-121.
- Keskin, B. 1964. Polomyxa Betae Nsp Ein Parasit in Den Wurzeln Von Beta Vulgaris Tournefort Besonders Wahrend Der Jugendentwicklung Der Zuckerrübe. *Archiv Für Mikrobiologie* 49:218-226
- Klein, E., Link, D., Schirmer, A., Erhardt, M., and Gilmer, D. 2007. Sequence Variation within Beet necrotic yellow vein virus p25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on *Tetragonia expansa*. *Virus Res* 126:53-61.
- Koenig, R. (2008). Benyviruses. In B. Mahy and M. van Regenmortel (ed.), *Encyclopedia of virology*, 3rd ed. Elsevier Ltd., Oxford, United Kingdom.

Koenig, R., and Lesemann, D.E. 2005. Benyvirus. In: Fauquet CM, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, and Ball LA (eds.) Virus Taxonomy, VIII Report of the ICTV,. London: Academic Press:1043-1048.

Koenig, R., Haeberle, A.M., and Commandeur, U. 1997. Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugarbeet growing area in Europe. Arch Virol 142:1499-1504.

Koenig, R., Jarausch, W., Li, Y., Commandeur, U., Burgermeister, W., Gehrke, M., and Luddecke, P. 1991. Effect of Recombinant Beet Necrotic Yellow Vein Virus with Different Rna Compositions on Mechanically Inoculated Sugar-Beets. J Gen Virol 72:2243-2246.

Kole, C. 2007. Vegetables - Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Vol. 5, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.

Konopka-Postupolska D. 2007 Annexins: putative linkers in dynamic membrane-cytoskeleton interactions in plant cells. Protoplasma. 230: 203-215.

Larson, R.L., Wintermantel, W.M., Hill, A., Fortis, L., and Nunez, A. 2008. Proteome changes in sugar beet in response to Beet necrotic yellow vein virus. Physiol Mol Plant P 72:62-72.

Leubner-Metzger, G., Petruzzelli, L., Waldvogel, R., Vögeli-Lange, R., and Meins, F. Jr. 1998 Ethylene-responsive element binding protein (EREBP) expression and the transcriptional regulation of class I beta-1,3-glucanase during tobacco seed germination. Plant Mol Biol. 38:785-795.

Letunic, I., Copley, R.R., Pils, B., Pinkert, S., Schultz, J. and Bork, P. 2006 SMART 5: domains in the context of genomes and networks. Nucleic Acids Res, 34: 257-260

Lewellen, R.T., Skoyen, I.O., and Erichsen, A.W. 1987. Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: Evaluation of host-plant reactions and selection for and inheritance of resistance. Proc. 50th IIRB Congress Brussels, Belgium:139-156.

Li, X.B., Fan, X.P., Wang, X.L., Cai, L., and Yang, W.C. 2005 The cotton ACTIN1 gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. *Plant Cell.* 17:859-875.

Li, B., and Fields, S. 1993. Identification of Mutations in P53 That Affect Its Binding to SV40 Large T-Antigen by Using the Yeast 2-Hybrid System. *Faseb J* 7:957-963.

Link, D., Schmidlin, L., Schirmer, A., Klein, E., Erhardt, M., Geldreich, A., Lemaire, O., and Gilmer, D. 2005. Functional characterization of the Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. *J Gen Virol* 86:2115-2125.

Liu, H.Y., and Lewellen, R.T. 2007. Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of Beet necrotic yellow vein virus in the United States. *Plant Dis* 91:847-851.

Liu, H.Y., Sears, J.L., and Lewellen, R.T. 2005. Occurrence of resistance-breaking Beet necrotic yellow vein virus of sugar beet. *Plant Dis* 89:464-468.

Luterbacher, M.C., Asher, M.J.C., Beyer, W., Mandolino, G., Scholten, O.E., Frese, L., Biancardi, E., Stevanato, P., Mechelke, W., and Slyvchenko, O. 2005. Sources of resistance to diseases of sugar beet in related Beta germplasm: II. Soil-borne diseases. *Euphytica* 141:49-63.

Merkouropoulos, G., and Shirsat, A.H. 2003. The unusual *Arabidopsis extensin* gene *atExt1* is expressed throughout plant development and is induced by a variety of biotic and abiotic stresses. *Planta* 217:356-366.

Merkouropoulos, G., Barnett, D.C., and Shirsat, A.H. 1999. The *Arabidopsis extensin* gene is developmentally regulated, is induced by wounding, methyl jasmonate, abscisic and salicylic acid, and codes for a protein with unusual motifs. *Planta* 208:212-219.

Miyanishi, M., Kusume, T., Saito, M., and Tamada, T. 1999. Evidence for three groups of sequence variants of beet necrotic yellow vein virus RNA 5. *Arch Virol* 144:879-892.

Pazhouhandeh M., Dieterle M., Marrocco K., Lechner E., Berry B., Brault V., Hemmer O., Kretsch T., Richards K.E., Genschik P., and Ziegler-Graff V. 2006. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:1994-1999.

Pérez-Gómez , J., and Moore, I. 2007 Plant endocytosis: it is clathrin after all. *Curr Biol*. 17: 217-9.

Pferdmenges, F., Korf, K., and Varrelmann, M. 2008. Identification of rhizomania-infected soil in Europe able to overcome Rz1 resistance in sugar beet and comparison with other resistance-breaking soils from different geographic origins. *European Journal of Plant Pathology* DOI 10.1007/s10658-008-9388-9

Pollini, C.P., and Giunchedi, L. 1989. Comparative histopathology of sugar beets that are susceptible and partially resistant to rhizomania. *Phytopathol Mediterr* 28:16-21.

Pollini, C.P., Masia, A., and Giunchedi, L. 1990. Free indole-3-acetic acid in sugar-beet root of rhizomania-susceptible and moderately resistant cultivars. *Phytopathol Mediter* 29:191-195.

Rahim, M.D., Andika, I.B., Han, C., Kondo, H. and Tamada, T. 2007. RNA4-Encoded P31 of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Is Involved in Efficient Vector Transmission, Symptom Severity and Silencing Suppression in Roots. *J Gen Virol* **88**: 1611-1619.

Reichel, C., and Beachy, R.N. 2000. Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. *J Virol*. 74:3330-3337.

Richard-Molard, M. 1985. Rhizomania: a world-wide danger to sugar beet. *Span* 28:92-94.

Richard-Molard, M.S., and Cariolle, M. 2001. Stress hydrique et abiotique et amélioration génétique. Proc. 64th IIRB Congress, Bruges, Belgium, 153-158.

Rush, C.M. 2003. Ecology and epidemiology of Benyviruses and plasmodiophorid vectors. *Annu Rev of Phytopathol* 41:567-592.

Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold; Spring Harbor, NY, 3rd Edition.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., eds. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.

Schirmer, A., Link, D., Cognat, V., Moury, B., Beuve, M., Meunier, A., Bragard, C., Gilmer, D., and Lemaire, O. 2005. Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. *J Gen Virol* 86:2897-2911.

Schmidlin, L., Link, D., Mutterer, J., Guille, H., and Gilmer, D. 2005. Use of a Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-derived replicon as a new tool for gene expression. *J Gen Virol* 86:463-467.

- Schmidlin, L., de Bruyne, E., Weyens, G., Lefebvre, M., and Gilmer, D. 2008. Identification of differentially expressed root genes upon rhizomania disease. Mol plant pathol 9. 741-51
- Scholten, O.E., and Lange, W. 2000. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review. Euphytica 112:219-231.
- Scholten, O.E., De Bock, T.S.M., Klein-Lankhorst, R.M., and Lange, W. 1999. Inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus in Beta vulgaris conferred by a second gene for resistance. Theor Appl Genet 99:740-746.
- Scholten, O.E., Paul, H., Peters, D., Vanlent, J.W.M., and Goldbach, R.W. 1994. In-Situ Localization of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BnYVV) in Rootlets of Susceptible and Resistant Beet Plants. Arch Virol 136:349-361.
- Soellick, T.R., and Uhrig, J.F. 2001. Development of an optimized interaction-mating protocol for large-scale yeast two-hybrid analyses. Genome Biol 2:RESEARCH0052.
- Soellick T, Uhrig J.F., Bucher G.L., Kellmann J.W., and Schreier P.H. 2000. The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 97:2373-2378.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C.P. 1998 SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. Proc Natl Acad Sci U S A. 95:5857-5864.
- Takemoto, D., Doke, N., and Kawakita, K. 2001. Characterization of elicitor-inducible tobacco genes isolated by differential hybridization. J Gen Plant Pathol 67 89-96.

- Tamada, T. 1999. Benyvirus. In: Granoff, A.; Webster, R. (Hrsg.) Encyclopedia of Virology. Academic Press, New York:154-160.
- Tamada, T. 2007. Susceptibility and resistance of Beta vulgaris subsp. maritima to foliar rub-inoculation with Beet necrotic yellow vein virus. J of Gen Plant Pathol 73:76-80.
- Tamada, T., and Baba, T. 1973. Beet necrotic yellow vein virus from rhizomania affected sugar beet in Japan. Annual Phytopath. Soc. Japan 39:325-332.
- Tamada, T., Kusume, T., Uchino, H., Kiguchi, T., and Saito, M. 1996a. Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA-5 is involved in symptom development of sugar-beet roots. Proc. 3rd Symp. of the Int. Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Dundee (UK):49-52.
- Tamada, T., Kusume, T., Uchino, H., Kiguchi, T., and Saito, M. 1996b. Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA-5 is involved in symptom development of sugar-beet roots. . In: Sherwood, J.L.; Rush, C.M. (Hrsg.). Proc. 3rd Symp. of the Int. Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Dundee (UK):49-52.
- Tamada, T., Miyanishi, M., Kondo, H., Chiba, S., and Han, C.G. 2003. Pathogenicity and molecular variability of Beet necrotic yellow vein virus isolates from Europe, Japan, China, and the United States. 5th Symp. of the Int. Working Group of Plant Viruses with Fungal Vectors, Zürich, Schweiz (2002).
- Tamada, T., Shirako, Y., Abe, H., Saito, M., Kiguchi, T., and Harada, T. 1989. Production and pathogenicity of isolates of Beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. J Gen Virol 70:3399-3409.

- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., and Rocha-Sosa, M. 1990. Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220:245-250.
- Varrelmann, M., Maiss, E., Pilot, R., and Palkovics, L. 2007. Use of pentapeptide-insertion scanning mutagenesis for functional mapping of the plum pox virus helper component proteinase suppressor of gene silencing. *J Gen Virol* 88:1005-1015.
- Vetter, G., Hily, J.M., Klein, E., Schmidlin, L., Haas, M., Merkle, T., and Gilmer, D. 2004. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein. *J Gen Virol* 85:2459-2469.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33:949-956.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., and Kudla, J. 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40:428-438.
- Ward, L., Koenig, R., Budge, G., Garrido, C., McGrath, C., Stubble, H., and Boonham, N. 2007. Occurrence of two different types of RNA-5-containing beet necrotic yellow vein virus in the UK. *Arch Virol* 152:59-73.
- Whitney, E.D. 1989. Identification, Distribution, and Testing for Resistance to Rhizomania in Beta-Maritima. *Plant Dis* 73:287-290.

Yilmaz, N.D.K., Meunier, A., Schmit, J.F., Stas, A., and Bragard, C. 2007. Partial nucleotide sequence analysis of Turkish isolates of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) RNA-3. Plant Pathology 56:311-316.

**Kapitel 4: Beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor interacts with a sugar beet F-box protein from resistant and susceptible genotypes involved in the induction of a hypersensitive resistance response**

Manuscript submitted to *Journal of Virology*

**Heike Thiel<sup>1†</sup>, Kamal Hleibieh<sup>2†</sup>, David Gilmer<sup>2</sup> and Mark Varrelmann<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Crop Sciences, Section Plant Virology, University of Göttingen, Grisebachstrasse 6, D-37077 Göttingen, Germany

<sup>2</sup>Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, laboratoire propre du CNRS (UPR 2357) conventionné avec l'Université Louis Pasteur (Strasbourg 1), 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France

<sup>†</sup> Both authors contributed equally to this paper.

Author for correspondence: Mark Varrelmann

e-mail: varrelmann@ifz-goettingen.de

**Key words:** Benyvirus, avirulence gene, virus resistance, hypersensitive resistance, rhizomania, *Beta vulgaris*

## ABSTRACT

We have previously identified a putative F-box protein from *Rz2* sugar beet capable of physically interacting with the beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) RNA3-encoded P25 pathogenicity factor in LexA yeast two-hybrid (YTH) cDNA-library screen. This interaction was confirmed here with both GAL4-YTH system and in an *in vitro* pull-down assay and turned out to be independent of P25's amino acid 67-70 tetrad composition that varies between BNYVV isolates. The identity of the cDNA F-box was confirmed by detecting the interaction with *Arabidopsis thaliana* SKP1 orthologs using YTH. Full-length F-box clones issued from two BNYVV resistant and one susceptible sugar beet lines still interacted with P25 suggesting a resistance independent P25-F-box interaction. F-box transient agrobacterium mediated expression in *Nicotiana benthamiana* leaves

induced necrosis and increased transcript levels of pathogenesis-related proteins, indicating the involvement of the F-box protein in a stress or hypersensitive response to pathogens. F-box proteins belong to an SCF-complex (SKP1-Cullin1-F-box) and provide substrate specificity via their C-terminal domain for the SCF ubiquitin ligases in the protein ubiquitinylation and 26S proteasome protein degradation. The full-length F-box candidates consist of one F-box domain followed by two kelch motifs. These two domains were tested separately for P25 interaction and necrosis induction. Neither interaction with P25 nor cell-death was induced by F-box or kelch domain, pinpointing the entire F-box protein to be necessary for P25 interaction and cell-death induction. The observed P25-F-box interaction suggests a possible involvement in the BNYVV pathogenicity or suppression of resistance response in sugar beet.

## INTRODUCTION

BNYVV, type species of the genus *Benyvirus*, possesses a four to five plus sense RNA genome and is vectored by the soil-borne plasmodiophoromycete *Polymyxa betaee* (22). In susceptible sugar beet genotypes, BNYVV causes rhizomania symptoms that consist of extensive root proliferation of the taproot to form additional necrotising hair-roots and induces tap-root discolouration. Typical rhizomania symptoms occur only in the presence of RNA3 encoded P25 (26, 54). P25 and its composition, is associated with the resistance response and formation of necrotic lesions in mechanical inoculated leaves of *Beta vulgaris* and *B. maritima* (6, 25, 52). Chiba and co-workers (6) suggested P25 to function as an avirulence (Avr) gene product in resistant and pathogenicity factor in susceptible genotypes. P25 is a nucleo-cytoplasmic shuttling protein and its subcellular localization determines symptom severity on the local lesion host *Chenopodium quinoa* (57).

Due to the severe disease symptoms generated by BNYVV, high yielding sugar beet production is only reliable by growth of resistant cultivars. The US-American Holly Sugar Company identified an important major dominant resistance gene *Rz1*, also known as 'Holly' source (3, 47, 48). Further resistance sources from wild beet (*B. vulgaris* ssp. *maritima*) accessions contain the

resistance genes *Rz3* (WB41) and *Rz2* (WB42), respectively (47, 49, 62). Recently, a hybrid line named R36 permitted the identification of a fourth resistance gene named *Rz4* (12). However, the underlying mechanisms of all resistance sources (*Rz1*, *Rz2*, *Rz3* and *Rz4*) mediating a quantitative resistance are unknown. *Rz*-carrying plants do not possess resistance to infection but display reduced virus titers and restricted systemic virus spread (17, 36, 49, 53).

The P25 avirulence gene - pathogenicity factor hypothesis is supported by the coincidence of the occurrence of *Rz1* overcoming BNYVV isolates from several locations in the USA and Europe (34, 35, 38) with P25 proteins harbouring specific mutations in the amino acid hypervariable tetrad 67-70 (46). In a previous YTH screen of an *Rz2*-resistant sugar beet cDNA library with P25, representing an incompatible host virus interaction, we identified several candidates and confirmed some yeast interactions using *in planta* bimolecular fluorescence complementation assay (BiFC) (Thiel and Varrelmann, submitted for publication). One cDNA encoded candidate displayed significant homology to *A. thaliana* kelch repeat containing F-box family protein. Interestingly agrobacterium mediated transient expression of this F-box candidate in BiFC assay induced an early and rapid leaf tissue necrosis in *N. benthamiana* 24 hours post infiltration (hpi). F-box proteins are involved in the ubiquitin-proteasome-system (UPS). Ubiquitylation of proteins intended for degradation by the 26S proteasome is carried out by the activity of three protein enzymatic complexes named ubiquitin-activating enzyme E1, ubiquitin-conjugating E2 and ubiquitin-ligase E3 (18). Subsequent to activation and conjugation of proteins by the E1 and E2 enzymes, E3 ligase is necessary to recruit the specific target protein recognized for destruction to the 26S proteasome (13). The E3 ligase is responsible for substrate specificity and can be divided in different E3 classes (HECT - homologous to E6-associated, APC - anaphase promoting complex, Ring/U-box and SCF) (59). The SCF complex is characterized as a crucial type of ubiquitin E3 ligase and consists of four major components SKP1, Cul1, Rbx1 and an F-box protein (5, 19, 30). F-box proteins display a common architecture sequence motif which was initially described by Bai et al. (1). In addition to the N-terminal F-box motif which binds SKP1, a typical protein-protein interaction domain (e.g. leucine-rich repeats or kelch-repeats) for substrate specific binding to the SCF complex is

localized in the C-terminus (24, 30). The F-box candidate with homology to *A. thaliana* F-box (Acc. no. NM\_126342.3) identified in our study, contains two C-terminal kelch repeats. Kelch domains were initially discovered in *Drosophila melanogaster* (4, 63). In addition, two other P25 interacting proteins identified previously displayed high homology to *A. thaliana* proteins involved in the ubiquitylation process namely another kelch repeat-containing F-box family protein (Acc. no. NM\_102054.3) and one U-box (PUB17) (Acc. no. NM\_102674.3). Recent work identified F-box proteins as one of the largest protein families in plants. In *A. thaliana* model plant, nearly 700 different F-box protein encoding genes have been predicted (30). They connect the ubiquitylation machinery to many cellular processes by regulating the stability of substrate proteins like transcription factors involved in e.g. phytohormone signaling, light signaling and lateral root formation (10, 27, 30). In addition to developmental processes, F-box proteins as part of the E3 ligase complex SCF have been described in several studies to be involved in the plants resistance response to infection with pathogens. Involvements of F-box in the well-characterized defense mechanisms induced by a hypersensitive response (HR), the systemic acquired resistance (SAR) can be exemplified by *A. thaliana*. SON1, an F-box protein involved in targeting SAR regulators to protein degradation (23). In tobacco, the F-box protein ACRE189 is necessary for the plant hypersensitive response to *Cladosporum fulvum* Avr9 (56). In consequence to these two studies and our observation that transient overexpression of P25 interacting sugar beet F-box candidate induced necrosis in *N. benthamiana* leaf tissue, we raised the hypothesis that the F-box candidate might be either involved in the sugar beet resistance against BNYVV or alternatively, represents a target of P25 necessary for viral pathogenicity. The targets of both F-box candidate homologues from *Arabidopsis* have not been identified yet and prediction of putative function remained impossible due to the wide involvement of F-box proteins in different cellular processes.

In this study, the LexA-based YTH P25-F-box interaction was re-investigated with GAL4 transcriptional activation domain in yeast and via an *in vitro* pull-down assay. In addition, YTH interaction studies with plant SCF components were applied to find evidence for the F-box identity of the candidate.

To support the HR hypothesis, transcriptional activation of pathogenesis related protein (PR-proteins) expression following transient expression in *N. benthamiana* was investigated. Full-length homologues from one rhizomania susceptible and two resistant (*Rz1* and *Rz2*) sugar beet homozygous genotypes were isolated and applied for P25 interaction analysis. Finally both conserved functional domains (F-box and kelch) were separated and both tested for their interaction with P25 and for the necrosis induction in agroinfiltrated plants.

## MATERIAL AND METHODS

### Construction of F-box and P25 yeast expression vectors

All cloning procedures and manipulations were performed following standard techniques according to Sambrook et al. (44), applied modifications were otherwise specified. The yeast vector pJG4-5 (MoBiTec) carrying the partial F-box-cDNA-*Rz2* encoding sequence inserted via *EcoRI*-*Xhol* (pJG4-5-F-box-cDNA) was obtained from a P25 YTH screen of a sugar beet (*Rz2*) cDNA library (Thiel and Varrelmann, submitted for publication). RT-PCR from total RNA of healthy sugar beet breeding lines (MS150 susceptible, MS298 *Rz1* resistant, kindly supplied by Syngenta Seeds AB, Långkrona, Sweden and 8T\_0015 kindly supplied by KWS, Einbeck, Germany) with specific oligonucleotides (5'-ATGAATTCTTGGAAAGATCTTCATTGC-3' and 3'-ATCTCGAGTTAGCAGCCC ATTATTGCAC-5') led to amplification products which were cloned into pJG4-5. Resulting plasmids were named pJG4-5-F-box-susc., -*Rz1* and -*Rz2*, respectively. To confirm cDNA-library F-box candidate P25 interaction in GAL4 YTH, F-Box-cDNA and P25 coding sequence were subcloned into plasmid pGAD424 (Clontech) using *EcoRI* and *Sall*. pGBT and pGAD-P25 vectors were described previously (25).

Construction of *Rz2* derived F-box N- and C-terminal deletion mutants, expressing the 187 N-terminal F-box domain-spanning amino acids (aa) and C-terminal 255 aa including the two kelch motifs was carried out as follows. Both 5' 561 nt and 3' 765 nt fragments were amplified with the corresponding full-length primers (see above) together with specific oligonucleotides (5'-low 3'-TATCTCGAGCTAACCGCAAGTGACTCCTTATCC-5' and 3'-up:

5'-ATGAATTCGGTACCGAACCTTTGGTCTTG-3'). Both PCR fragments were cloned into pJG4-5, resulting in pJG4-5-F-box-ΔN and -ΔC respectively. The coding sequence of a P25 variant from an *Rz1* resistance breaking isolate (Imperial Valley, Salinas USA) (35) was PCR amplified and cloned into pEG202 as described (Thiel and Varrelmann, submitted for publication)).

### **Construction of binary vectors for transient *in planta* F-box expression**

All F-box full-length and F-box deletion mutant sequences described above were cloned under control of the CaMV 35S promoter (35S) and pA signal into a binary vector pBin modified for direct subcloning with *Eco*RI and *Xba*I for transient agroexpression in *N. benthamiana* leaf tissue resulting in pBin-F-box-cDNA, -susc., -Rz1, -Rz2, -ΔN and -ΔC.

### **Protein-protein interaction *in vitro* - GST pull-down assay**

Histidine tagged BNYVV B-type P25 was cloned into plasmid pIVEX® 2.3 (In Vitro Expression, Roche) and expressed by a rapid translation system (RTS100; Roche). Flag-P25 was produced in *Sf9* insect cells infected with recombinant Baculovirus. F-box candidate cDNA PCR amplified with specific primers 5'-AAAGGATCCATGGAAAGTCGATTTC-3' and 3'-AAAGAATTCTCAGTCCAAGT CCGTC-3' and the amplicon cloned into pGEX 2TK vector to obtain pGEX-F-box (Pharmacia Biotech) using *Bam*HI and *Eco*RI. *E. coli* BL21-codon Plus (DE3)-RIL strain was used to express the GST fusion proteins (Stratagene). A fresh 5 ml overnight culture of *E. coli* BL21(DE3)RIL carrying pGEX-2TK or pGEX-F-box was added to 50 ml of LB-medium and the cultures were incubated and shaken for 1 h at 37°C for pGEX-2TK and for 1 h at 25°C for pGEX-F-box. Expression of GST or GST-F-box was induced by the addition of 0.2 mM final IPTG for 4 hrs. Cells were harvested by centrifugation at 5,000 g for 10 min at 4°C and resuspended in 5 ml of NET buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol). The cells were disrupted by French Press and the lysates mixed with 60 µl of glutathione-Sepharose 4B beads, previously washed and resuspended in NET buffer, and were incubated overnight at 4°C with gentle shaking. The beads were then washed three times by short

centrifugation and resuspended in 60 µl of NET buffer. 10 µl was analyzed in SDS-PAGE and judged by Coomassie staining. Beads and NET buffer (25 µl) were mixed with 10 µl of *in vitro* translation reaction mixture or flag-P25 protein and the volume completed to 400 µl with BB buffer (50 mM tris-HCL 7.5, 100 mM NaCl), Reaction was first incubated for 1 h at room temperature and then overnight at 4°C with gentle shaking. The beads were then washed three times as described above but using BB buffer, resuspended in 40 µl of dissociation buffer (28), boiled for 10 min and finally pelleted. Aliquots (20 µl) of the supernatants were subjected to 12% SDS-PAGE, and the proteins were immunodetected using specific P25, histidine or flag antibodies.

#### **YTH interaction assay of sugar beet F-box candidate with *A. thaliana* ASK1 andASK2**

*A. thaliana* ASK2 (Acc. no. At5g42190) and ASK1 (Acc. no. At1g10940) were kindly provided by Dr. V. Ziegler-Graff (IBMP).

#### **Sequence analysis**

All inserts in clones were sequence verified using standard primers. Sequencing reactions were carried out by Eurofins MWG Operon, Martinsried or by Malek Alioua (IBMP) using a BigDye Terminator Sequencing kit (Applied Biosystems) and specific primers with a Hitachi 3100 Genetic AnalyzerApplied Biosystems). Sequence alignments with ClustalW algorithms (55) and assembly of full-length F-box cDNA sequences were carried out using DNASTar Lasergene Software (GATC Biotech) *In silico* manipulations of plasmids and primer design were performed with VectorNTI software (Invitrogen). Identification of F-box functional domains was carried out using the “Simple Modular Architecture Research Tool” (SMART 5) (31, 50).

#### **Yeast strains, media and YTH systems**

Two different YTH systems were used in this study. The Grow'n'Glow YTH system (MoBiTec) is a modified version of the LexA/B42 YTH system (9). It consists of pEG202 as bait and pJG4-5 as prey vector (15) and an additional LexA-operator controlled GFP reporter plasmid pGNG1 (7). All yeast

transformations, media preparations and mating procedures were carried out as described (Thiel and Varrelmann, submitted for publication)). Total area optical density analysis of GFP fluorescence was carried out by epifluorescence microscopy of yeast cells carried out Gel-Pro analyser software 6.0 (Media Cybernetics) (Thiel and Varrelmann, submitted for publication).

The GAL4 based YTH system (Clontech) consists of pGAD424 (Clontech) as bait and pGBT9/pGBKT7 as prey plasmids. The YTH procedures were performed by using the Matchmaker two-hybrid system based on the Yeast Protocol Handbook (BD Biosciences Clontech) and also as described (16, 25, 33, 51). HF7c strain was transformed with Gal4BD-p25 fusions (pGBT9, Clontech) and Gal4BD-ASK1 and -ASK2 (pGBKT7) whereas Y187 strain was transformed with bait plasmids (Gal4AD-P25 or -F-box fusions). Mating was used to obtain diploids expressing both fusion proteins. Interactions were identified by the ability of diploids to grow on minimal medium depleted with tryptophan, leucine and histidine and in the presence of x- $\alpha$  gal or of 3-aminotriazole (AT) at 3, 5 or 10 mM. The strength of the yeast interaction was quantified using  $\beta$ -galactosidase liquid culture assay with o-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) as substrate ( $OD_{420}$ ) and displayed as  $\beta$ -galactosidase units as described in Yeast Protocols Handbook of Clontech.

### **Immunodetection of LexA and haemagglutinin (HA) tagged proteins in yeast**

Protein extraction from yeast cells and immunodetection procedure was carried out as described (Thiel and Varrelmann, submitted for publication)) with some modifications. The protein samples were separated by 12 % SDS-PAGE and electroblotted on nitrocellulose (Amersham) for LexA-detection or PVDF (Roche) membranes for HA-detection.

### **Plant material and plant growth conditions**

*N. benthamiana* plants were cultivated in a glasshouse with day length of 14 h at 22°C under continuous artificial light in a mixture of turf and sand (1:1).

**Transient expression following agroinfiltration and particle bombardment of F-box candidates**

Binary vectors were mobilized into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 (pGV2260) and cultures were prepared for agroinfiltration essentially as described (61) with an OD<sub>600</sub> adjusted to 1.0. The DsRed coding sequence (Clontech) under control of 35S and pA (pe35-DsRed, original pDsRed-C1; Clontech) was applied for microprojectile co-bombardment with pBin-F-box-Rz2 and pBin on detached leaves of 4-5 weeks old *N. benthamiana* plants using a particle inflow gun (11). At 3 dpi 5 leaves of each treatment were rated for single epidermal cells displaying DsRed expression using epifluorescence microscopy (Leica DMR, <http://www.leica.com/>) with a DsRed filter (Emitter HQ 620/60, Beamsplitter Q 585 LP, and Exciter HQ 565/30). Dead cells were visualized by the autofluorescence they displayed using a GFP filter (Emitter D 510/40, Beamsplitter 425 DCLP and Exciter D 395/40). Photographs were taken using a Leica DFC camera, DFC300 FX.

**Detection of pathogenesis related protein transcripts**

Total RNA from *N. benthamiana* agroinfiltrated leaf tissue was prepared (RNeasy; Qiagen) and treated with DNase (RQ1; Promega). Primers specific for *N. tabacum* PR-1a (D90196), PR-1b (X05453) and PR-1c (X05454) (39) were applied for RT-PCR amplification of the *N. benthamiana* orthologues. As internal control the constitutively expressed translation elongation factor gene EF1 $\alpha$  (AF120093) was used. Primers and PCR conditions were used according to (64).

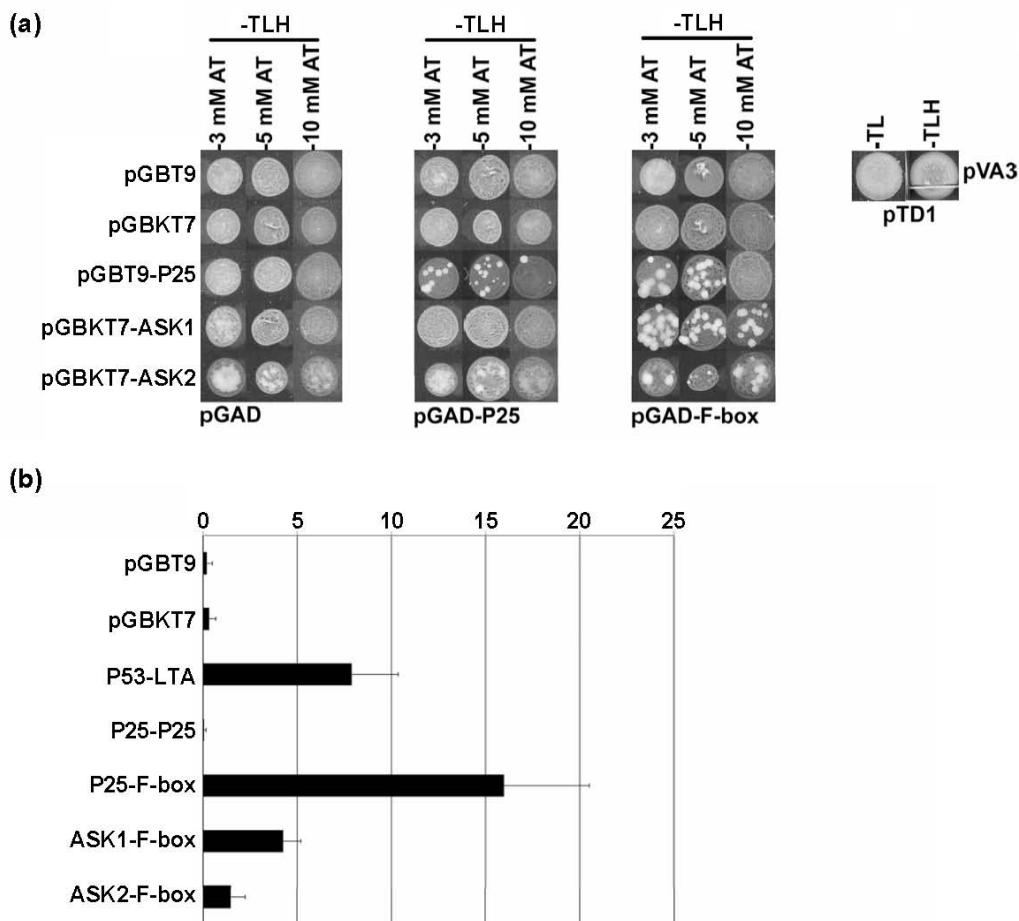
## RESULTS

**Sequence analysis of BNYVV P25 interacting sugar beet Rz2 encoded F-box protein and confirmation of LexA-YTH interaction with GAL4-YTH**

Previously a cDNA clone with 1149 bp in length was identified in a LexA-YTH screen of an Rz2 resistant sugar beet cDNA library among others applying BNYVV P25 (B-type, aa<sup>67-70</sup> AYHR) as a bait (Thiel and Varrelmann, submitted for publication). NCBI Genbank Blastn search revealed high homology (e-value: 1e<sup>-85</sup>, 68% query coverage with 67% maximal identity) to a kelch repeat-

containing F-box family protein from *A. thaliana* (NM\_126342.3) and subsequent amino acid sequence analysis resulted in prediction of two kelch motifs (aa 131 to 174 and 175 to 222) with high significance and one N-terminal F-box domain (aa 37 to 77) with less homology ( $5.45e^{+01}$ ).

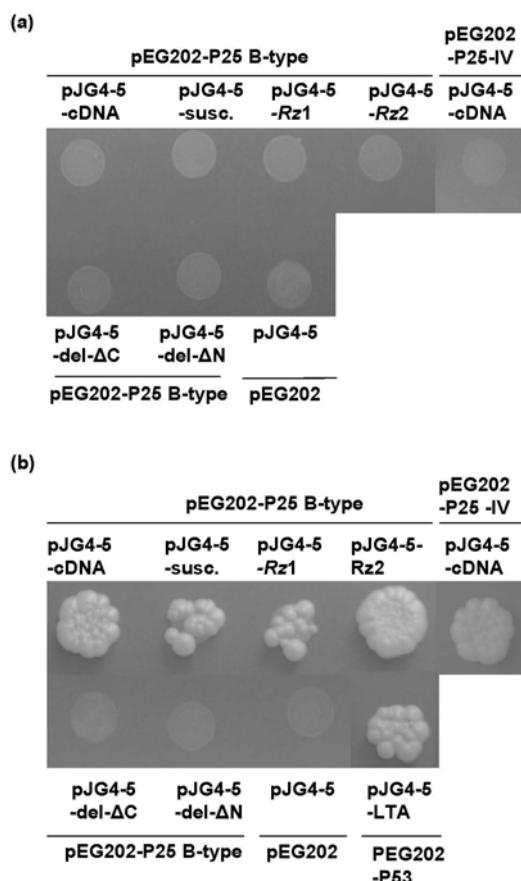
In order to strengthen the significance of the interaction detected in yeast applying LexA-binding domain (-BD) and activation domain (-AD) mediated transcriptional activation of reporter gene expression, GAL4-YTH interaction assay was additionally performed (Fig. 1a). The F-box coding sequence was fused to GAL4-AD (pGAD-F-box) and the interaction challenged with P25 fused to GAL4-BD [pGBT-P25; (25)]. Similar to the results obtained in LexA-YTH (Thiel and Varrelmann, submitted for publication)) no transcriptional autoactivation was induced by both proteins, when empty GAL4-BD vectors (pGBT9 and pGBTKT7) were applied (Fig. 1a, left). The oligomerization of P25 (25) was retrieved (Fig. 1a, middle), as well as the P25-F-box interaction (Fig. 1a, right). Both interactions were detected in the presence of up to 5 mM of the competitive inhibitor (3-aminotriazole; AT) that prevents self-activation of the reporter gene. The GAL4-YTH positive control (Clontech) consisted of the SV40 large T-antigen (LTA) fused to GAL4-AD (pTD1) (32) and murine P53 sequence fused to GAL4-BD (pVA3) (20). Quantification of  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) activity for estimating the strength of the P25-F-box interaction resulted in a mean of 16  $\beta$ -gal Miller units significantly two times higher than the P53-LTA control (Fig. 1b). The oligomerization of the P25 protein that did not give significant activation of the  $\beta$ -gal reporter gene can be explained by the growth of yeasts in interaction non-selective conditions.

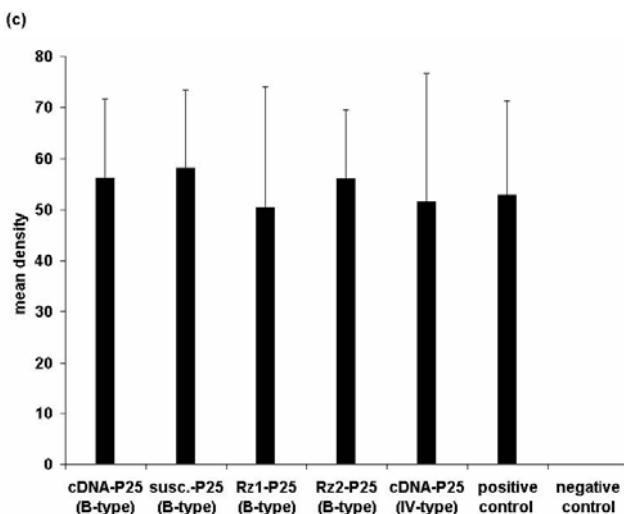


**Figure 1.** (a) GAL4-based yeast two-hybrid (YTH) interaction studies of beet necrotic yellow vein virus P25 (pGAD424- and pGBT9-P25), sugar beet F-box candidate (pGAD424-F-box-cDNA) and *A. thaliana* ASK1 and ASK2 (pGBKT7-ASK1 and -ASK2). YTH interaction assay of the expression constructs of interest with empty vectors (pGBT9, pGBT7 and pGAD424) to test for autoactivation. YTH interaction assay was controlled with P53 (pVA3) and LTA (pTD1) as positive control. YTH was carried out in the presence of 3, 5 and 10 mM 3-aminotriazole (AT) to suppress background growth on selective media lacking amino acids tryptophane, leucine and histidine (-TLH). (b) Quantification of  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) activity in Miller units of yeast diploids expressing the interaction partners grown under interaction-nonsellective condidions in liquid culture assay at 30°C. Assays were performed in triplicate sets with 3 independent cultures for each strain.

**Interaction of BNYVV P25 with sugar beet F-box protein is independent of the P25 amino acid tetrad 67-70 composition**

BNYVV A-type isolates from Imperial Valley (IV) (California, USA) with a special composition of the P25 pathogenicity factor hypervariable amino acid tetrad 67-70 ( $_{67}\text{VLHG}_{70}$ ) compared to the BNYVV B-type derived P25 ( $_{67}\text{ALHG}_{70}$ ) have been shown to produce rhizomania symptoms and increased virus concentrations in resistant sugar beet cultivars (35, 38). We wanted to investigate if P25-F-box interactions are dependent on the P25 hypervariable sequence, which was shown to influence its oligomerization (25). The P25 coding sequence from an Imperial Valley (IV) field isolate was RT-PCR amplified with specific primers from sugar beet roots grown in a soil sample containing the resistant breaking strain BNYVV-IV (kindly provided by Syngenta Seeds AB, Landskrona), cloned (pEG202-P25-IV) and sequenced to confirm the presence of the  $_{67}\text{VLHG}_{70}$  tetrad. Similarly to P25-B ( $_{67}\text{AYHR}_{70}$ ), P25-IV ( $_{67}\text{VLHG}_{70}$ ) i) did not autoactivate transcription in yeast (Fig. 2a) and ii) was able to interact with F-box-cDNA candidate at comparable strength (Fig. 2b and c).





**Figure 2.** LexA-YTH interaction assay of BNYVV P25-B-type and Imperial Valley (-IV) origin with sugar beet F-box proteins (encoded by *Rz2*-cDNA, *Rz1*-, *Rz2*- and susceptible-full-length clones as well as *Rz2* N- and C-terminal deletion mutants). The bait and prey combinations, co-transformed into yeast, were selected on medium containing galactose and lacking -Leu, -Trp, -Ura and -His.

(a) Test for transcriptional autoactivation of the -Leu reporter: pEG202 co-transformed with pJG4-5 expressing F-box variants (pJG4-5-cDNA, -susc., -*Rz1*,

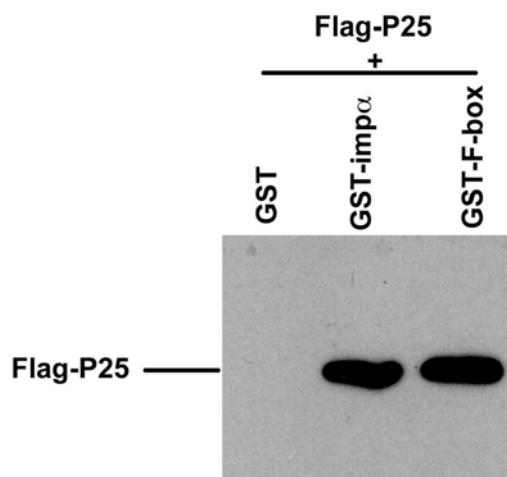
-*Rz2*, - $\Delta$ N, - $\Delta$ C and pJG4-5), (b) Specific interactions of P25 (pEG202-P25-B-type) with different F-box proteins (pJG4-5-cDNA, -susc., -*Rz1*, -*Rz2*, - $\Delta$ N, - $\Delta$ C), P25-IV (pEG202-P25-IV) interaction with pJG4-5-F-box-cDNA, empty vectors pJG4-5 with pEG202 and positive control SV40 LTA (pJG4-5-LTA) with P53 (pEG202-P53).

(c) Relative quantification of Leu-driven GFP fluorescence in yeast cell matings expressing the same P25 and F-box variants as in (a) measured by displaying total area densities.

### Sugar beet cDNA encoded F-box candidate interacts with BNYVV P25 *in vitro*

In order to definitely confirm the F-box P25 interaction, we performed an *in vitro* pull-down assay using GST-tagged F-box expressed in *E. coli*. Wild-type histidine tagged P25 expressed in *E. coli* lysate using a rapid translation system (RTS100, Roche) or Flag-P25 expressed in a baculovirus/insect system were used as probes. As negative and positive controls, we respectively used unfused GST or

GST fused to the Rice importin- $\alpha$  P25 interactor (57). The analysis were conducted and the P25 was similarly immunodetected by the use of either anti-P25, anti-histidine antibodies (data not shown) or Flag antibody only on GST-Imp- $\alpha$  and GST-F-box fusion proteins (Fig. 3) confirming that F-box protein was indeed a partner of the P25 protein.



**Figure 3.** *In vitro* pull-down assays to confirm P25 interaction with F-box. Flag-P25 from Baculovirus-infected *Sf9* cells was incubated with GST alone, GST-importin  $\alpha$  (Rice) and GST-F-box. GST pull-down of P25 was visualized by the detection of the viral protein using flag antibody after immunoblotting. Reactions performed with *in vitro* synthesize histidin-tagged P25 gave identical results (data not shown).

#### The F-box candidate interacts with *A. thaliana* SKP1-related protein (ASK1) and ASK2 in yeast

If the candidate identified would represent an F-box protein, it should physically interact with plant subunits of the SCF complex as shown in different studies applying several F-box proteins (43). *A. thaliana* ASK1 (At1g10940) and ASK2 (At5g42190) fused to GAL4-BD in pGBTKT7-ASK1 and -ASK2 vectors respectively (37) were used for YTH interaction study with the F-box candidate (pGAD-F-box) (Fig. 1a). The absence or a weak transcriptional autoactivation were observed respectively for BD-ASK1 and -ASK2 fusion proteins (Fig. 1a, left). These two components of the SCF complex were not able to interact with P25

(Fig. 1a, middle) but with the F-box even in the presence of 10 mM AT (Fig. 1a, right). The interaction assay, however, revealed a lower strength interaction as compared to the F-box-P25 assay (Fig. 1b) presumably due to the growth of yeast in interaction non-selective medium.

### **P25 interacts with sugar beet full-length F-box from Rz1, Rz2 resistant and susceptible sugar beet breeding lines**

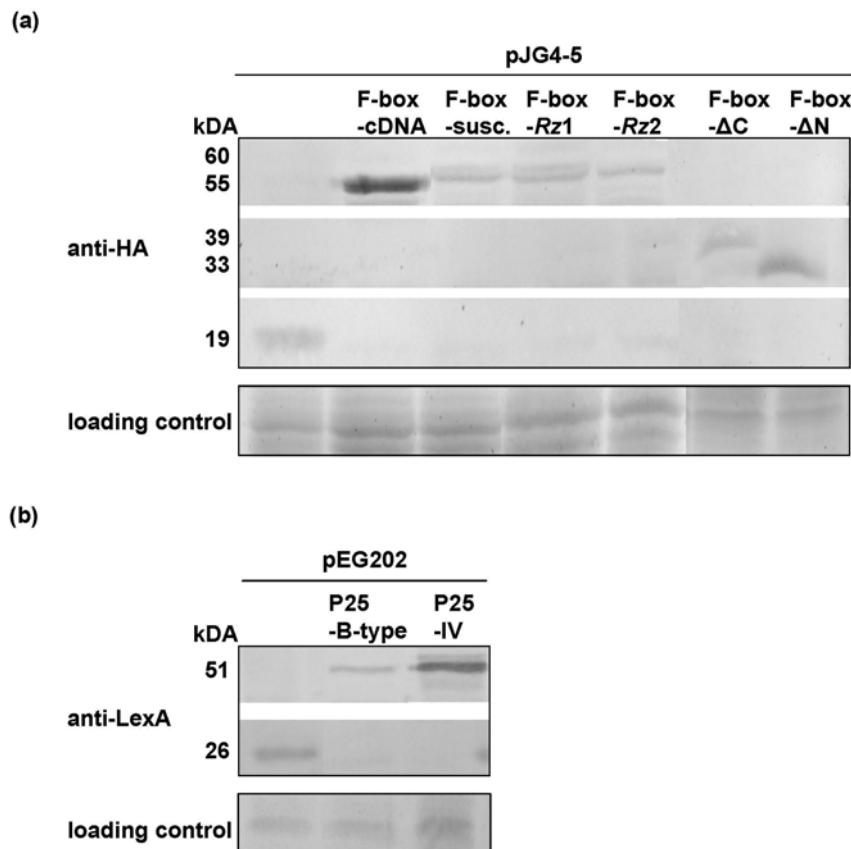
The *Rz2* derived cDNA encoded F-box protein displayed typical conserved domains of F-box proteins (one F-box and two kelch repeats) and a stop-codon, however, its 5'-end sequence was not included in the cDNA clone. The questions remained, if i) interaction could be reproduced with full-length sequences and if ii) BNYVV encoded P25 interacts as well with the F-box proteins from *Rz1* and susceptible sugar beet genotype (if existent). Sequence alignment between sugar beet EST sequence (genotype KWS2320 kindly provided by KWS, Einbeck Germany) and the identified sugar beet cDNA-F-box sequence identified the missing 5'-end of the sequence required to complete the F-box open reading frame (data not shown). The translated full-length protein sequence was 34 N-terminal amino acids longer than the cDNA encoded F-box candidate.

The sequence contig was used for the design of specific primers, which allowed successful RT-PCR amplification of different full-length F-box clones from susceptible and resistant (*Rz1*, *Rz2*) sugar beet homozygous lines. All three PCR fragments were cloned in fusion with B42-AD (pJG4-5-F-box-*Rz1*, -*Rz2*, -susceptible) and sequenced. The F-box open reading frame displayed a length of 1257 bp for all three genotypes.

Sequence comparison of the three full-length clones on amino acid level resulted in the detection of a total of eight exchanges, three aa-exchanges between susceptible and *Rz1*, three aa-exchanges between *Rz1* and *Rz2* and two aa-exchanges between *Rz2* and susceptible (data not shown).

LexA-YTH interaction studies of P25 (pEG202-P25) with F-box-cDNA clone (pJG4-5-F-box) were repeated and carried out with all three full-length clones. Yeast expression (Fig. 4a) as well as physical interaction was confirmed in all three cases (Fig. 2b). Remarkably but unexplained, the expression level of all full-length F-box proteins was much lower than those displayed by the cDNA

encoded incomplete variant. The strength of the P25-F-box interaction was determined indirectly by quantification of the Leu-driven GFP expression relative to a negative (pEG202-P25, pJG4-5) and in comparison to the P53-LTA positive control (pEG202-P53, pJG4-5-LTA). As shown in Fig. 2c, no significant differences in interaction strength were detectable between the different alleles.



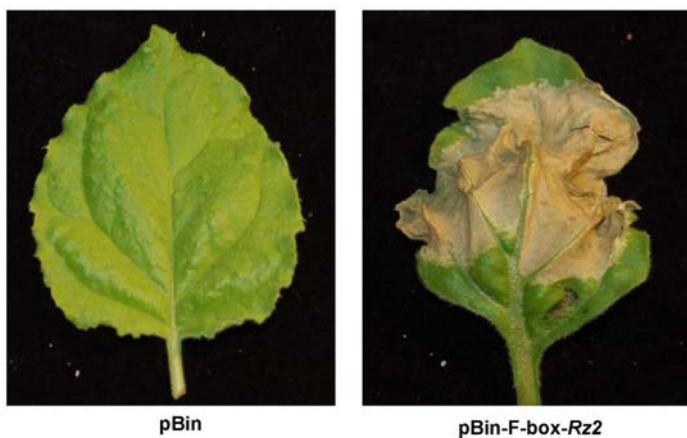
**Figure 4.** Immunodetection of LexA and haemagglutinin (HA) tagged proteins (anti-LexA and -HA). Equal PAGE loading was checked by staining. The molecular weights are declared in kilodalton (kDa) (a) HA immunodetection in yeast total protein extracts expressing pJG4-5-F-box-cDNA, -F-box-susc., -F-box-Rz1, -F-box-Rz2, -F-box-ΔN, -F-box-ΔC. pJG4-5 served as control. (b) LexA immunodetection in yeast total protein extracts expressing pEG202-P25-B-type, -P25-Imperial Valley (IV). pEG202 served as control.

**P25 interacting F-box protein from resistant and susceptible genotypes induce necrosis in *N. benthamiana* leaves**

Previously P25 open reading frame (ORF) and F-box cDNA were cloned into binary vectors for agrobacterium mediated BiFC. When they were used for transient expression in *N. benthamiana* leaf tissue to confirm the yeast interaction *in planta*, the F-box candidate induced necrosis (Thiel and Varrelmann, submitted for publication). Due to the speed by which it occurred, the necrosis resembled a hypersensitive resistance reaction.

To confirm that the F-box candidate alone and not the translational fluorescent marker-F-box fusion was responsible for the observed effect, F-box-cDNA candidate and all three F-box full-length sequences were cloned into binary vector pBin under control of cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and polyadenylation signal (pA) (pBin-F-box, -F-box-susceptible, -F-box-Rz1 and -F-box-Rz2). Subsequent agroinfiltration exactly reproduced a necrotic reaction already starting to develop at 24 hpi in all F-box treatments but not when the empty vector was applied. Fig. 5 shows *N. benthamiana* leaves at 3 dpi following treatment with pBin and pBin-F-box-Rz2. In order to verify if P25 interferes with the induction of necrosis, it was used for co-infiltration with F-box-Rz2, resulting in no visible difference in time of occurrence and severity of the necrotic reaction in comparison to infiltration with F-box-Rz2 alone (data not shown). The F-box agroinfiltration experiment was repeated with leaves of resistant and susceptible sugar beet genotypes, but tissue necrosis was not observed (data not shown). Although agroinfiltration with pBin did not induce the tissue necrosis, the possibility remained that the agroinfection process might have interfered with it. Transient expression via particle bombardment with co-expression of a fluorescent marker was chosen to exclude the possible agrobacterium effect. *N. benthamiana* leaves were used for bombardment with pBin-F-box-Rz2 plus the gene for DsRed (PCR-amplified from pDsRed-C1, Clontech) under control of CaMV 35S and pA (pe35-DsRed) and pBin-F-box-Rz2 alone. pe35-DsRed plus pBin were co-bombarded as positive control. At 3 dpi five leaves of each treatment were analysed under epifluorescence microscopy (FM). Bombardment with F-box alone resulted in detection of 67 single epidermal cells showing autofluorescence induced by necrosis indicative for cell death, while no DsRed

fluorescence was detected. Co-bombardment of F-box plus DsRed resulted in 87 green and 7 red fluorescing cells. In contrast bombardment with DsRed alone led to 131 cells showing red and only 5 cells displaying green fluorescence, demonstrating that i) a high percentage of cells was hit with both plasmids and ii) transient DsRed expression was suppressed when F-box protein was co-expressed. These observations suggested that with or without agrobacteria, the transient expression of sugar beet F-box protein induced cell death in *N. benthamiana* leaf cells.



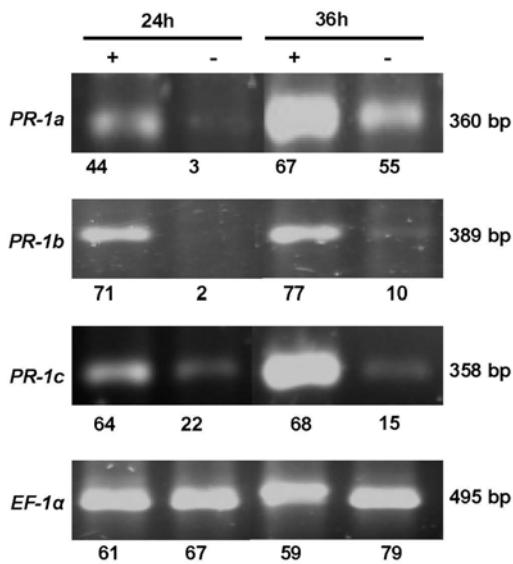
**Figure 5.** Host response of *N. benthamiana* leaf tissue following transient agrobacterium mediated expression of *Rz2* sugar beet F-box protein (pBin-F-box-*Rz2*) at 3 dpi. Agroinfiltration of an empty vector served as control (pBin-empty).

**Transient F-box protein expression induces the accumulation of pathogenesis-related protein transcripts in *N. benthamiana* leaf tissue**

To evidence for a relation of the necrosis rapidly produced by transient F-box expression with cell death induced by a hypersensitive response, we attempted to show the accumulation of PR protein transcripts. To address this issue, *N. benthamiana* leaf tissue was agroinfiltrated with pBin-F-box-*Rz2* and pBin. As no coding sequences from *N. benthamiana* related to PR-proteins are known, specific primers for *N. tabacum* *PR-1a*, *PR-1b* and *PR-1c* genes, known to be closely associated with the hypersensitive resistance response in tobacco, were applied.

At 24 and 36 hpi, total RNA was extracted and used for RT-PCR amplification of *PR-1a*, *PR-1b* and *PR-1c* transcripts with specific primers.

Amplification of constitutively expressed translation elongation factor gene transcripts (EF1 $\alpha$ ) with specific primers served as internal control (Fig. 6). Strongly increased expression levels, relative to tissue infiltrated with pBin, were observed for all three *PR-1a*, *PR-1b*, *PR-1c* transcripts at 24 as well as 36 hpi, suggesting a connection of sugar beet F-box protein with the induction of HR in *N. benthamiana*.



**Figure 6.** Induction of PR-protein gene (*PR-1a*, *PR-1b*, *PR-1c*) expression in *N. benthamiana* leaf tissue agroinfiltrated (+) with F-box-Rz2 (pBin-F-box-Rz2) and control infiltrated (-) with pBin vector was analysed by semi-quantitative RT-PCR after 24 and 36h. RT-PCR amplification of constitutively expressed EF1 $\alpha$  transcripts was set as a quantitative standard. Results were reproduced for two times. Numbers below the gels display total area densities of the different RT-PCR signals.

#### Full-length F-box protein is necessary for BNYVV P25 interaction as well as for cell-death induction in *N. benthamiana* leaf tissue

To find a first indication if P25 interferes with F-box substrate recognition or F-box SCF complex interaction, LexA-YTH studies were performed with N- and C-terminal parts of the Rz2 full-length F-box protein containing the conserved F-box motifs and kelch repeats, respectively. The coding sequence for the N-terminal 187 and C-terminal 255 aa, respectively, were re-amplified with specific primers and cloned into LexA-BD vector (pJG4-5-F-box- $\Delta$ N and - $\Delta$ C). However, in YTH

analysis both deletion variants did not interact with P25 (Fig. 2a and b), despite detectable yeast expression was observed (Fig. 3).

Subsequently we wanted to figure out, if the cell-death induced by the full-length F-box protein can be ascribed to one of the two functional domains of the protein. Therefore, F-box-*Rz2-ΔN* and -*ΔC* were transiently expressed from pBin vectors in *N. benthamiana* leaf tissue, but no cell death was observed for both treatments.

## DISCUSSION

### Current knowledge of P25's role in virus pathogenicity and sugar beet antivirus resistance mechanism

Several lines of evidence established during the last two decades have connected BNYVV RNA3 encoded P25 protein and its aa67-70 tetrad composition to virus pathogenicity in *B. vulgaris* roots (26, 54) and necrosis induction in leaves of *B. maritima* as well as *Tetragonia expansa* (6, 25, 52). In addition both transcriptomic (45) and proteomic (29) studies applying BNYVV infected susceptible sugar beet revealed induction of defense and oxidative stress related genes, fitting to the typically virus-induced root cell necrosis and phytohormone imbalance (40). Taken together the observations strongly suggest a hypersensitive resistance response against virus infection, unable to limit virus spread in susceptible genotypes. Even though, the underlying resistance mechanism mediated by *Rz* major genes has not been resolved yet and the identification of the *Rz*-gene product is currently missing.

### Significance of the P25 F-box interaction

The results of this study show that out of three P25 interacting sugar beet proteins connected to the UPS (Thiel and Varrelmann, submitted for publication)), one F-box candidate indeed represents an F-box protein as proven here via *Arabidopsis* ASK1 and ASK2 interaction and displays predicted F-box and kelch domains. Identified in the *Rz2* sugar beet LexA-YTH based cDNA screen, the P25 F-box interaction belonged to the strongest interactions among the 36 candidates analyzed (Thiel and Varrelmann, submitted for publication). This was supported by the finding that quantification of the interaction strength in the YTH-

Gal4 confirmation test via measurement of yeast  $\beta$ -gal activity resulted in a twofold higher value than the P53-LTA control, which is known to represent already a strong interaction (58). Moreover, the GST pull-down assay precluded the interference of yeast proteins with the interaction.

### **The putative cellular function of the sugar beet F-box protein**

The fortuitous finding of necrosis induction in *N. benthamiana* leaf tissue following transient agrobacterium-mediated F-box expression in BiFC assay suggested an involvement of the protein in the induction of a hypersensitive response. This was supported by the induced expression of PR-protein transcripts (*PR-1a*, *PR-1b* and *PR-1c*). As Tamada (52) and Chiba et al. (6) had observed necrotic lesions in leaves of BNYVV resistant *B. maritima* plants following rub-inoculation thus limiting BNYVV replication and spread, we expected to reproduce the necrosis via agrobacterium mediated overexpression in sugar beet leaf tissue in unnatural high concentrations but failed to do so. A possible explanation is the extraordinary high agrobacterium-mediated expression level in *N. benthamiana* leaf tissue compared to sugar beet, where *A. tumefaciens* transient expression of reporter genes like green fluorescent protein result only in very poor fluorescence (data not shown). The observation, that the separated domains of the F-box (N-terminal F-box and C-terminal kelch repeats) did not induce necrosis are indicative for the targeting of a plant protein (e.g. a transcriptional factor) to the UPS, whose absence allows HR related genes to be expressed only when both domains are available in one protein. Co-expression of both F-box domain and the kelch repeats via transient agroinfection in two separate molecules as well did not lead to induction of necrosis supporting the idea that an unknown F-box target needs to be directed to the UPS to induce HR. Several studies have demonstrated that targets of F-box proteins can represent transcription regulators and their UPS mediated degradation induced gene expression (56). Future studies should apply stable overexpression or RNAi-based knock-out in transgenic sugar beets using full-length and deletion constructs to determine if interference with resistance against BNYVV or the response to infection with other pathogens can be generated.

As the C-terminal kelch-repeat target interaction domain structure is different from those F-box proteins with a known role in HR or SAR (SON1 and ACRE189) and no significant sequence homology was observed, functional homology cannot be deduced. In contrast to kelch repeats, tobacco ACRE189 displays a Leu-rich repeat (56) whereas no distinct interaction domain was predictable at the *A. thaliana*. SON1 C-terminus (23). Secondary YTH sugar beet cDNA library screens might be useful to identify cellular ubiquitylation targets of the F-box identified in this study to unravel the F-box function and prove its possible role as a central component of the HR response in sugar beet.

**Does the observed interaction lead to plant resistance or enables virus pathogenicity?**

With the isolation of F-box full-length alleles, we intended to uncover an *Rz2* resistance specific P25 interaction, pinpointing to a P25 recognition and subsequent resistance reaction induction. Unexpectedly this was not the case. The 34 N-terminal aa extension of the full-length *Rz2* F-box did not significantly interfere with the interaction, although the yeast expression level to unknown reasons was obviously reduced. However, the confirmation of the P25 interaction with independently isolated *Rz1* and susceptible full-length alleles supported the relevance of the interaction detected, rather indicating the F-box protein to represent a target for P25 what might enable the virus to exert a pathogenic influence on the host. Remarkably, cDNA RT-PCR based isolation of full-length sequences from total RNA was performed from healthy non-infected sugar beet seedlings, suggesting a constitutive instead of pathogen inducible expression of this F-box protein. Moreover, the P25 variant from a BNYVV isolate with the ability to generate elevated virus concentration in both *Rz1* and *Rz2* genotypes (35), did not display reduced or missing interaction with the F-box protein. It is widely accepted that the F-box C-terminal kelch-repeat domain is usually responsible for the target binding (5), but a P25 interaction with this domain was not identified, suggesting that P25 targeting for UPS degradation cannot be expected although final evidence was not supplied. All these findings account for a resistance independent interaction and in addition a relation to resistance breaking could be ruled out. On the contrary, the findings support the F-box target

hypothesis and suggest that P25 might interact with F-box to suppress a resistance reaction, which is *Rz*-independent. The finding, however, that P25 F-box transient overexpression in *N. benthamiana* leaves was not reducing or delaying the necrotic reaction is an argument against this, although conclusions are difficult to draw as *N. benthamiana* is a BNYVV host which displays only very mild symptoms and no necrosis or comparable resistance reaction. Sugar beet F-box sequences were passed to all three major sugar beet breeding companies (KWS SAAT AG, Einbeck, Germany; STRUBE-DIECKMANN GmbH & Co. KG, Söllingen, Germany and Syngenta Seeds AB, Landskrona, Sweden) and used for genomic mapping. The F-box gene was mapped to chromosome 5 (data not shown) and therefore can be excluded to represent an *Rz* major gene which has been mapped to chromosome 3 (47).

### The possible role of P25

The findings of this study and our previous observations (Thiel and Varrelmann, submitted for publication) suggest that P25 interferes with the plants UPS at independent positions (two non-related F-box and one U-box protein). Previous work on P25 functional characterisation determined nuclear shuttling abilities (57) and the tendency to form oligomers as well as slight transcriptional activation. In addition the protein contains a Zinc-finger and acidic domain (25). However SMART analysis of the P25 aa sequence did not result in prediction of domains which indicate a relation to the UPS and Gal4-YTH did not identify an interaction with SKP1. To hypothesize a possible P25 function or functional role of the interaction detected, a side glance on other viral proteins which could interfere with the host UPS might be helpful. In general it can be assumed that viruses try to eliminate the stoichiometric imbalance of host target proteins over viral proteins to favour their own multiplication (2). Several viruses developed mechanisms to send the recruited host target proteins for degradation to the 26S proteasome. The silencing suppressor protein P0 of the Poleroviruses contains an F-box motif at the N-terminus (37) and the authors demonstrated that P0 targets a component of the RNA silencing to the SCF-complex. In contrast, the movement protein (MP) of tobacco mosaic virus is degraded following ubiquitylation and Reichel and Beachy (42) suggested that the virus uses the process to control virus movement

via limiting the damaging influence of the MP on the structure of the cortical endoplasmatic reticulum. Remarkably, another potyviral silencing suppressor (HC-Pro) has revealed interactions with plant proteins similar to the P25 partners. Jin et al. (21) detected potato virus Y (PVY) HC-Pro interactions with subunits of the *Arabidopsis* 20S proteasome. Accordingly the P25 YTH cDNA library screen identified another candidate with significant homology to a protein from potato which previously was identified to interact with potato virus A (PVA) HC-Pro, named HC-Pro interacting protein 2 (HIP2) (14). To verify that P25 [in addition to RNA2 encoded P14 (8) and P31 expressed from RNA4 (41)] might possess as well silencing suppressor functions, we performed an agrobacterium mediated transient silencing suppression assay according to Voinnet et al. (60) but did not observe any silencing suppression effect (data not shown).

The ways by which plant virus proteins interfere with the UPS are quite diverse and although few studies exist which show at least some similarities, the final understanding how P25 exerts its function as pathogenicity factor is still missing. Future studies performing functional characterisation of other candidates identified previously (Thiel and Varrelmann, submitted for publication)) will help to finally resolve the sugar beet antivirus resistance mechanism and understand the virus life cycle to develop sustainable control strategies against rhizomania.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research project has been carried out with the financial support of the Federal Ministry of Economics and Technology (BMWi), administered via the Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen e.V. (AiF) and the Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP). K.H. was supported by a Franco-Syrian grant. The authors are grateful to Danielle Scheidecker for technical assistance.

## REFERENCES

1. **Bai, C., P. Sen, K. Hofmann, L. Ma, M. Goebi, J. W. Harper, and S. J. Elledge.** 1996. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*. **86**: 263-274.
2. **Banks, L., P. Pim, and M. Thomas.** 2003. Viruses and the 26S proteasome: hacking into destruction. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 452-459.
3. **Biancardi, E., R. T. Lewellen, M. De Biaggi, A. W. Erichsen, and P. Stevanato.** 2002. The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica*. **127**: 383-397.
4. **Bork, P., and R. F. Doolittle.** 1994. Drosophila Kelch Motif Is Derived from a Common Enzyme Fold. *J. Mol. Biol.* **236**: 1277-1282.
5. **Cardozo, T., and M. Pagano.** 2004. The SCF ubiquitin ligase: Insights into a molecular machine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 739-751.
6. **Chiba, S., M. Miyanishi, I. B. Andika, H. Kondo, and T. Tamada.** 2008. Identification of amino acids of the beet necrotic yellow vein virus p25 protein required for induction of the resistance response in leaves of Beta vulgaris plants. *J. Gen. Virol.* **89**: 1314-1323.
7. **Cormack, R. S., K. Hahlbrock, and I. E. Somssich.** 1998. Isolation of putative plant transcriptional coactivators using a modified two-hybrid system incorporating a GFP reporter gene. *Plant J.* **14**: 685-692.
8. **Dunoyer, P., S. Pfeffer, C. Fritsch, O. Hemmer, O. Voinnet, and K. E. Richards.** 2002. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J.* **29**: 555-567.

9. **Fields, S., and O. K. Song.** 1989. A Novel Genetic System to Detect Protein Protein Interactions. *Nature*. **340**: 245-246.
10. **Gagne, J. M., B. P. Downes, S. H. Shiu, A. M. Durski, and R. D. Vierstra.** 2002. The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **99**: 11519-11524.
11. **Gray, D. J., E. Hiebert, C. M. Lin, M. E. Compton, D. W. Mccolley, R. J. Harrison, and V. P. Gaba.** 1994. Simplified Construction and Performance of a Device for Particle Bombardment. *Plant Cell. Tiss. Org.* **37**: 179-184.
12. **Grimmer, M., S. Trybush, S. Hanley, S. Francis, A. Karp, and M. Asher.** 2007. An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to Beet necrotic yellow vein virus. *Theor. Appl. Genet.* **114**: 1151-1160.
13. **Guo, H. W., and J. R. Ecker.** 2003. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF (EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell*. **115**: 667-677.
14. **Guo, D., C. Spetz, M. Saarma, and J. P. T. Valkonen.** 2003. Two Potato Proteins, Including a Novel RING Finger Protein (HIP1), Interact with the Potyviral Multifunctional Protein HCpro. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**: 405–410.
15. **Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov, and R. Brent.** 1993. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell*. **75**: 791-803.
16. **Haasen, D., C. Kohler, G. Neuhaus, and T. Merkle.** 1999. Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **20**: 695–705.

17. **Heijbroek, W., P. M. S. Musters, and A. H. L. Schoone.** 1999. Variation in pathogenicity and multiplication of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in relation to the resistance of sugar-beet cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* **105:** 397-405.
18. **Hershko, A., and A. Ciechanover** 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67:** 425-479.
19. **Ho, M. S., P. I. Tsai, and C. T. Chien.** 2006. F-box proteins: the key to protein degradation. *J. Biomed. Sci.* **13:** 181-191.
20. **Iwabuchi, K., B. Li, P. Bartel, and S. Fields.** 1993. Use of the 2-Hybrid System to Identify the Domain of P53 Involved in Oligomerization. *Oncogene.* **8:** 1693-1696.
21. **Jin, Y., D. Ma, J. Dong, J. Jin, D. Li, C. Deng, and T. Wang.** 2007. HC-Pro protein of Potato virus Y can interact with three *Arabidopsis* 20S proteasome subunits *in planta*. *J. Virol.* **81:** 12881-12888.
22. **Keskin, B.** 1964. Polymyxa Betae Nsp Ein Parasit in Den Wurzeln Von Beta Vulgaris Tournefort Besonders Wahrend Der Jugendentwicklung Der Zuckerrube. *Archiv Für Mikrobiologie.* **49:** 348-374.
23. **Kim, H. S., and T. P. Delaney.** 2002. *Arabidopsis SON1* is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *Plant Cell.* **14:** 1469-1482.
24. **Kipreos, E. T., and M. Pagano.** 2000. The F-box protein family. *Genome Biol.* **1:** 3002.1-3002.7.

25. **Klein, E., D. Link, A. Schirmer, M. Erhardt, and D. Gilmer.** 2007. Sequence Variation within Beet necrotic yellow vein virus p25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on *Tetragonia expansa*. *Virus Res.* **126**: 53-61.
26. **Koenig, R., W. Jarausch, Y. Li, U. Commandeur, W. Burgermeister, M. Gehrke, and P. Luddecke.** 1991. Effect of Recombinant Beet Necrotic Yellow Vein Virus with Different RNA Compositions on Mechanically Inoculated Sugar-Beets. *J. Gen. Virol.* **72**: 2243-2246.
27. **Kuroda, H., N. Takahashi, H. Shimada, M. Seki, K. Shinozaki, and M. Matsui.** 2002. Classification and expression analysis of *Arabidopsis* F-box-containing protein genes. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1073-1085.
28. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
29. **Larson, R. L., W. M. Wintermantel, A. Hill, L. Fortis, and A. Nunez.** 2008. Proteome changes in sugar beet in response to Beet necrotic yellow vein virus. *Physiol. Mol. Plant P.* **72**: 62-72.
30. **Lechner, E., P. Achard, A. Vansiri, T. Potuschak, and P. Genschik.** 2006. F-box proteins everywhere. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 631-638.
31. **Letunic, I., R. R. Copley, S. Schmidt, F. D. Ciccarelli, T. Doerks, J. Schultz, C. P. Ponting, and P. Bork.** 2004. SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res.* **32**: 142-144.
32. **Li, B., and S. Fields.** 1993. Identification of Mutations in P53 That Affect Its Binding to SV40 Large T-Antigen by Using the Yeast 2-Hybrid System. *FASEB Journal*. **7**: 957-963.

33. **Link, D., L. Schmidlin, A. Schirmer, E. Klein, M. Erhardt, A. Geldreich, O. Lemaire, and D. Gilmer.** 2005. Functional characterization of the Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. *J. Gen. Virol.* **86:** 2115–2125.
34. **Liu, H. Y., and R. T. Lewellen.** 2007. Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of Beet necrotic yellow vein virus in the United States. *Plant Disease.* **91:** 847-851.
35. **Liu, H. Y., J. L. Sears, and R. T. Lewellen.** 2005. Occurrence of resistance-breaking Beet necrotic yellow vein virus of sugar beet. *Plant Disease.* **89:** 464-468.
36. **Luterbacher, M. C., M. J. C. Asher, W. Beyer, G. Mandolino, O. E. Scholten, L. Frese, E. Biancardi, P. Stevanato, W. Mechelke, and O. Slyvchenko.** 2005. Sources of resistance to diseases of sugar beet in related Beta germplasm: II. Soil-borne diseases. *Euphytica.* **141:** 49-63.
37. **Pazhouhandeh, M., M. Dieterle, K. Marrocco, E. Lechner, B. Berry, V. Brault, O. Hemmer, T. Kretsch, K. E. Richards, P. Genschik, and V. Ziegler-Graff.** 2006. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 1994-1999.
38. **Pferdmenges, F., H. Korf, and M. Varrelmann.** 2008. Identification of rhizomania-infected soil in Europe able to overcome Rz1 resistance in sugar beet and comparison with other resistance-breaking soils from different geographic origins. *Eur. J. Plant Pathol.* doi: 10.1007/s10658-008-9388-9.
39. **Pfitzner, U. M., and H. M. Goodman.** 1987. Isolation and characterization of cDNA clones encoding pathogenesis-related proteins from tobacco mosaic virus infected tobacco plants. *Nucleic Acids Res.* **15:** 4449-4465.

40. **Pollini, C. P., and L. Giunchedi.** 1989. Comparative histopathology of sugar beets that are susceptible and partially resistant to rhizomania. *Phytopathol. Mediteran.* **28:**16-21.
41. **Rahim M. D., I. B. Andika, C. Han, H. Kondo, and T. Tamada.** 2007. RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *J. Gen. Virol.* **88:** 1611–1619.
42. **Reichel, C., and R. N. Beachy.** 2000. Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. *J. Virol.* **74:** 3330-3337.
43. **Risseeuw, E. P., T. E. Daskalchuk, T. W. Banks, E. Liu, J. Cotelesage, H. Hellmann, M. Estelle, D. E. Somers, D. E., and W. L. Crosby.** 2003. Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from Arabidopsis. *Plant J.* **34:** 753-767.
44. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
45. **Schmidlin, L., E. de Bruyne, G. Weyens, M. Lefebvre, and D. Gilmer.** 2008. Identification of differentially expressed root genes upon rhizomania disease. *Mol. Plant Pathol.* **9:** 741-51.
46. **Schirmer, A., D. Link, V. Cognat, B. Moury, M. Beuve, A. Meunier, C. Bragard, D. Gilmer, and O. Lemaire.** 2005. Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. *J. Gen. Virol.* **86:** 2897-2911.
47. **Scholten, O. E., T. S. M. De Bock, R. M. Klein-Lankhorst, and W. Lange.** 1999. Inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus in Beta vulgaris conferred by a second gene for resistance. *Theor. Appl. Genet.* **99:** 740-746.

48. **Scholten, O. E., and W. Lange, W.** 2000. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review. *Euphytica*. **112**: 219-231.
49. **Scholten, O. E., H. Paul, D. Peters, J. W .M. Vanlent, and R. W. Goldbach.** 1994. In-Situ Localization of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) in Rootlets of Susceptible and Resistant Beet Plants. *Arch. Virol.* **136**: 349-361.
50. **Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork, and C. P. Ponting.** 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **95**: 5857-5864.
51. **Szurek, B., E. Marois, U. Bonas, and G. Van den Ackerveken.** 2001. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J.* **26**: 523–534.
52. **Tamada, T.** 2007. Susceptibility and resistance of *Beta vulgaris* subsp. *maritima* to foliar rub-inoculation with Beet necrotic yellow vein virus. *J. Gen. Plant Pathol.* **73**: 76-80.
53. **Tamada, T., T. Kusume, H. Uchino, T. Kiguchi, and M. Saito.** 1996. Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA-5 is involved in symptom development of sugar-beet roots. *In: Sherwood, J.L.; Rush, C.M. (Hrsg.). Proc. 3rd Symp. of the Int. Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Dundee (UK)*. 49-52.
54. **Tamada, T., H. Uchino, T. Kusume, and M. Saito.** 1999. RNA 3 deletion mutants of beet necrotic yellow vein virus do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology*. **89**: 1000-1006.

55. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22:** 4673-4680.
56. **van den Burg, H. A., D. I. Tsitsigiannis, O. Rowland, J. Lo, G. Rallapalli, D. Maclean, F. L. Takken, and J. D. Jones.** 2008. The F-box protein ACRE189/ACIF1 regulates cell death and defense responses activated during pathogen recognition in tobacco and tomato. *Plant Cell.* **20:** 697-719.
57. **Vetter, G., J. M. Hily, E. Klein, L. Schmidlin, M. Haas, T. Merkle, and D. Gilmer.** 2004. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein. *J. Gen. Virol.* **85:** 2459-2469.
58. **Veyron-Churlet, R., S. Bigot, O. Guerrini, S. Verdoux, W. Malaga, M. Daffé, and D. Zerbib.** 2005. The Biosynthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis* Relies on Multiple Specialized Elongation Complexes Interconnected by Specific Protein–Protein Interactions *J. Mol. Biol.* **353:** 847–858.
59. **Vierstra, R. D.** 2003. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.* **8:** 135-142.
60. **Voinnet, O., Y. M. Pinto, and D. Baulcombe.** 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96:** 14147–14152.
61. **Voinnet, O., S. Rivas, P. Mestre, and D. Baulcombe.** 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33:** 949-956.
62. **Whitney, E. D.** 1989. Identification, Distribution, and Testing for Resistance to Rhizomania in Beta-Maritima. *Plant Disease.* **73:** 287-290.

63. **Xue, F. Y., and L. Cooley.** 1993. Kelch Encodes a Component of Intercellular Bridges in Drosophila Egg Chambers. *Cell*. **72**: 681-693.
64. **Zhang, Z.-G., Y.-C. Wang, J. Li, R. Ji, G. Shen, S.-C. Wang, X. Zhou, and X.-B. Zheng.** 2004. The role of SA in the hypersensitive response and systemic acquired resistance induced by elicitor PB90 from Phytophthora boehmeriae. *Physiol Mol. Plant P.* **65**: 31-38

## Kapitel 5: Diskussion

### 5.1. Beurteilung des Yeast two-hybrid Systems als Screening-Methode zur Identifizierung von Proteininteraktionen

Zur Charakterisierung des Resistenz-/Pathogenitätsmechanismus des Pathosystems Zuckerrübe-BNYVV konnten, in einem LexA basierenden YTH System, Wirtsproteine identifiziert werden, die mit dem Pathogenitätsfaktor P25 des BNYVV interagieren. Für die Durchführung dieses Protein-Protein-Interaktionsassays wurde aus Gesamt-RNA-Präparationen von Blatt- und Wurzelmaterial einer *Rz2*-resistenten, homozygoten Zuckerrübenlinie eine cDNA Bibliothek erstellt (Vertis Biotechnologie AG, Freising, Anhang). Diese randomisierte, normalisierte cDNA Bibliothek deckt mit ihrer Anzahl von  $1,4 \times 10^6$  unabhängigen Klonen einer durchschnittlichen cDNA-Klonlänge von >0,4 kb unter der Annahme von mindestens 25.000 Genen (Koch, 2006) das Transkriptom der Zuckerrübe ca. 56-fach ab. Ein Vergleich der Parameter „Anzahl von cDNA Klonen“ und „Genomredundanz“ mit anderen pflanzlichen cDNA Bibliotheken (Tabelle 1) bestätigt, dass die in dieser Arbeit aus Zuckerrübe erstellte cDNA Bibliothek eine repräsentative Ressource für die Anwendung im YTH darstellte.

Tabelle 1: Vergleich von cDNA Bibliotheken verschiedener Pflanzen

Pflanze	Anzahl der cDNA Klone	Genom-abdeckung	Referenzen und Studien
<i>A. thaliana</i>	$3 \times 10^6$	113-fach	Piroux <i>et.al.</i> , 2007 van der Biezen und Jones., 1998 Goodin <i>et al.</i> , 2008
<i>N. tabacum</i>	$1,55 \times 10^6$	47-fach	Soellick <i>et al.</i> , 2000 Goodin <i>et al.</i> , 2008
<i>N. benthamiana</i>	$1,2 \times 10^6$	unbekannt	Jiminez <i>et al.</i> , 2006
<i>Oryza sativa</i>	$2 \times 10^6$	53-fach	Zhou <i>et al.</i> , 2007
<i>Solanum tuberosum</i>	$2 \times 10^6$	unbekannt	Guo <i>et al.</i> , 2003

Eine hohe Transkriptomabdeckung in der erstellten Zuckerrüben cDNA Bibliothek ist für erfolgreiche Arbeiten im YTH von großer Bedeutung. Wegen der Expression des cDNA-Klons als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne B42 im Hefevektor muss eine zusätzliche Reduktion der angegebenen

Transkriptomabdeckung berücksichtigt werden. Denn aufgrund der Ligation jeder cDNA in allen drei möglichen Leserastern mit dem Plasmid befindet sich theoretisch nur jeder dritte Klon im korrekten Leserahmen bei der Translatierung von Nukleotidtriplets in Aminosäuren.

Die Durchmusterung der Zuckerrüben cDNA Bank resultierte in ca.  $1 \times 10^6$  Hefekolonien, aus denen 450 potentielle Kandidaten für die weitere Überprüfung selektiert wurden. Um starkes Hintergrundwachstum durch sogenannte Autoaktivierungskandidaten, die die Fähigkeit besitzen, die Transkription der Reportergene selbstständig zu aktivieren, zu verringern, wurde eine Selektionskontrolle auf Festmedium für alle 450 Kandidaten durchgeführt, wie sie auch in anderen Hefesystemen z.B. DupLEX-A (Origene, Rockville) oder MATCHMAKER (Clontech, Terra Bella) angewendet wird. Um die Effizienz für die Ausmusterung der falsch-positiven Interaktionen zu erhöhen, wurde in dieser Arbeit ein zusätzlicher, auf Flüssigmedium basierender Selektionsschritt durchgeführt. Viele potentiell interagierende Kandidaten konnten durch diese weitere Überprüfung kosten- und zeitsparend als falsch-positive Interaktionen selektiert und ausgemustert werden. Dies begründet sich in unterschiedlichen Wachstumsbedingungen von Hefezellen im Fest- bzw. Flüssigmedium. Auf Festmedium kann das Wachstum von Hefezellen in bestimmten Konzentrationen auf bereits absterbenden und toten Hefezellen weiterhin stattfinden. Ein solches Wachstum ist in Flüssigkulturen ausgeschlossen und ermöglicht so einen zuverlässigeren Ausschluss von falsch-positiven Interaktionen. Eine zusätzliche Selektion falsch-positiver Interaktionen besteht in dem Austausch der zu testenden Proteine innerhalb der Hefeektoren, nach der die Interaktion weiterhin detektierbar bleiben sollte (Chien *et al.*, 1991). Eine im „prey“ Plasmid vorliegende, einzelne Restriktionsschnittstelle wird verwendet, um nach einem Restriktionsverdau des Plasmides, die überhängenden Enden aufzufüllen und durch Ligation dieses wieder zusammenzufügen. Damit kommt es zur Verschiebung des offenen Leserahmens. Anschließend sollte als Kontrolle eine Protein-Protein Interaktion nicht mehr möglich sein. Wird doch Wachstum von Hefezellen angeregt, so kann diese nicht durch die Proteinexpression, sondern nur von der in Hefe transkribierten RNA hervorgerufen werden (Bendixen *et al.*, 1994).

Die Durchführung weiterer Kontrollen war im zeitlichen Rahmen der Arbeit nicht realisierbar und aufgrund der hohen Selektionsrate der durchgeführten Ausschlussverfahren nicht erforderlich.

Letztlich wurde bei der in dieser Arbeit durchgeführten Fest- und Flüssigmedien basierten Selektion die Zahl der ursprünglich ausgewählten 450 Kandidaten um 88% auf verbliebene 55 Kandidaten reduziert. In nachfolgenden Einzelinteraktionsprüfungen mit P25 wurden weitere 19 Kandidaten als wahre Interaktionskandidaten des P25 ausgeschlossen. Damit verblieben schlussendlich 36 Kandidaten (Kapitel 3). Die erfolgreiche Identifizierung von Kandidaten bei der Durchmusterung der Zuckerrüben cDNA Bibliothek liegt begründet in der hohen Selektionsrate von falsch-positiven Interaktionen.

In weiterführenden Arbeiten muss geklärt werden, ob die aufgedeckten P25 interagierenden cDNA Kandidaten tatsächlich an der Wirt-Virus Interaktion in der Zuckerrübe beteiligt sind. Bei der Nutzung der aus infizierten Wurzel- und Blattgeweben erstellten cDNA-Bank kann der Fall eintreten, dass Proteine räumlich zusammengebracht werden und miteinander interagieren, deren Interaktion im natürlichen Virus-Wirt Pathosystem aufgrund von Zellkompartimentierung, sowie temporär und räumlich differentieller Expression nicht möglich ist. Des Weiteren sollte eine Überprüfung in einem Hefezellen unabhängigen Protein-Protein Nachweis durchgeführt werden, um die im YTH Screen verwendeten *S. cerevisiae* Wirtszellen als Ko-Faktoren der Interaktion auszuschließen (Causier und Davies, 2002). Dies begründet die Notwendigkeit, die funktionelle Bedeutung von identifizierten Protein-Protein-Interaktionen weiterführend zu charakterisieren.

Auffällig ist, dass kein Kandidat bei der Durchmusterung der cDNA Bibliothek doppelt identifiziert wurde. Eine mögliche Interpretation dessen kann die geringe Anzahl von 450 selektierten Kolonien aus geschätzten  $1 \times 10^6$  Hefetransformanden im YTH Screen sein. Die Überprüfung einer Vielzahl von weiteren cDNA Kandidaten wäre zur Identifikation doppelter bzw. weiterer P25 interagierender Klone eine Möglichkeit gewesen. Dies war aufgrund der zeitaufwendigen Ausschlussarbeiten von falsch-positiven Kandidaten und der erforderlichen Bestätigung von Interaktionen im direkten YTH-Interaktionstest zwischen selektiertem „prey“ und eingesetzten „bait“ P25 nicht realisierbar.

## 5.2. Eignung des "Bimolecular fluorescence complementation assay" zur Interaktionsüberprüfung

Als Ergebnis aus den YTH Untersuchungen konnten 36 positive, mit P25 interagierende Kandidatenproteine selektiert werden. Eine zweite Überprüfung und somit eine Bestätigung der YTH Ergebnisse ist generell unabdingbar. Dazu wurde das BiFC ausgewählt. Dieses *in planta* Protein-Protein-Interaktionssystem kann schnell und einfach durch Nutzung transienter Agroexpression im Blattparenchym von Tabakblättern durchgeführt werden (Walter *et al.*, 2004). Von 36 cDNA Klonen, die als Interaktionspartner des Pathogenitätsfaktors P25 identifiziert wurden, konnten 10 Klone erneut durch rekonstituierte mRFP-Expression im Epifluoreszenz-Mikroskop auf P25 Interaktion bestätigt werden (Kapitel 3, Abb.2). Um die Qualität und Effizienz des BiFC Systems und die damit verbundenen Interaktions- und Proteinexpressionsergebnisse zu bewerten, müssen die Vor- und Nachteile des Systems berücksichtigt werden.

Vergleiche mit den, in der Literatur beschriebenen BiFC Systemen zeigen, dass Unterschiede zwischen diesen und dem in dieser Arbeit neu konstruierten System vorliegen. In dem YFP System von Walter *et al.* (2004) und dem mRFP System von Jach *et al.* (2006) wurden die Kandidaten durch C-terminale Fusionen mit den verwendeten Fluoreszenzmarkerfragmenten verbunden. Dem gegenüber steht das für diese Arbeit neu erstellte System mit N-terminalen Fusionen der Kandidaten an die in Anlehnung an Jach *et al.* (2006) gewählten mRFP Fragmente. Somit kommt es zur Veränderung der Positionierung der in allen drei Systemen gleich verwendeten „tags“ (Haemagglutinin bzw. c-myc), da diese zwischen Kandidatengen und Fluoreszenzmarker positioniert sind. Übereinstimmend standen die Expressionskonstrukte in binären Plasmiden unter CaMV-35S Promotorkontrolle. Ein Grund der im immunologischen Nachweis ausgebliebenen Proteinexpression kann ggf. durch die N-terminalen Fusionen der zu exprimierenden Proteine mit dem notwendigen „tag“ liegen. Eine Kontrolle, um einen Einfluss der Fluoreszenzmarker bzw. der „tag“-Position auszuschließen würde eine Neukonstruktion des Systems bedeuten.

Um jedoch eine komplette, positive Proteininteraktion anhand des Fluorophorsignals beurteilen zu können, sind sowohl Positiv- als auch

Negativkontrollen für Interaktionen Bestandteile des Assays und Voraussetzung für eine korrekte Beurteilung der untersuchten Proteininteraktion (Kerppola, 2006). Bei der in dieser Arbeit verwendeten BiFC–Variante kam es in den Untersuchungen auch in der Negativkontrolle nach fünf bis sechs Tagen zu einer geringen, aber detektierbaren Fluoreszenz. Dieses Zeitfenster zum Nachweis von physikalischen Interaktionen von 2-5 Tagen wurde auch in Arbeiten von Kerppola (2006), Kim *et al.* (2007) und Ohad *et al.* (2007) beobachtet. Deshalb ist der Proteininteraktionsnachweis zeitlich nach einer auftretenden Fluoreszenz der Negativkontrolle für alle durchgeführten Versuchsvarianten ab diesem Zeitpunkt zu vernachlässigen.

Ein weiterer Punkt ist die Intensität der Proteininteraktion. Sowohl an den detektierten Signalen im immunologischen Nachweis, als auch an der Fluoreszenzstärke im Mikroskop zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den mit P25 interagierenden cDNA Kandidaten (Kapitel 3, Abb. 2). Dabei sollten die Expressionsstärken von den zu testenden Interaktionen im BiFC System beobachtet werden, um mögliche falsch-positive Interaktionen ausschließen zu können (Bhat *et al.*, 2006; Kerppola, 2008). Zur Überprüfung dieser sollte eine Kontrolle bei jeder Protein-Protein Interaktion mitgeführt werden, die eine solche Autoaktivierung des Systems sicher erkennen lässt. Der auf Interaktion zu testende Kandidat wird mit einem Protein, mit dem eine Interaktion nicht möglich ist, im BiFC System überprüft. Sollte es zu einer Fluoreszenz kommen, ist davon auszugehen, dass es sich um einen falsch-positiven Kandidaten handelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb jeder im BiFC zu prüfende Kandidat mit dem Protein GUS der Positivkontrolle auf Interaktion getestet (Kapitel 3).

Ein niedriges Expressionslevel ist mutmaßlich in schwach oder nicht leuchtenden Interaktionen begründet und kann damit die Ursache für fehlende Signale im immunologischen Nachweis sein. Sind die Bedingungen für die Protein-Protein Interaktion gegeben, so lässt sich vermuten, dass eine Interaktion zwischen P25 und dem cDNA Klon bereits nach wenigen Stunden erfolgt, die aufgrund der langsameren Rekonstitution des Fluorophors mit einer zeitlichen Verzögerung von einigen Stunden bis Tagen im Mikroskop detektierbar wird (Hu *et al.*, 2002; Bhat *et al.*, 2006; Barnard *et al.*, 2007).

Wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist das BiFC System ein leicht anwendbarer Protein-Protein Interaktionsnachweis, das in lebenden Zellen ohne den Einsatz von externen Färbemethoden durchgeführt und innerhalb eines Tages ausgewertet werden kann (Hu *et al.*, 2002; Kerppola, 2006; Kim *et al.*, 2007). Dennoch ist in dieser Studie nicht feststellbar, ob die nicht nachweisbaren Interaktionen aufgrund eines (i) zu niedrigen Expressionsniveaus kaum oder nicht detektierbar waren, (ii) einer Inkompatibilität zwischen Protein und verwendetem Pflanzengewebe vorlag oder (iii) ein negativer Effekt durch die verwendeten *A. tumefaciens* Bakterien eingetreten ist. Um eventuelle falsch-positive Hefeinteraktionen zwischen P25 und den cDNA Kandidaten wirklich ausschließen zu können, sind weitere Untersuchungen mit einem anderen Protein-Protein Interaktionssystem, z.B. *in vitro* „GST-pull-down“, wie im Fall des F-box Kandidaten angewandt, unumgänglich.

### **5.3. Screening des zweiten (viralen) Pathogenitätsfaktors P26 des BNYVV**

In Ergänzung zu den in den Kapiteln 2-4 dargestellten Arbeiten, wurde eine weitere Durchmusterung der erstellten cDNA Bibliothek vorgenommen. Dafür wurde das Protein P26, welches als zusätzlicher Pathogenitätsfaktor kodierend auf der RNA5 im P-Typ beschrieben und für eine verstärkte Symptomsausprägung bzw. Aggressivität verantwortlich ist, als „bait“ verwendet (Koenig *et al.*, 1997; Heijbroek *et al.*, 1999; Link *et al.*, 2005). Aufgrund eines vermuteten Synergismus zwischen P25 und P26 (Tamada *et al.*, 1996; Link *et al.*, 2005), sowie einer vorhandenen Sequenzhomologie des Aminosäuremotivs 'FRGPGN' (Koenig *et al.*, 1997), sollten die Ergebnisse weitere Rückschlüsse zu dem durchgeführten P25 cDNA Bibliotheksscreen ermöglichen. Die Zielstellung dieser Untersuchung war in Anlehnung an die erfolgreiche Identifizierung von Proteininteraktionen zwischen P25 und Zuckerrübenproteinen die Identifizierung von P26 interagierenden Zuckerrübenproteinen. Daraus sollte ein detaillierteres Verständnis des Zuckerrübe-BNYVV-Pathosystems ermöglicht werden, in dem ähnliche und ggf. weitere Zuckerrübenproteine, die funktionell mit dem Pathogenitätsmechanismus in Zusammenhang gebracht werden können, identifiziert werden. Für die

Anwendung des P26 wurde zunächst die Autoaktivierung des Proteins überprüft und eine eindeutige Transkriptionsaktivierung von Auxotrophiemarker und Reportergen in dem in dieser Arbeit verwendeten LexA basierenden YTH System detektiert. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen aus Untersuchungen in einem Gal4 basierenden System überein (Link *et al.*, 2005). Die Autoren wiesen die transkriptionsaktivierende Domäne in den ersten 55 Aminosäuren des P26 Proteins nach. Durch Alanininsertionsmutagenese des P26 wurden verschiedene Modifikationen des Proteins im N-terminalen Bereich hergestellt (Link *et al.*, 2005). Die von den Autoren zur Verfügung gestellten P26 Mutanten zeigten nach Alanininsertion sowohl im „yeast one-hybrid“ als auch im LexA basierenden YTH System keine Autoaktivierung, waren aber weiterhin in der Lage entsprechend dem Wildtyp nekrotische Läsionen mittels Blattinokulation von *C. quinoa* zu erzeugen. Des Weiteren wurde die subzelluläre Lokalisation der Mutanten untersucht. Der Wildtyp ist vornehmlich im Zellkern der *C. quinoa* Zellen zu finden. Zwei der verwendeten Kandidatenproteine entsprechen dabei dem Verhalten des P26 Wildtypes und wurden ebenfalls überwiegend im Zellkern detektiert. Die dritte P26 Mutante ist in ihrer Zellkernlokalisation durch die Mutation beeinflusst worden und wurde dementsprechend überwiegend im Cytoplasma nachgewiesen. Diese drei P26 Mutanten wurden für die Durchmusterung der cDNA Bibliothek ausgewählt. Nach mehrmaliger Durchführung der cDNA Bibliothek-Durchmusterung mit allen drei P26 Mutanten konnte kein Hefewachstum und somit keine P26 Interaktion als Ergebnis festgehalten werden. Ein Screening der cDNA Bank mit P25 als Positivkontrolle wurde parallel erfolgreich mitgeführt und ließ darüber methodische Fehler ausschließen. Die Ergebnisse aus der Protein-Protein Interaktion von P26 Mutanten mit der Zuckerrüben cDNA Bibliothek zeigten, dass durch die Herstellung von Alanin inserierten P26 Mutationen die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Proteinen beeinträchtigt ist. Aufgrund der für P26 postulierten Funktion als Pathogenitätsfaktor war eine dem Ergebnis der P25 Bibliotheksdurchmusterung ähnliche Identifizierung von Zuckerrübenproteinen, die mit P26 interagieren zu erwarten. Das Ausbleiben von Proteininteraktionen zwischen dem viralen P26 und der Zuckerrübenbibliothek lässt den Rückschluss zu, das durch die Verwendung von P26-Mutanten, die in ihrer Funktion als Transkriptionsaktivatoren verhindert

waren, eine essentielle Funktion des P26 deletiert war und damit die Fähigkeit zur Proteininteraktion beeinträchtigt wurde. Das YTH System ist jedoch für den gezielten Nachweis des Ausbleibens einer Interaktion ungeeignet. Um sicherzugehen, dass eine Interaktion mit den P26 Mutanten grundsätzlich ausgeschlossen ist, muss dieses Ergebnis durch ein weiteres, alternatives Protein-Protein Interaktionssystem bestätigt werden.

#### **5.4. Eine Beteiligung des F-box Kandidaten an der Virusresistenz?**

Resistenzmechanismen gegenüber Pflanzenviren werden verschiedenen Klassen zugeordnet. Diese Mechanismen sind bislang nur teilweise bekannt und werden in der Literatur durch verschiedene Modelle beschrieben. Der mit am besten charakterisierte Resistenzmechanismus basiert auf dem „RNA silencing“, welches einer nukleinsäurebasierten, pflanzeneigenen "Immunreaktion" entspricht. Auslöser dieses Reaktionsmechanismus ist die Bildung doppelsträngiger RNA (dsRNA) Moleküle (Baulcombe 2004; Filipowicz *et al.*, 2005), die u.a. bei der Virusreplikation von RNA-Viren temporär vorliegen und eine sequenzspezifische Degradation der viralen Nukleinsäure in Pflanzen induzieren kann. Im Gegenzug haben Pflanzenviren eine Abwehrstrategie entwickelt durch die Kodierung von „RNA silencing suppressor“ Proteinen (Silhavy und Burgyan, 2004; Voinnet, 2005). Diese werden durch wahrscheinlich jedes Virus mit unterschiedlicher Funktion und Effektivität kodiert (Moissiard und Voinnet, 2004). Charakterisiert wurden z.B. "silencing suppressor" Proteinfunktionen bei P0 des beet western yellows virus (Pfeffer *et al.*, 2002), HC-Pro des tobacco etch virus (Anadalakshmi *et al.*, 1998), 16K des tobacco rattle virus (Liu *et al.*, 2002), wie auch dem Hüllprotein CP des turnip crinkle virus (Qu *et al.*, 2003). Eine Funktion als „silencing suppressor“ ließ sich P25 nicht zuschreiben. Die BNYVV Proteine, P14 der RNA2 (Dunoyer *et al.*, 2002) und P31 der RNA4 (Rahim *et al.*, 2007), konnten bereits als solche identifiziert werden. Ein im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich nach Voinnet *et al.* (1999) durchgeföhrter Agrobakterium vermittelter „silencing suppression assay“ schloss P25 als dritten „silencing suppressor“ aus (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Gen-für-Gen Hypothese (Flor, 1971) beschreibt einen weiteren Resistenzmechanismus. Dieser basiert auf der Wechselwirkung des pflanzlichen Resistenzgens (*R*) mit dem korrespondierenden Avirulenzgen (*Avr*) des Pathogens. Identifizierte *R*-Gene wurden in Klassen gruppiert, wobei die größte charakterisiert ist durch in Verbindung auftretende "nucleotide-binding site" (NBS) und "leucine rich-repeat" (LLR) Motive (Hammond-Kosack und Jones, 1997; Martin *et al.*, 2003). Das wohl bekannteste Beispiel für eine monogen vermittelte *R*-Gen Resistenzreaktion ist das *N*-Gen aus *Nicotiana glutinosa*, welches in Tabak Resistenz gegen das tobacco mosaic virus (TMV) verleiht (Holmes, 1938) durch Auslösung einer Hypersensitiven Reaktion (HR). Durch die HR, wird die Möglichkeit des Virus für Replikation und Ausbreitung eingegrenzt, d.h. auf die Zellen um den Bereich der Lokalläsionen beschränkt (Hammond-Kosack und Jones, 1997; McDowell und Woffenden, 2003). Ebenfalls zu den *R*-Gen vermittelten Resistzenzen zählend, ist die Extreme Reaktion (ER). Bei dieser Resistenz wird angenommen, dass das Virus durch seine nach Infektion der Zelle beginnenden Replikation erkannt wird. Die dadurch aktivierte pflanzliche Abwehrreaktion führt dazu, dass das Virus direkt in dem infizierten Zellbereich an seiner Replikation und der damit verbundenen Ausbreitung gehindert und somit abgetötet wird. Die *R*-Gene *Rx1* und *Rx2* (Ritter *et al.*, 1991), die nach einem noch immer ungeklärten Mechanismus eine extreme Resistenz gegenüber des potato virus X (PVX) erzeugen können, stellen ein Beispiel für ER dar (Bendahmane *et al.*, 1997; Bendahmane *et al.*, 1999,).

Neben den dominanten *R*-Genen sind auch rezessive *r*-Gene identifiziert worden. Diese rezessiven Resistenzgene beinhalten Defekte, die zelluläre Prozesse einschränken und die viralen Funktionen „Replikation“ und „Zell-zu-Zell Transport“ entscheidend beeinträchtigen. Diese Form der Resistenz ist z.B. für die Interaktion des am 5'-Ende der Potyviralen RNA befindlichen Protein VPg ("virus protein, genome linked") mit dem "translational initiation factor" des Wirtes beschrieben worden. "translational initiation factor" *eIF4E* als natürlich vorkommendes Resistenzgen wurde z.B. dem *sbm1* gegen pea seed-borne mosaic virus in Erbse (Gao *et al.*, 2004) oder auch *pvr1* gegen tobacco etch virus in Paprika (Ruffel *et al.*, 2002) nachgewiesen.

Eine Resistenz, die sowohl durch ein dominantes, als auch rezessive Resistenzgene kontrolliert wird, liegt unter anderem beim bean common mosaic virus (BCMV) vor (Drijthout, 1978). Das dabei in *Phaseolus vulgaris* identifizierte dominante I-Gen (Ali, 1950) konnte zusätzlich bei mehr als neun verschiedenen Potyviren identifiziert werden (Fischer und Kyle, 1994). Diese Resistenz gegen BCMV basiert dabei neben dem I-Gen zusätzlich auf rezessiven Genen, die im Wirtsgenom verteilt vorliegen. Die Stärke der Resistenz variiert in Abhängigkeit des Virusstammes, der Umweltbedingungen und kann durch einen Gen-Dosis-Effekt verändert werden. Die Symptome können deshalb in verschiedenen Stärken von ER über systemische Nekrosen bis hin zum Zelltod auftreten (Collmer *et al.*, 2000).

Van der Biezen und Jones (1998) formulierten die „Guard-Hypothese“. Sie besagt, dass die Aktivierung einer Resistenzreaktion durch ein *R*-Gen möglich ist, wenn dieses zusätzlich mit einem weiteren Pflanzenprotein interagiert, welches wiederum mit dem *Avr*-Gen des Pathogens interagiert. Nach diesem Modell kommt es nicht zu einer direkten physikalischen Interaktion zwischen *R* und *Avr* Protein (McDowell und Woffenden, 2003). Untersuchungen im Rahmen eines YTH Screens mit dem Hüllprotein (CP) des turnip crinkle virus (TCV) als "bait" Protein identifizierten ein TCV-interagierendes Protein (TIP) aus *A. thaliana* (Ren *et al.*, 2000). Die *HRT*-vermittelte Resistenz in *A. thaliana* wurde nur beobachtet, wenn TIP und CP-TCV vorlagen und entspräche damit dem Modell der „Guard-Hypothese“.

Der F-box Kandidat, der durch den YTH Screen als Interaktionspartner des Pathogenitätsfaktors P25 identifiziert und in Kapitel 4 detailliert charakterisiert wurde, stellt ein mögliches an der BNYVV Resistenz in Zuckerrübe beteiligtes Protein dar. Dieses F-box Protein induziert sowohl als cDNA-, als auch als Voll-Längen-Klon eine HR nach transiente Agroexpression in *N. benthamiana* Blattparenchymzellen. Voll-Längen-Klone des F-box Proteins aus zwei resistenten (*Rz1* und *Rz2*), sowie einer anfälligen, homozygoten Zuckerrübenlinie zeigten eine P25 Interaktion. Auch durch den Austausch des B-Typs gegen den aggressiveren kalifornischen BNYVV IV-Typ war kein Unterschied in der Hefeinteraktion festzustellen. Aufgrund der Zelltodreaktion war eine Interaktionsüberprüfung im BiFC nicht möglich und wurde deshalb zum einem in einem Gal4-basierenden

YTH und zum anderen im „*in vitro* GST-pull-down“ als wahre Interaktion bestätigt. Um die hochsignifikante Sequenzhomologie zum „kelch repeat-containing F-box family protein“ aus *A. thaliana* zu verifizieren, wurden Interaktionsstudien mit F-box interagierenden Proteinen durchgeführt. F-box ist ein Protein des aus SKP1, Cullin1 und F-box bestehenden SCF-Komplexes, welcher Bestandteil der Ubiquitinierung und somit der Zelldegradation am 26S Proteasom ist. Das im SCF-Komplex vorliegende F-box Protein wurde auf seine Interaktion im Gal4-basierenden YTH mit homologen SKP1 Proteinen aus *A. thaliana* ASK1 und ASK2 erfolgreich durchgeführt. Somit ist es sicher, dass der identifizierte F-box Kandidat am Ubiquitin-Proteasom System beteiligt ist. Diesbezüglich stellt sich die Frage, ob die Interaktion zwischen F-box und P25 an der BNYVV Resistenz beteiligt und in wie weit mit den zuvor vorgestellten Resistenzmechanismen vereinbar ist. Soosaar *et al.* (2005) beschreiben den Mechanismus der Ubiquitin-vermittelten Proteinidegradation am 26S Proteasom als Resistenzmöglichkeit. Beispiele für F-box Proteine, die am Resistenzmechanismus z.B. an der Auslösung einer HR oder in der systemisch erworbene Resistenz (SAR) beteiligt sind, wurden in der Literatur beschrieben. Dazu zählt SON1 aus *A. thaliana*, das als F-box Protein SAR regulierende Proteine für den Proteinabbau rekrutiert (Kim und Delaney, 2002), wie auch das ACRE189 aus Tabak, welches für die Auslösung einer *Avr9* vermittelten HR gegen *Cladosporum fulvum* notwendig ist und in transgenen Tabakpflanzen identifiziert wurde (van den Burg *et al.*, 2008).

Zusätzlich wurden in Kapitel 4 virale F-box Proteine, sowie durch das F-box rekrutierte Virusproteine für die Proteinidegradation beschrieben und diskutiert. Die beobachtete HR in *N. benthamiana*, welche durch F-box induziert wurde, ist durch den Nachweis der Expression von „pathogenesis related“ (PR) Proteinen bestätigt worden.

Die Möglichkeit, dass es sich bei den in diesem Kapitel diskutierten F-box-P25 Interaktionen um eine rezessive Resistenzreaktion handelt, ist weitestgehend ausgeschlossen, da bei diesem Mechanismus die Virustranslation verhindert wird. Für BNYVV wurde beschrieben, dass die für das Virus lebensnotwendigen Funktionen (sogenannte "house keeping functions") auf RNA 1 und 2 kodiert werden (Kapitel 2). Daher ist es naheliegender, dass es sich um eine

unvollständige Resistenz handeln könnte. Für BNYVV ist bekannt, dass in resistenten Zuckerrübengenotypen zum einen ein monogenes *Rz*-Gen, sowie zum anderen mehrere Minorgene vorliegen. Das Auftreten eines aggressiven BNYVV Isolates, das im Imperial Valley, USA entdeckt wurde (Liu *et al.*, 2005, Liu und Lewellen, 2007) führte zur Resistenzüberwindung einer *Rz1* resistenten Sorte und könnte für eine solche Resistenz Hinweis gebend sein. In diesem Zusammenhang ist es denkbar, dass die Aminosäuretrade as60-67 (Kapitel 1.2.3. und Kapitel 2), die im amerikanischen Isolat in veränderter Komposition identifiziert und charakterisiert wurde (Acosta-Leal *et al.*, 2008) zu einer verstärkten Expression des P25 führte und somit zur Überwindung der *Rz1* Resistenz führt. Diese Hypothese würde einen Rückschluss auf einen Gen-Dosis-Effekt in diesem Zusammenhang zu lassen.

Das Resistenzmodell der Gen-für-Gen Hypothese, welches sich bei vielen pflanzenviralen Infektionen mit einer HR als Symptom äußert, ist z.T. auf die Interaktion BNYVV-Zuckerrübe übertragbar. In der Literatur wurden nekrotische Läsionen in BNYVV resistenten Wildrügen beschrieben, die durch mechanische Blattinokulation hervorgerufen wurden und die Virusreplikation und somit die BNYVV Ausbreitung stark einschränken (Tamada, 2007; Chiba *et al.*, 2008). Des Weiteren könnten auch die in Kapitel 1 und 2 beschriebenen Verbräunungen der Leitbahnen im Rübenkörper nach Virusbefall einen Hinweis auf eine auftretende Abwehrreaktion sein. Die Interaktion von P25-F-box ist aufgrund der in Tabak beschriebenen HR ein Hinweis auf diesen Resistenzmechanismus. Die Domänenanalyse auf Aminosäureebene identifizierte im untersuchten F-box Protein mindestens eine F-box Domäne sowie eine „kelch-repeat“ Domäne. Dabei ist es sicher, dass die am C-Terminus befindliche „kelch-repeat“ Domäne für die Bindung der abzubauenden Zielproteine verantwortlich ist (Cardozo und Pagano, 2004). Durch die Herstellung von F-box Deletionsklonen, die N- bzw. C-terminale Deletionen trugen, konnte ausgeschlossen werden, dass P25 mit der Zielprotein-rekrutierenden Domäne interagiert und somit wahrscheinlich nicht vom F-box zum Proteinabbau geführt wird. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit der Annahme einer Funktion als *R*-Gen für das F-box im Sinne einer Gen-für-Gen Wechselwirkung zwischen F-box und P25. Auch die Amplifizierung von F-box, sowohl aus anfälligen, wie auch resistenten Zuckerrübenlinien und eines nicht

nachweisbaren Nukleotidsequenzpolymorphismus zwischen Amplifikaten resistenter und anfälliger Linien, der einen funktionellen Polymorphismus ermöglichen könnte, widerspricht der Gen-für-Gen Hypothese, da funktionelle *R*-Gene nur in resistenten Pflanzen vorliegen. Somit kann vermutet werden, dass der Mechanismus einer monogenen dominanten *R*-Gen vermittelten Resistenz im Sinne der Gen-für-Gen Hypothese für BNYVV nicht in Frage kommt und weitere Faktoren am Resistenzmechanismus beteiligt sein müssen.

Sicher gesagt werden kann, dass es sich bei F-box nicht um ein *Rz*-Gen handelt, da dieses bei Kartierungsarbeiten durch die Zuckerrübenzüchter (KWS SAAT AG, Einbeck; STRUBE-DIECKMANN GmbH & Co. KG, Söllingen und Syngenta Seeds AB, Landskrona) auf Chromosom 5 lokalisiert wurde. Es ist aber nicht auszuschließen, dass F-box in Form eines Minorgens (Biancardi *et al.*, 2002) eine Funktion in der BNYVV Resistenzreaktion einnimmt. Die Schwierigkeit *Rz*-Gene zu amplifizieren, zeigten auch die Arbeiten von Lein *et al.* (2007). Die Autoren versuchten durch die Nutzung von „resistance gene analoges“ (RGA) als Marker und passenden spezifischen Primern aus Zuckerrübe den *Rz1* Resistenz Locus genauer zu identifizieren. RGAs sind hoch konservierte Sequenzen, die NBS und LRR Motive beinhalten und somit hohe Homologie zu *R*-Genen zeigen. Dabei war es möglich eine Anhäufung von RGAs in direkter Nähe zu *Rz1* zu identifizieren. Der *Rz1* Locus blieb dabei weiterhin unbekannt.

Zu dem in diesem Kapitel 5.5. beschriebenen F-box Protein wurden ein zweites „kelch-repeat“ F-box Protein, sowie ein U-box Protein im YTH Screen identifiziert. Die zwei F-box und das U-box Protein fungieren als E3 Ligase oder als Teil einer solchen. Die wiederholte Identifizierung von 26S-Proteasom-beteiligten Proteinen stärkt die Hypothese der Beteiligung der Ubiquitinierung am P25-Wirkmechanismus.

Als möglicher Resistenzmechanismus mit Beteiligung des F-box verbleibt die „Guard“-Hypothese. Dabei stehen verschiedene Interpretationsmöglichkeiten zur Verfügung. Zum einen könnte das *Rz*-Gen als „guard“ sich das F-box als „guard“ nutzbar machen und es somit nach P25 Interaktion zur Abwehrreaktion der Zuckerrübe kommen. Das setzt allerdings voraus, dass F-box eine direkte Interaktion mit dem *Rz* eingeht. Eine Untersuchung dieser Interaktion steht noch aus und sollte in nachfolgenden Arbeiten bestätigt werden. Alternativ dazu könnte

das *Rz*-Gen mit einem bisher noch unbekannten Protein als „guardee“ interagieren, welches für die P25 Interaktion das identifizierte F-box Protein benötigt.

Denkbar wäre auch die P25-F-box-Interaktion zugunsten des Virus. In diesem Fall würde P25 eine Resistenzreaktion unterdrücken, indem es eine Interaktion mit F-box eingeht, um zu unterbinden, dass HR-beteiligte Gene, die vom F-Box zum Zwecke der Auslösung einer HR rekrutiert werden, dem 26S-Proteasom zugeführt werden. Um den Einfluss des F-box auf P25 und damit den Pathogenitätsmechanismus besser zu charakterisieren, sind weitere Analysen des F-box Proteins zukünftig unbedingt erforderlich.

## **5.5. Möglichkeiten für die weitere Charakterisierung von P25 interagierenden cDNA Kandidaten**

Die Ergebnisse der vorgestellten Durchmusterung der cDNA Bibliothek erstellt aus einer BNYVV infizierten, resistenten Zuckerrübenlinie mit dem Pathogenitätsfaktor P25 des BNYVV basieren auf Interaktionen von Proteinen. Arbeiten die aus der Literatur zur Diskussion dieser Ergebnisse herangezogen wurden, dienen dabei als Hinweise auf differenziell auftretende Proteine nach BNYVV Infektion. Die Transkriptom- bzw. Proteomstudie von Schmidlin *et al.* (2008) und Larson *et al.* (2008) stellen eine gute Diskussionsgrundlage dar. Die Autoren nutzten für ihre Analysen die Infektion anfälliger Zuckerrübengenotypen mit BNYVV, um auf diesem Weg die Expression von Proteinen zu zeigen, die durch Pathogeninduktion auftreten. Schmidlin *et al.* (2008) führten eine Transkriptionsanalyse durch, in der das Expressionsverhalten von Genen der Zuckerrübenwurzel nach Rizomaniainfektion bestimmt wurde. Identifizierte Kandidaten konnten mit der Ubiquitinierung, dem Zellzyklus, einer Beteiligung am Metabolismus, sowie der Signalabwehr und der Antwort auf oxidativen Stress in Verbindung gebracht werden. Kategorien, in die auch die mit P25 interagierenden Kandidatenproteine dieser Arbeit eingeordnet werden konnten (Kapitel 3, Tabell 1). Larson *et al.* (2008) identifizierten BNYVV-induzierte Proteomveränderungen der Zuckerrübe. Dabei wurden vorrangig Proteine mit Beteiligung an der systemischen Resistenz, der Veränderung in der

Phytohormonaktivität, sowie der Symptomentwicklung untersucht. Kandidaten, die im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten YTH Analysen identifiziert wurden, konnten in vergleichbare funktionelle Kategorien gruppiert werden, wie in den Arbeiten von Schmidlin *et al.* (2008) und Larson *et al.* (2008). Die Übereinstimmung dieser funktionellen Gruppierungen identifizierter Transkripte und Proteine in unterschiedlich ausgerichteten Untersuchungen (Larson *et al.*, 2008; Schmidlin *et al.*, 2008 und das in Kapitel 3 verfasste Manuskript) lassen den Rückschluss auf eine Beteiligung allgemeiner, stressbezogener Zellreaktionen der Zuckerrübe auf eine BNYVV Infektion zu. Untersuchungen der gewebespezifischen Transkriptomik, wie von Bellin *et al.* (2002) durchgeführt, stellen ein wichtiges Hilfsmittel für die u.a. organspezifische Bestimmung von Proteinfunktionen von Zuckerrübengenen dar. Die Autoren identifizierten Transkripte der stressbezogenen Signaltransduktion und bringen deren Expression mit Zellstreckung sowie einem Anstieg des osmotischen Potenzials aufgrund der Zuckerakkumulation in Zusammenhang.

Aus den mit Hilfe des YTH-Screens identifizierten Interaktionen konnten neue Erkenntnisse über die mögliche Beteiligung von Proteinen am Resistenzmechanismus bzw. der Pathogenitätsfunktion des Zuckerrüben-BNYVV Interaktion abgeleitet werden. Insbesondere wurden Hinweise auf mögliche Proteinfunktionen mit Hilfe der Durchführung von Datenbankvergleichen zu Sequenzen bekannter Funktionen abgeleitet (Kapitel 3, Tabelle1). Aufgrund dieser Sequenzhomologien und daraus abgeleiteter potentieller Proteinfunktionen besteht die Möglichkeit, mit P25 interagierende cDNA Kandidaten für weitere Arbeiten auszuwählen. Die für eine genauere Charakterisierung in Frage kommenden Kandidaten sollten anhand ihrer putativen Funktionen Rückschlüsse auf eine mögliche funktionelle Beteiligung an dem Resistenzmechanismus der Zuckerrübe zulassen. Neben dem in dieser Arbeit charakterisierten F-box Protein (Kapitel 4 und 5.3) wurden zwei weitere Kandidaten, ein U-box und ein zweites „kelch-repeat containing F-box“ identifiziert. U-box Proteine gehören wie auch die F-box Proteine zu den E3 Ligasen des Ubiquitinierungsprozesses. Der Unterschied dieser ist darin zu finden, dass F-box eine Komponente der E3 Ligase im SCF-Komplex ist, wohingegen das U-box Protein allein als eine solche fungiert. Die im Folgenden diskutierten cDNA Klone stellen nur einen Teil der möglichen

Kandidaten dar und gelten aufgrund der in Kapitel 3 diskutierten Eigenschaften als die interessantesten. Die drei am Ubiquitinierungsprozess beteiligten Proteine „kelch-repeat containing F-box“ (Nr. 1, 12) sowie der U-box Kandidat (Nr. 24) (Kapitel 3, Tabelle 1, von denen Kandidat Nr.1 bereits detailliert charakterisiert wurde (Kapitel 4), sind aufgrund von durchgeföhrten Studien als Interaktionspartner pathogener Proteine bzw. als Beteiligte der Ubiquitinierungskaskade bekannt. Neben den bereits in Kapitel 5.4. erwähnten Beispielen des SON1 aus *A. thaliana* (Kim und Delaney, 2002) und dem ACRE189 aus Tabak (van den Burg *et al.*, 2008), kann das als F-box identifizierte P0 des Polerovirus, sowie das ACRE276 aus Tabak, welches ein U-box dargestellt als Beispiel herangezogen werden (Yang *et al.*, 2006). F-box, als auch U-box Proteine sind in der Literatur viel beschrieben worden. Dennoch sind die Zielproteine die für die Proteinidegradation ausgewählt werden in vielen Hinsichten nach wie vor ungeklärt. Auffallend ist, dass es bei den bisher identifizierten Zielproteinen mehrfach Zielproteine aus Phytohormonsignalwegen zu finden sind. Bekannte F-box Substrate von *A. thaliana* sind z.B. das Auxin "Indole-3-acetic acid" (IAA/Aux) als Zielprotein des F-box TIR1 (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski und Leyser 2005), die DELLA Proteine als Beteiligte der Gibberellinsynthese und Zielproteine des F-box Proteins SLEEPY1 (McGinnis *et al.*, 2003; Dill *et al.*, 2004), das Protein EIN3 des Ethylensignalweges, welches das Substrat der „EIN3-binding F-box“ Proteine (EBF1 und EBF2) darstellt (Guo und Ecker, 2003; Potuschak *et al.*, 2003; Gagne *et al.*, 2004), sowie das Zielprotein "timing of cab expression" (TOC1), ein in den zirkadianen Rhythmus involviertes Protein, das vom F-box Protein Zeitlupe (ZTL) rekrutiert wird (Mas *et al.*, 2003; Somers *et al.*, 2004). Zielproteine der U-box Proteine sind ebenfalls weitestgehend ungeklärt, zu den identifizierten Substraten aus *A. thaliana* zählen z.B. RPN12a eine Proteinphosphatase 2A Untereinheit des 19S ribosomalen Partikels als Ziel der U-box Proteine PUB22 und PUB23 (Cho *et al.*, 2008) und Proteine, die u.a. für Proteinfaltung verantwortlich sind, Hsp70 und Hsp90, welche durch das U-box Protein CHIP zur Degradation gefördert werden (Luo *et al.*, 2006). Das Protein, dass in dieser Arbeit mit hoher Homologie zu einem U-box Protein identifiziert wurde, besitzt unter anderem eine weitere signifikante Homologie zu einem ACRE276-like Protein. ACRE276 wirkt wie zuvor dargestellt als Zelltod auslösendes Protein und

aufgrund dessen sollte dieser Kandidat in zukünftigen Arbeiten mit berücksichtigt werden. Es wurde beschrieben, dass Pflanzenviren versuchen, ein Ungleichgewicht zwischen Wirts- und Virusproteinen auszugleichen, in dem bestimmte Zielproteine erkannt und anschließend zur Degradation am 26S Proteasom weitergeleitet werden (Banks *et al.*, 2003). Die Interaktionen zwischen P25 des BNYVV und dem Proteasom sind in ihrer Relevanz vollkommen ungeklärt. Denkbar wären zusätzlich zu der in Kapitel 5.4. diskutierten Relevanz für Resistenzmechanismen, das P25 in seiner Funktion die Virusreplikation und dessen Zell-zu-Zell Ausbreitung durch den Proteinabbau der Wirtsproteine positiv beeinflusst wird. (Die nachfolgend angegebene Kandidatennummerierung nimmt Bezug auf die in Kapitel 3 dargestellte Tabelle 1). Der bereits charakterisierte F-box Kandidat Nr.1 (mit einer Länge von 1149bp), zeigte hohe Homologie zum N-Terminus des in der Datenbank identifizierten Kandidaten, der nur ca. 300bp länger war, als der P25 interagierende cDNA Klon. Im entsprechenden Aminosäurevergleich, welcher zur Überprüfung hoch konservierter Domänen genutzt wurde, konnten nur zwei der drei „kelch“ Motive des Datenbankkandidaten für den cDNA Kandidaten identifiziert werden. Die Homologie zum F-box Motiv konnte im cDNA Klon als auch nach Herstellung von zugehörigen Voll-Längen-Klonen von der Proteindatenbank nur bedingt bestätigt werden. Die erwartete F-box Domäne konnte zum einen identifiziert werden, wird aber zum anderen aufgrund des "expected value" als nicht signifikant eingestuft. Dennoch ist davon auszugehen, dass es sich um ein F-box Protein handelt, da die Interaktion mit den Proteinen ASK1 und ASK2 die Funktion als ein solches sicherstellt. Die Sequenzen der beiden weiteren Proteasom beteiligte Kandidaten waren wesentlich kürzer. Der nur 508bp lange zweite F-box Kandidat zeigte zu dem aus der Datenbank identifizierten Kandidat (1428bp) Sequenzhomologie nach den „kelch“ Motiven und nur eine geringe Nukleotidübereinstimmung von ca. 250bp.

Der dritte Kandidat Nr. 24, welcher mit 752bp für eine E3 Ligase kodiert stimmt mit dem C-terminalen Ende, einschließlich dem Stopcodon des Datenbankkandidaten überein. Dabei konnten drei „Armadillo/beta-catenin-like repeats“ (ARM) Motive identifiziert werden. Der über 2000bp lange Datenbank U-box Kandidat

(NM\_102674.3) weist eine weitere „ARM“ Domäne, wie auch ein U-box Motiv signifikant auf.

Insbesondere wurden Hinweise gefunden, dass P25 mit Proteinen interagiert, die am Aufbau und der Funktion des Zytoskeletts beteiligt sind. Für weitere Untersuchungen sind zwei Kandidaten mit signifikanter Homologie zu Aktin aus *C. papaya* (Nr. 6) bzw. zu „Fiber Annexin“ aus *G. hirsutum* (Nr. 16) von Interesse. Aktin gehört zu einer Genfamilie, die entwicklungsspezifisch in Pflanzen exprimiert wird (Li *et al.*, 2005). Als Teil des Zytoskeletts ist es für das Zellwachstum verantwortlich. Besonders wichtig ist Aktin in Zellvorgängen, wie Zytoplasmaströmung, Zellwandbildung, Organisation des Endoplasmatischen Retikulums usw. Für diese Vorgänge werden in den zugehörigen Zellregionen Aktinfilamente neu gebildet und das lokale Wachstum somit stimuliert. Aktin, besteht aus Mikrofilamenten, die ähnlich den Mikrotubuli sind und als Einzelfilament oder Bündel auftreten (Staiger und Blanchoin, 2006). In der Literatur wurde beschrieben, dass Pflanzenviren sich das Aktingerüst aus Mikrofilamenten zu Nutze machen und sich somit u.a. durch Plasmodesmen zwischen den Zellen fortbewegen und so eine schnelle Verbreitung in der Pflanze erreichen (Ploubidou und Way, 2001; Haupt *et al.*, 2005). Das in dieser Arbeit identifizierte 400bp große Aktin, welches eine Aktindomäne aufweist, zeigt eine fast vollständige Übereinstimmung mit dem in der Datenbank identifizierten Aktinprotein, welches eine Länge von 579bp aufweist. Dennoch konnte weder Start- noch Stopcodon ermittelt werden.

„Fiber Annexin“ wird einer Proteinfamilie zugeordnet, die an Membranprozessen beteiligt ist. Der Aufbau des Annexinproteins zeigt, dass der N-terminale Bereich hoch variabel und für die Bindung an Komponenten des Zytoskeletts verantwortlich ist. Die restliche Sequenz des Annexins besteht aus konservierten Bereichen, die ein, sich mehrfach wiederholendes ca. 70 as-Motiv kodiert. Vor allem spielt Annexin eine entscheidende Rolle im Kalziumtransport, sowie bei der pflanzlichen Stressantwort (Konopka-Postupolska, 2007). Der im YTH Screen identifizierte cDNA Klon mit einer Länge von 564bp kodiert für zwei „Annexin repeats“ (ANX). Die in der Datenbank identifizierte homologe Sequenz mit einer Länge von 951bp zeigt dem gegenüber vier dieser ANX Motive. Die Homologie zwischen diesen beiden Sequenzen liegt mit knapp 400bp im vorderen Teil des

Datenbankkandidaten, wobei das Startcodon nicht mit abgedeckt wurde. Des Weiteren konnte durch Calvert *et al.* (1996) gezeigt werden, dass es zu einer Interaktion zwischen Aktin (Nr. 6) und „Fiber Annexin“ (Nr. 16) kommen kann. Aufgrund der Interaktion dieser Kandidaten mit P25 lässt sich vermuten, dass dadurch eine Veränderung des Haarwurzelwachstums hervorgerufen und/oder die Zellwandsynthese beeinflusst wird.

Der cDNA Klon Nr. 9 zeigt bei der Datenbankanalyse hochsignifikante Sequenzhomologien zu zwei Datenbankeinträgen. Zum einen wurde das Protein HIP2 identifiziert, welches ebenfalls durch einen YTH Screen als Interaktionspartner des viralen „silencing suppressor“ HC-Pro der Potyviren detektiert wurde (Guo *et al.*, 2003). Zum zweiten konnte eine signifikante Sequenzhomologie zum Protein Tortifolia1 aus *A. thaliana* nachgewiesen werden, welchem eine entscheidende Rolle bei der Regulation des gerichteten Zellwachstums zugesprochen wird. Da die im YTH Screen selektierte Sequenz des Kandidaten Nr.9 nur 442bp beträgt, dem gegenüber die Datenbanksequenzen eine Länge von ca. 2500bp aufweisen, konnte die in beiden homologen Sequenzen vorkommenden „HEAT“-Domänen (ARM ähnliche Domänen), welche von der Proteindatenbank als Protein-Protein Interaktionsdomänen beschrieben werden, nicht im cDNA-Klon verifiziert werden, da die übereinstimmende Sequenz von 150 bzw. 250bp sich C-terminal hinter den „HEAT“-Domänen befindet.

Der Kandidat Nr.7 zeigt Sequenzhomologie zum „Leucine rich repeat family protein/extensin family protein“ (LRR-Extensin) aus *A. thaliana*. Schmidlin *et al.* (2008) führten Expressionsstudien durch und zeigten, dass ein zufällig ausgewähltes Extensin, welches nicht mit dem in dieser Arbeit identifizierten Protein übereinstimmt, in resistenten BNYVV infizierten Material exprimiert wird. LRR-Extensin nimmt eine Schlüsselfunktion bei der Zellwandentwicklung ein (Cassab, 1998), die u.a. durch biotischen und abiotischen Stress induziert werden kann (Takemoto *et al.*, 2001; Merkouropoulos und Shirat, 2003). Der Aufbau der Proteine in der LRR-Extensin-Familie besteht zum einem aus einem leucinreichen, repetitiven auf Aminosäureebene hoch konserviertem Motiv am LRR, welches für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich ist, zum anderen aus Extensin, das als Aminosäuredomäne sehr variabel auftritt (Ringli, 2005). LRR-Extensin Gene aus *A. thaliana* werden u.a.

spezifisch in der Pollenentwicklung wie auch in vegetativen Geweben spezifisch exprimiert. Zusätzlich wurde durch die Datenbankanalyse der identifizierten LRR-Extensin Sequenz ein weiteres LRR-Extensin aus *A. thaliana* identifiziert, das speziell an der Haarwurzelmorphogenese und der Zellstreckung beteiligt ist. Wie die Untersuchungen von Baumberger *et al.* (2001) zeigen konnten, verursacht eine LRR-Extensin-Mutation vermehrte Seitenwurzelbildung. Zusammenfassend lässt das Ergebnis der Sequenzhomologievergleiche schlussfolgern, dass durch die Interaktion des P25 mit LRR-Extensin, das LRR-Extensin in *A. thaliana* am Auftreten der phänotypisch veränderten Seitenwurzelbildung in infizierten Zuckerrüben beteiligt ist. Eine Beteiligung dieser Interaktion an der Virussymptombildung (Wurzelbart durch vermehrte Seitenwurzelbildung) lässt sich ebenfalls vermuten und in Zusammenhang mit der pathogenbezogenen pflanzlichen Stressantwort bringen. Der „LLR/Extensin“ cDNA Kandidat deckt aufgrund seiner Größe von 311bp nur einen kleinen Bereich des 2544bp Datenbankkandidaten ab, der mit 150bp vor der identifizierten LRR Domäne am N-Terminus lokalisiert ist.

P25 zeigte Interaktion mit Phytohormonmetabolismusgenen zu dem auch der Kandidat Nr. 25 zählt. „Nt-iaa deduced protein“ auch bekannt als „auxin responsive element“ (Dargeviciute *et al.*, 1998). Das Phytohormon Indole-3-acetic acid (IAA) koordiniert viele Wachstums- und Entwicklungsprozesse, wie Zellelongation, Seitenwurzelbildung durch Auxin-vermittelte Änderungen in der Zellteilung, Zellerweiterung und der Zelldifferenzierung. In *A. thaliana* wurde nachgewiesen, dass der Auxin-Signalweg eine entscheidende Rolle im Ubiquitin-Proteasom-System spielen könnte und somit ebenfalls an der Proteindgradation beteiligt wäre (Gray und Estelle, 2000). Der „Nt-iaa deduced protein“ cDNA-Bibliotheksklon mit einer Länge von 751bp zeigt keinerlei Aminosäuredomänen, wohingegen der Kandidat der Datenbankanalyse mit einer Größe von mehr als 723bp eine Aux/IAA Domäne aufzeigt. Die Homologie dieser beiden Sequenzen beträgt ca. 100bp, die genau in der beschriebenen Aux/IAA Domäne zu finden ist, aber nur unvollständig vorliegt und somit nicht im cDNA Klon nachweisbar ist.

Der letzte im Rahmen dieser Diskussion erwähnenswerte Kandidat ist Nr. 27 "Clathrin binding protein". Clathrin ist beteiligt an der Zellteilung und dem

endocytotischen Weg, sowie an der Bildung von Membraneinstülpungen (Pérez-Gómez und Moore, 2007). Beim rice dwarf virus konnte gezeigt werden, dass dieses Vektorzellen von Insekten mittels Clathrin-abhängiger Endocytose besiedelt (Wei *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde von Holstein (2002) beschrieben, dass Clathrin beschichtete Vesikel am Wachstum von Haarwurzelzellen beteiligt sind. Die Nutzung der Endocytose als Eintrittsweg des BNYVV mittels P25 könnte in Anlehnung an die Ergebnisse von Wei *et al.* (2007) vermutet werden und zusätzlich noch durch die Beobachtung von Holstein (2002), womit die Wurzelzellen der Seitenwurzeln der Zuckerrüben verstärkt werden. Der signifikant, homologe Datenbankkandidat (1269bp) des "Clathrin binding protein" zeigte keine konservierten Domänen. Eine Sequenzhomologie mit dem ca. 400bp langen cDNA Kandidaten wurde mit nur knapp 100bp zu Beginn nach dem Startcodon aufgezeigt.

Auf der Basis der identifizierten Kandidaten sind zukünftige, gezielte Charakterisierungen des Resistenzmechanismus im Zuckerrüben-BNYVV-Interaktionssystem denkbar. Für eine weiterführende Beschreibung ist es notwendig die zu untersuchenden Kandidatengene als Voll-Längen-Klone zu isolieren, und anschließend im YTH erneut die P25 Interaktionen zu bestätigen. Auch eine Überprüfung dieser Voll-Längen-Klone im BiFC sollte zur Bestätigung der ersten Interaktion hinzugezogen werden. Während für die Kandidaten Nr. 6, 9 und 16 die Interaktion mit P25 im BiFC-Assay bestätigt werden konnte, erfolgte dieser Interaktionsnachweis für die Kandidaten Nr. 7, 12, 24 und 25 bisher noch nicht. Um sicherzugehen, dass es sich um wahre Interaktionskandidaten handelt, sollten diese in einem der bereits erwähnten alternativen Protein-Protein Interaktionsassays, wie z.B. *in vitro* GST-pull-down oder Co-Immunopräzipitation, bestätigt werden. Der F-box Kandidat Nr.1 (Kapitel 4 und 5.3), welcher aus verschiedenen anfälligen und resistenten Zuckerrübenlinien als Voll-Längen-Klon amplifiziert wurde, ist als Möglichkeit für weitere Arbeiten ebenfalls zu berücksichtigen.

Auf der Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten zahlreiche weitere gezielte Untersuchungen (Kapitel 5.6.) anschließen, um die Rolle des Pathogenitätsfaktors P25 und sein Mitwirken bei der Entstehung der beschriebenen Rizomaniasymptome vollständig aufklären zu können.

## 5.6. Ausblick

Der Phänotyp der BNYVV Resistenz ist gut in der Literatur beschrieben (Tamada *et al.*, 1999). Der damit verbundene Resistenzmechanismus konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden (Chiba *et al.*, 2008). Um den vorliegenden BNYVV Resistenzmechanismus in Zuckerrübe und die damit verbundenen Wirkmechanismen des P25 aufdecken zu können, zeigen die in Kapitel 5.4 und 5.5. vorgestellten Kandidaten und methodischen Ansätze eine Möglichkeit für zukünftige Arbeiten. Wenn die in Kapitel 5.4. aufgestellte Hypothese, dass F-box eine Schlüsselfunktion zur Erkennung von P25 in Form des sogenannten „Guardee“ zum Resistenzgen *Rz* ausführt, wäre eine erneute YTH cDNA Bibliothek Durchmusterung eine Möglichkeit, um das Majorresistenzgen auf Chromosom 3 aufzudecken. Bei einem Screening mit F-box als „bait“ ist zu erwarten, dass es zur Interaktion zwischen F-box und *Rz2*, sowie zwischen F-box und P25 kommen könnte, da das Ausgangsmaterial der vorliegenden Bibliothek eine BNYVV infizierte *Rz2* resistente Zuckerrübenlinie bildet.

Für die weiteren vorgestellten, unvollständigen cDNA Kandidaten sollten Voll-Längen-Klone, sowohl aus anfälligen, wie auch resistenten homozygoten Zuckerrübenmaterial erstellt werden. Um die bisher vermutete Funktion dieser auch als vollständige Gene zu bestätigen, ist eine Interaktion mit P25 erneut im YTH notwendig. Sollten sich die Hypothesen hinsichtlich der Beteiligung am Resistenzmechanismus von BNYVV bestätigen, ist davon auszugehen, dass es zu Unterschieden bei der Interaktion kommt, d.h. die Interaktionen mit P25 könnten unterschiedlich stark sein bzw. eine Interaktion mit P25 bleibt vollständig aus. Eine Veränderung in der Interaktion könnte bei Beteiligung an der Resistenz auch durch die Verwendung eines anderen P25, z. B. das aggressivere P25-IV detektierbar werden. Da *Rz2* im YTH Screen mit P25 nicht identifiziert werden konnte, und somit davon auszugehen ist, dass es sich nicht um ein *R*-Gen im Sinne der Gen-für-Gen Hypothese handelt, kann angenommen werden, dass alle Kandidaten sowohl aus anfälligen, wie auch resistenten Zuckerrüben amplifizierbar sind. Die Beteiligung der Kandidaten am Resistenzmechanismus könnte durch den Nachweis differenzierter Transkriptionsmuster in anfälligen und resistenten, homozygoten Zuckerrüben nach BNYVV Infektion deutlich gemacht werden. Der Nachweis dieser, wäre dann mit genspezifischen Primern mittels

reverser Transkription und anschließender Polymerase-Ketten-Reaktion aus Gesamt-RNA detektierbar.

Die Herstellung transgener Zuckerrübenpflanzen sollte zur Bestätigung der Beteiligung von Kandidaten (z.B. F-box) am Resistenzmechanismus ebenfalls mit herangezogen werden. Durch die Herstellung von „knock-out“ Transgenen mittels RNA-Interferenz (RNAi) können die bestehenden pflanzeneigenen Gene in ihrer Expression reprimiert werden und so resistente Zuckerrübengenotypen ihre Resistenzeigenschaften verlieren. Diese Untersuchungen könnten dann zeigen, inwieweit das F-box eine generelle Funktion an der HR-Induktion spielt. In diesem Fall würden bei RNAi-vermitteltem F-box „knock-out“ ebenso die monogenen R-Gen basierenden Resistzenzen gegenüber *Heterodera schachtii* (Cai *et al.*, 1997; Williamson und Kumar, 2006) und *Erysiphe beta* (Francis, 2002; Grimmer *et al.*, 2007a) beeinträchtigt werden. Liegt eine spezifische Beteiligung des F-box an der BNYVV-Zuckerrüben-Interaktion vor, sollte keine Beeinträchtigung o.a. monogener R-Gen basierender Resistzenzen zu beobachten sein. Dem gegenüber steht die Alternative der Überexpression von Kandidaten in anfälligen Zuckerrüben. Überexprimierte Kandidatengene sollten somit zur verstärkten Resistenzreaktion führen. Die Funktionalität dieser beiden transgenen Ansätze kann abschließend durch BNYVV Infektionsversuche unter Gewächshausbedingungen auf Anfälligkeit bzw. Resistenz geprüft werden.

Des Weiteren eröffnen sich durch Genomsequenzierung und -kartierung der Zuckerrüben weiterführende Möglichkeiten. Im Jahr 2004 begann mit „BEET Physical Map“ ([www.gabi.de](http://www.gabi.de)) ein Projekt zur Genomentschlüsselung von Zuckerrübe. Ziel des Projektes war die Weiterführung der Entwicklung markergestützter Selektionsverfahren durch die Erstellung einer physikalischen Karte des Zuckerrübengenoms. Zusätzlich wurde im Rahmen dieses GABI-Projektes eine „bacterial artificial chromosome“ (BAC) Bank der Zuckerrübe erstellt. Die neu entwickelte BAC-Bank wurde für die physikalische Kartierung eingesetzt. Die physikalische Karte bietet die Möglichkeit bekannte Marker der Rz Gene des BNYVV zu lokalisieren und als Grundlage für die Sequenzierung heranzuziehen. Die Voraussetzung für diese weiterführenden Arbeiten ist, dass die Karte das Chromosom 3 enthält. Molekulare Markerstudien (z.B. QTL und RAPD) zur Lokalisation der BNYVV Resistenzgene kartierten die Gene auf

Chromosom 3 (Grimmer *et al.*, 2007b). Der geschätzte Abstand von *Rz1* und *Rz2* liegt zwischen 20 cM und 35 cM (Scholten *et al.*, 1999; Amiri *et al.*, 2003).

In dem 2008 begonnen GABI-FUTURE Projekt ([www.gabi.de](http://www.gabi.de)) wird die Sequenzierung des gesamten Zuckerrüben Genoms durch BAC-Sequenzierung und „shotgun sequencing“ durchgeführt. Nach vollständiger Sequenzierung ist auch möglicherweise die exaktere Zahl der im Zuckerrübengenom vorhandenen Gene bestimmbar, die derzeit auf mindestens 25.000 Gene geschätzt wird (Koch, 2006). Mittels vergleichender Kartierung und unter Berücksichtigung der Zuckerrübensequenz, besteht die Möglichkeit einzelne Gene, z.B. *Rz* oder sogar komplett Genfamilien detailliert zu bearbeiten. Dafür müssen aufwendige Arbeiten zur Feinkartierung des Chromosom 3 angeschlossen werden, um die Region um die *Rz*-Gene einzugrenzen. Anschließend wäre die Überprüfung der verbliebenen Gene auf Resistenzvermittelnde Eigenschaften durch die Herstellung von transgenen Pflanzen um ein Vielfaches vereinfacht und realisierbar. Anhand von *Rz* Sequenzinformationen aus einer Kollektion von anfälligen und resistenten Zuckerrübenlinien wird es möglich, Nukleotidpolymorphismen zu identifizieren und spezifische Allele mit der Resistenz bzw. Anfälligkeit zu korrelieren. Die Durchmusterung einer Kollektion gibt Hinweise auf vorhandene Sequenzvariation am Resistenzlocus innerhalb der Zuckerrübe. Informationen über die Lokalisation der Polymorphismen innerhalb des Gens (Promotorregion, funktionale Domänen) geben Aufschluss über mögliche Signalketten und liefern so die Möglichkeit, gezielt in der Kaskade des Resistenzmechanismus Veränderungen zu bestimmen. Diese Untersuchungen liefern die Basis für die Entwicklung neuer Resistenzen, da es unklar ist, wie langlebig die bekannten monogenen Resistenzen sind und eine Durchbrechung der Resistenz durch das Pathogen, wie bereits das im US-amerikanischen Imperial Valley aufgetretene BNYVV Isolat, welches die *Rz1*-Resistenz überwinden konnte (Liu und Lewellen, 2007; Pferdmenges und Varrelmann, 2008; Pferdmenges *et al.*, 2008), vorgekommen ist. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass die Resistenzen gegen Pflanzenviren länger dauerhaft bleiben, im Vergleich mit anderen Pflanzenpathogenen (Harrison, 2002; Garcia-Arenal und McDonald, 2003). Als Beispiel dafür steht das monogene *R*-Gen *N* gegen das TMV, welches bereits in den vierziger Jahren identifiziert wurde und bis heute in resistenten Sorten verwendet wird.

Für die Sequenzierung des vollständigen Genoms wurde ein anfälliger Zuckerrübengenotyp ausgewählt (persönliche Mitteilung D. Borchardt, KWS SAAT AG, Einbeck). Dieser kann die Grundlage bilden für Vergleiche bezüglich Sequenzpolymorphismen zwischen BNYVV anfälligen und resistenten Zuckerrüben. Dafür wäre es notwendig die Zuckerrübensequenz aus einem resistenten BAC Klon (Chromosom 3) direkt mit der Sequenz eines anfälligen Genotypen zu vergleichen.

Neben den beschriebenen *Rz*-Genen, die auch als Majorgene bekannt sind, liegen zusätzlich resistenzunterstützende Minorgene für die BNYVV Resistenz im Zuckerrübengenom vor (Biancardi *et al.*, 2002; Gidner *et al.*, 2005). Mit Hilfe der physikalischen Karte sowie der vollständigen Genomsequenz der Zuckerrübe wäre die Identifikation mittels „whole-genome“ Assoziationsstudien (Glazier *et al.*, 2002; Aranzana *et al.*, 2005) aller an der Resistenz beteiligten Major- und Minorgene denkbar. Durch die Entschlüsselung aller BNYVV-Resistenz vermittelnden Gene könnte der zugehörige Resistenzmechanismus in seiner Komplexität und Funktionsweise sowie die Wirkungsweise des Pathogenitätsfaktors P25 offengelegt werden.

Die in dieser Arbeit erfolgte Bestimmung von P25 interagierenden Zuckerrübenproteinen führte zur Identifizierung möglicher an der BNYVV Resistenz beteiligten Proteine. Deren funktionelle Charakterisierung bezüglich der Zuckerrüben-BNYVV Interaktion wird durch die derzeit vorangetriebenen Projekte der Rübengenomsequenzierung voraussichtlich erleichtert.

## 6. Zusammenfassung

Die viröse Wurzelbärtigkeit (Rizomania) ist derzeit und wird voraussichtlich auch für die Zukunft eine der bedeutendsten Pflanzenkrankheiten im weltweiten Zuckerrübenanbau bleiben. Das beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), welches durch den bodenbürtigen, biotrophen Plasmodiophoromyceten *Polymyxa betae* übertragen wird, verursacht die Ausbildung eines Wurzelbartes, der zu hohen Ertrags- und Zuckerverlusten führt. BNYVV aus dem Genus *Benyvirus* ist ein einzelsträngiges sinnpositives RNA Virus, das in Abhängigkeit seiner Herkunft aus 4-5 stäbchenförmigen Viruspartikeln besteht. Die Krankheit wird zurzeit nur über den Anbau von teilresistenten Genotypen mit monogenen, dominant vererbten Resistzenzen (*Rz1*, *Rz2*, *Rz3*), die auf Chromosom 3 des Zuckerrübengenoms lokalisiert sind, kontrolliert. Diese reduzieren die Virusreplikation in infizierten Haarwurzeln und verhindern die Ausbreitung des Virus in die Hauptwurzel. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde dazu ein Überblick über bekannte Resistzenzen in Zuckerrübe, das Schadbild von Rizomania, sowie die Biologie des Erregers gegeben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten unter Nutzung molekularer Testsysteme pflanzliche Genprodukte aus resistenten Zuckerrüben-Genotypen, die mit dem Pathogenitätsfaktor P25 des BNYVV interagieren, isoliert und anschließend funktionell charakterisiert werden, um Hinweise auf pflanzliche Resistenzfaktoren bzw. Zielproteine der Viruspathogenität zu erlangen.

Das von der BNYVV RNA3 kodierte Genprodukt P25 ist für die Translokation des Virus im Wurzelsystem, die Ertragsbeeinflussung und die Symptomausprägung in anfälligen Genotypen verantwortlich. Die der Wirt-Pathogen Interaktion zugrunde liegenden Funktionen des Pathogenitätsfaktors P25 sind bisher unbekannt. Sicher ist, dass P25 eine „Shuttle“-Funktion besitzt, durch die es dem Protein in infizierten Zellen möglich ist, sich zwischen Zellkern und Cytoplasma transportiert zu werden. Zur Identifizierung von Proteinen der Zuckerrübe, die an der möglichen Interaktion mit P25 beteiligt sind, wurde ein LexA-basiertes „Yeast Two-Hybrid“ (YTH) System als Protein-Protein Interaktionsassay gewählt. Dieser besteht aus zwei voneinander unabhängigen Transkriptionsfaktoren LexA und B42, die mittels Proteininteraktion als Fusionskomplex die Interaktionsbestätigende Hefetranskription aktiviert.

Eine aus Wurzel- und Blatt-Gesamt-RNA erstellte cDNA-Bibliothek eines *Rz2*-resistenten Zuckerrübengenotyps wurde auf Proteininteraktionen mit P25 durchmustert. Nach Durchführung des YTH Screens wurden 450 Kandidaten auf Transkriptionsautoaktivierung und P25 Interaktion überprüft und falsch-positive Reaktionen ausgeschlossen. Abschließend verblieben 36 Kandidatengene, deren Nukleotidsequenzen mittels Datenbanksuche auf Homologie zu Sequenzen mit bekannten Funktionen analysiert wurden. Die Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe einer Datenbank für die Identifizierung von Proteindomänen auf konservierte funktionelle Domänen analysiert. Siebenundzwanzig der 36 Kandidaten wiesen signifikante Homologie zu Sequenzen mit bekannter bzw. putativer Funktion auf und ermöglichen eine Einteilung der Kandidatengene in funktionelle Kategorien. Dabei waren jene Kandidaten, die eine mögliche funktionelle Beteiligung an der pflanzlichen Erkennung des viralen Pathogenitätsfaktors P25, der Ubiquitinierung, dem Phytohormonstoffwechsel oder dem Zellwand- und Zytoskellettaufbau haben von besonderem Interesse. Um sicherzustellen, dass die nachgewiesenen Interaktionen des YTH Screen keine falsch-positiven waren, wurden diese P25 Interaktionen mittels eines *in planta* „bimolecular fluorescence complementation assay“ (BiFC) überprüft. Als Resultat des BiFC konnte die Interaktion von zehn Kandidaten bestätigt werden. Die Ergebnisse des YTH Screens und der BiFC Studie sind im dritten Teil beschrieben.

Im vierten Teil der Arbeit erfolgte die detaillierte Charakterisierung eines vielversprechenden, im cDNA-Bibliotheksscreen identifizierten Kandidaten. Dieser wurde aufgrund des Auftretens einer nekrotischen Blattreaktion im Rahmen der BiFC Analyse ausgewählt. In der Datenbankanalyse wies der Kandidat eine signifikante Homologie zu einem „kelch repeat-containing F-box“ Protein aus *A. thaliana* auf. Eine Beteiligung dieses, zu einer Genfamilie gehörenden Kandidatengens, an der Resistenzreaktion ist denkbar, da pflanzliche F-box Proteine an der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und der Induktion der Resistenzreaktion beteiligt sind. Diese selektierten und mit Ubiquitin markierten Proteine werden dem 26S Proteasom zur Degradation zugeführt. Die vollständige kodierende Sequenz des F-box Kandidaten wurde aus zwei resistenten und einer anfälligen Zuckerrübenlinie isoliert. Anhand von Sequenzvergleichen konnten Polymorphismen gezeigt werden. Dabei wurden keine Unterschiede in den

bekannten Proteindomänen zwischen den Kandidaten identifiziert, des weiteren konnte die Proteinexpression unter induzierten konstitutiven Bedingungen für den anfälligen als auch die resistenten Kandidaten nachgewiesen werden. Die F-box Kandidaten haben eine Interaktion mit P25 im YTH gezeigt, sowie eine Hypersensitive Reaktion (HR) in Tabak ohne Unterschied zwischen anfälligem und resistentem Ursprung für alle drei F-box Kandidaten induziert. Zusätzlich wurde der F-box Kandidat in einem zweiten YTH System, welches auf dem Transkriptionsfaktor Gal4 basiert, sowie einem *in vitro* Interaktionsnachweis dem Glutathion-S-Transferase "Pull-down" auf P25 Interaktion getestet und diese bestätigt.

Aufgrund einer Zelltodreaktion, die bei der Interaktion des P25 mit dem unvollständigen F-box Protein im BiFC auftrat, wurde die induzierte Expression von verschiedenen „pathogenesis related proteins“ in Tabak überprüft und somit die Induktion einer HR durch das F-box Kandidatengen nachgewiesen. Für eine Bestätigung, dass es sich bei diesem charakterisierten Kandidaten tatsächlich um ein F-box Protein handelt, wurden im YTH System Interaktionen mit ausgewählten Proteinen des sogenannten SCF-Komplexes, einer E3 Ligase vorgenommen. Dieser Komplex des Proteasoms nimmt die Erkennung von zu degradierenden Proteinen vor und leitet anschließend ihren Abbau durch das 26S Proteasom ein. Von diesem aus SKP1, Cullin und F-box bestehenden Komplex wurden orthologe SKP1 Proteine aus *A. thaliana* (ASK1, ASK2) auf Interaktionen mit dem F-box im Gal4-basierten YTH System untersucht und erfolgreich bestätigt. Die identifizierten F-box Proteine beinhalten zum einem eine „F-box“ Domäne zum andere zwei „kelch-repeat“ Motive. Um die Funktionen dieser detaillierter zu charakterisieren, wurden Deletionsmutanten des F-box Kandidaten erstellt. Dafür wurde das F-box Protein in seine funktionellen Domänen „F-box“ und „kelch repeats“ geteilt und auf Interaktion in Hefe, sowie Zelltodreaktion mittels Agroexpression analysiert. Die hergestellten Deletionsmutanten zeigten weder eine Interaktion im YTH System mit P25 noch eine Zelltodreaktion in Blattparenchymzellen von Tabak. Die beschriebenen Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Anwesenheit aller Domänen des F-box Proteins für eine P25 Interaktion sowie die Auslösung von HR notwendig ist. Eine detaillierte Darstellung der Untersuchungen ist im vierten Teil dieser Arbeit zusammengestellt.

Um eine mögliche funktionelle Beteiligung von den in dieser Arbeit identifizierten Kandidaten an der pflanzlichen Erkennung des viralen Pathogenitätsfaktors P25 zu charakterisieren, stellen weitere YTH Analysen eine Möglichkeit dar.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abe H., Tamada T. (1986)** Association of beet necrotic yellow vein virus with isolates of *Polomyxa betae* Keskin. *Annual Phytopathological Society. Japan* **52**, 235–247
- Acosta-Leal R., Fawley M.W., Rush C.M. (2008)** Changes in the intraisolate genetic structure of Beet necrotic yellow vein virus populations associated with plant resistance breakdown. *Virology*, **20**, 60-68.
- Alberts B. (1998)** The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell*, **92**, 291-294.
- Ali M.A. (1950)** Genetics of resistance to the bean common mosaic virus in the bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytopathology*, **40**, 69–79.
- Amiri R., Moghaddam M., Mesbah M., Sadeghian S.Y., Ghannadha M.R., Izadpanah K. (2003)** The inheritance of resistance to Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *B. vulgaris* subsp. *maritima*, accession WB42: Statistical comparisons with Holly-1-4. *Euphytica*, **132**, 363-373.
- Anadalakshmi R., Pruss G.J., Ge X., Marathe R., Mallory A.C., Smith T.H., Vance V.B. (1998)** A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **95**, 13079–13084.
- Aranzana M.,J, Kim S., Zhao K., Bakker E., Horton M., Jakob K., Lister C., Molitor J., Shindo C., Tang C., Toomajian C., Traw B., Zheng H., Bergelson J., Dean C., Marjoram P., Nordborg M. (2005)** Genome-Wide Association Mapping in Arabidopsis Identifies Previously Known Flowering Time and Pathogen Resistance Genes. *PloS Genetics*, **1**, 531-539.
- Aronheim A., Zandi E., Hennemann H., Elledge SJ., Karin M. (1997)** Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Molecular and Cellular Biology*, **6**, 3094-102.
- Asher M.J.C. (1993)** The sugar beet crop. In: Cooke, D.A. & Scott, R.K. (eds), *Science into practice*. Chapman & Hall, London, 311-346.
- Bader GD, Heilbut A, Andrews B, Tyers M, Hughes T, Boone C. (2003)** Functional genomics and proteomics: charting a multidimensional map of the yeast cell. *Trends in Cell Biology*, **7**, 344-356.
- Banks L., Pim P., Thomas M. (2003)** Viruses and the 26S proteasome: hacking into destruction. *Trends in Biochemical Sciences*, **28**, 452-459.
- Barnard E., McFerran N.V., Nelson J., Timson D.J. (2007)** Detection of protein-protein interactions using protein-fragment complementation assays (PCA). *Current Proteomics*, **4**, 12-27.

- Barzen E., Mechelke W., Ritter E., Schulte-Kappert E., Salamini F. (1992)**  
RFLP markers for sugar-beet breeding: chromosomal linkage maps and location of major genes for rhizomania resistance, monogermy and hypocotyl colour. *Plant Journal*, **2**, 601-611.
- Baulcombe D. (2004)** RNA silencing in plants. *Nature*, **431**, 356-363.
- Baumberger N., Ringli C., Keller B. (2001)** The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, **15**, 28-39.
- Becker H. (1993)** Pflanzenzüchtung. Verlag Ulmer, Stuttgart.
- Bellin D., Weber M., Theis T., Schulz B., Weisshaar B., Schneider K. (2002)**  
EST sequencing, annotation and macroarray Transcriptome analysis identify preferentially root-expressed genes in sugar beet. *Plant Biology*, **4**, 700-710.
- Bendahmane A., Kanyuka K., Baulcombe D.C. (1999)** The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell*, **11**, 781-792.
- Bendahmane M., Fitch J.H., Zhang G., Beachy R.N. (1997)** Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *Journal of Virology*, **71**, 7942-7950.
- Bendixen C., Gangloff S., Rothstein R. (1994)** A yeast mating-selection for detection of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Research*, **22**, 1778-1779.
- Bhat R.A., Lahaye T., Panstruga R. (2006)** The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods*, **2**, 12.
- Biancardi E., Lewellen R.T., De Biaggi M., Erichsen A.W., Stevanato P. (2002)**  
The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica*, **127**, 383-397.
- Bongiovanni G.C., Lanzoni L. (1964)** La rizomania della bietola. *Progresso Agricolo*, **2**, 209-220.
- Bosemark N.O. (1993)** Genetics and breeding. Cooke DA, Scott RK (eds.) *The Sugar Beet Crop: Science into Practice*. Chapman and Hall, London, 67-119.
- Bracha-Drori K., Shichrur K., Katz A., Oliva M., Angelovici R., Yalovsky S., Ohad N. (2004)** Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal*, **40**, 419-427.

**Bundessortenamt (2008)** Beschreibende Sortenliste Getreide, Mais Ölfrüchte Leguminosen (großkörnig) Hackfrüchte (außer Kartoffeln), Bundessorten, Hannover, Deutschland

**Cai D., Kleine M., Kifle S., Harloff H.-J., Sandal N.N., Marcker K.A., Marcker Klein-Lankhorst R.M., Salentijn E.M.J., Lange W., Stiekema W.J., Wyss U., Grundler F.M.W., Jung C. (1997)** Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science*, **275**, 832-834.

**Calvert C.M., Gant S.J., Bowles D.J. (1996)** Tomato annexins p34 and p35 bind to F-actin and display nucleotide phosphodiesterase activity inhibited by phospholipid binding. *Plant Cell*, **8**, 333-342.

**Canova A. (1959)** Appunti di patologia della barbabietola. *Informatore Fitopatologico*, **20**, 390-396.

**Cardozo T., Pagano M. (2004)** The SCF ubiquitin ligase: Insights into a molecular machine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**, 739-751.

**Cassab G.I. (1998)** Plant cell wall proteins. *Annual Reviews of Plant Physiology and Molecular Biology*, **49**, 281-309.

**Causier B., Davies B. (2002)** Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Molecular Biology*, **50**, 855-870.

**Chiba S., Miyanishi M., Andika I.B., Kondo H., Tamada T. (2008)** Identification of amino acids of the beet necrotic yellow vein virus p25 protein required for induction of the resistance response in leaves of *Beta vulgaris* plants. *Journal of General Virology*, **89**, 1314-1323.

**Chien C.-T., Bartel P.L., Sternglanz R., Fields S. (1991)** The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88**, 9578-9582.

**Cho S.K., Ryu M.Y., Song C., Kwak J.M., Kima W.T. (2008)** Arabidopsis PUB22 and PUB23 Are Homologous U-Box E3 Ubiquitin Ligases That Play Combinatory Roles in Response to Drought Stress. *Plant Cell*, **20**, 1899–1914.

**Colas P., Brent R. (1998)** The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology. *Trends in Biotechnology*, **16**, 355-363.

**Collmer C.W., Marston M.F., Taylor J.C., Jahn M. (2000)** The *I* gene of bean: a dosage-dependent allele conferring extreme resistance, hypersensitive resistance, or spreading vascular necrosis in response to the potyvirus Bean common mosaic virus. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **13**, 1266-1270.

- Commandeur U., Jarausch W., Li Y., Koenig R., Burgermeister W. (1991)** cDNAs of beet necrotic yellow vein virus RNAs 3 and 4 are rendered biologically active in a plasmid containing the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Virology* **185**, 493-495.
- Dang C.V., Barret J., Villa-Garcia M., Resar L.M., Kato G.J., Fearon E.R. (1991)** Intracellular leucine zipper interactions suggest c-Myc hetero-oligomerization. *Molecular Cell Biology*, **11**, 954-962.
- Dargeviciute A., Roux C., Decreux A., Sitbon F., Perrot-Rechenmann C. (1998)** Molecular cloning and expression of the early auxin-responsive Aux/IAA gene family in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Physiology*, **39**, 993-1002.
- de Bock T.S.M. (1986)** The genus Beta: domestication, taxonomy, and interspecific hybridization for plant breeding. *Acta Horticulturæ*, **182**, 335-343.
- de Virgilio M., Kiosses W.B., Shattil S.J. (2004)** Proximal, selective, and dynamic interactions between integrin alpha II beta 3 and protein tyrosine kinases in living cells. *Journal of Cell Biology*, **165**, 305-311.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. (2005)** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 441-445.
- Dill A., Thomas S.G., Hu J., Steber C.M., Sun T.P. (2004)** The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell*, **16**, 1392-1405.
- Draycott P. (1991)** Sugar beet. Verlag: Blackwell.
- Drijfhout E. (1978)** Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and *Bean common mosaic virus* with implications for strain identification and breeding for resistance. *Agric. Res. Rep.* 872
- Dunoyer P., Pfeffer S., Fritsch C., Hemmer O., Voinnet O., Richards K.E. (2002)** Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant Journal*, **29**, 555-567.
- Fields S., Song O. (1989)** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Filipowicz W., Jaskiewicz L., Kolb F.A., Pillai R.S. (2005)** Posttranscriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology*, **15**, 331-341.
- Fisher M.L., Kyle M.M. (1994)** Cosegregation of phenotypically similar dominant responses to nine potyviruses. *Theoretical and Applied Genetics*, **89**, 818-23.

- Flor H.H. (1971)**. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Reviews of Phytopathology*, **9**, 275-296.
- Ford-Lloyd B.V., Williams A.L.S., Williams J.T. (1975)** A revision of Beta section Vulgares (Chenopodiaceae), with new light on the origin of cultivated beets. *Bot. J. Linn. Soc.*, **71**, 89-102.
- Francis S. (2002)** Sugar-beet powdery mildew (*Erysiphe betaee*). *Molecular Plant Pathology*, **3**, 119–124
- Freemont P.S. (2000)** RING for destruction? *Current Biology*, **10**, R84-87.
- Frommer W., Ninnemann O. (1995)** Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal and plant cells. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**, 419-444.
- Gagne J.M., Smalle J., Gingerich D.J., Walker J.M., Yoo S.D., Yanagisawa S., Vierstra R.D. (2004)** Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **101**, 6803-6808.
- Gao Z., Johansen E., Evers S., Thomas C.L., Noel Ellis T.H., Maule A.J. (2004)** The potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant Journal*, **40**, 376-385.
- Garcia-Arenal F., McDonals B.A. (2003)** An analysis of durability of resistance to plant viruses. *Phytopatholoy*, **93**, 941-952.
- Gidner S., Lennefors B.L., Nilsson N.O., Bensefelt J., Johansson E., Gyllenspetz U., Kraft T. (2005)** QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome*, **48**, 279-285.
- Goodin M.M., Zaitlin D., Naidu R.A., Lommel S.A. (2008)** *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **21**, 1015-1026.
- Glazier A.M., Nadeau J.H., Aitman T.J. (2002)** Finding Genes That Underlie Complex Traits. *Genetics*, **298**, 2345-2349.
- Gray W.M., Estelle I. (2000)** Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**, 133-138.
- Grimmer M.K., Bean K.M.R., Asher M.J.C. (2007a)** Mapping of Wve resistance genes to sugar-beet powdery mildew using AFLP and anchored SNP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **115**, 67–75.

- Grimmer M.K., Trybush S., Hanley S., Francis S.A., Karp A., Asher M.J.C. (2007b)** An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to Beet necrotic yellow vein virus. *Theoretical and Applied Genetics*, **114**, 1151-1160.
- Guo H., Ecker J.R. (2003)** Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell*, **115**, 667-677.
- Guo D., Spetz C., Saarma M., Valkonen J.P. (2003)** Two potato proteins, including a novel RING finger protein (HIP1), interact with the potyviral multifunctional protein HCpro. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **16**, 405-410.
- Gyuris J., Golemis E., Chertkov H., Brent R. (1993)** Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell*, **75**, 791-803.
- Haeberlé A.M., Stussi-Garaud C. (1995)** In situ localization of the non-structural protein P25 encoded by beet necrotic yellow vein virus particles. *Archives of Virology*, **76**, 643-650.
- Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G. (1997)** Plant disease resistance genes. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**, 575-607.
- Harju V.A., Mumford R.A., Bockley A., Boonham N., Clover G.R.G. (2002)** Occurrence in the United Kingdom of beet necrotic yellow vein virus isolates which contain RNA 5. *Plant Pathology*, **51**, 811.
- Harrison B.D. (2002)** Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica*, **124**, 181-192.
- Haupt S., Cowan G.H., Ziegler A., Roberts A.G., Opara K.J., Torrance, L. (2005)** Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway. *Plant Cell*, **17**, 164–181.
- Heijbroek W., Musters P.M.S., Schoone A.H.L. (1999)** Variation in pathogenicity and multiplication of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in relation to the resistance of sugar-beet Cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, **105**, 397-405.
- Hengen P.N. (1997)** Methods and reagents, false positives from the yeast two hybrid system *Trends in Biochemical Sciences*, **22**, 33-34.
- Hoffmann G.M., Nienhaus F., Poehling H.-M., Schönbeck F., Weltzien H.C., Wilbert H. (1994)** *Lehrbuch der Phytomedizin* Vol. 3 edn.: Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH.

- Holmes F.O. (1938)** Inheritance of resistance to tobacco mosaic disease in tobacco. *Phytopathology*, **28**, 553–561.
- Holstein S.E. (2002)** Clathrin and plant endocytosis. *Traffic*, **3**, 614-620.
- Hook B., Bernstein D., Zhang B., Wickens M. (2005)** RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: affinity, sensitivity, and enhanced library screening. *RNA*, **11**, 227-233.
- Hu C.D., Chinenv Y., Kerppola T.K. (2002)** Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell*, **9**, 789-798.
- Hu C.D., Kerppola T.K. (2003)** Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotechnology*, **21**, 539-545.
- Hui Liu B. ed (1998)** QTL mapping: introduction, 375-386.
- Hull R. ed (2002)** Matthews' Plant Virology 4th edn. San Diego ; London [u.a.] Academic Press.
- Jach G., Pesch M., Richter K., Frings S., Uhrig J.F. (2006)** An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. *Nature Methods*, **3**, 597-600.
- Jaeger S., Eriani G., Martin F. (2004)** Results and prospects of the yeast three-hybrid system. *FEBS Letters*, **556**, 7-12.
- Jiménez J.A., Rodríguez D., Calvo A.P., Mortensen L.C., Nicolás G., Nicolás C. (2005)** Expression of a transcription factor (FsERF1) involved in ethylene signalling during the breaking of dormancy in *Fagus sylvatica* seeds. *Physiologia Plantarum*, **125**, 373-380.
- Jiménez I., López L., Alamillo J.M., Valli A., García J.A. (2006)** Identification of a plum pox virus CI-interacting protein from chloroplast that has a negative effect in virus infection. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **19**, 350–358.
- Jin Y., Ma D., Dong J., Jin J., Li D., Deng C., Wang T. (2008)** HC-Pro Protein of Potato Virus Y Can Interact with Three *Arabidopsis* 20S Proteasome Subunits In *Planta*. *Journal of Virology*, **81**, 12881-12888.
- Jin Y., Ma D., Dong J., Li D., Deng C., Jin J., Wang T. (2007)** The HC-pro protein of potato virus Y interacts with NtMinD of tobacco. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **20**, 1505-1511.
- Johansson E. (1985)** Rhizomania in sugar beet - a threat to beet growing that can be overcome by plant breeding. *Sveriges Utsädesförenings Tidskrift* **95**, 115-121.

- Joung J.K., Ramm E.I., Pabo C.O. (2000)** A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**, 7382-7387.
- Jupin I., Guilley H., Richards K.E., Jonard G. (1992)** Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *E.M.B.O. Journal*, **11**, 479-488.
- Jupin I., Tamada T., Richards K. (1991)** Pathogenesis of beet necrotic yellow vein virus. *Virology*, **2**, 421-488.
- Kaelin W.G., Pallas D.C., Decaprio J.A., Kaye F.J., Livingston D.M. (1991)** Identification of Cellular Proteins That Can Interact Specifically with the T/E1a-Binding Region of the Retinoblastoma Gene-Product. *Cell*, **64**, 521-532.
- Kepinski S., Leyser O. (2005)** The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 446-451.
- Kerppola T.K. (2006)** Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Molecular and Cellular Biology*, **7**, 449-456.
- Kerppola T.K. (2008)** Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annual Reviews of Biophysics*, **37**, 465-487.
- Keskin B. (1964)** *Polomyxa betae* N.Sp., a Parasite in the Roots of *Beta Vulgaris* Tournefort, Particularly during the Early Growth of the Sugar Beet. *Archives of Microbiology*, **49**, 348-374.
- Kim H.S., Delaney T.P. (2002)** Arabidopsis SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **14**, 1469-1482.
- Kim M.H., Roh H.E., Lee M.N., Hur M.W. (2007)** New Fast BiFC Plasmid Assay System for in Vivo Protein-Protein Interactions. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **20**, 703-714.
- Koch G. (2006)** Genetisch-züchterische Grundlagen des Ertragspotenzials von Zuckerrüben. *Zuckerindustrie*, **131**, 32-38.
- Koenig R., Kastirr U., Holtschulte B., Deml G., Varrelmann M. (2008)** Distribution of various types and P25 subtypes of Beet necrotic yellow vein virus in Germany and other European countries. *Archives of Virology*, **153**, 2139-2144.
- Koenig R., Burgermeister W. (1989)** Mechanical inoculation of sugarbeet roots with isolates of beet necrotic yellow vein virus having different RNA compositions. *Journal of Phytopathology*, **124**, 249-255.

- Koenig R., Haeberlé A.M., Commandeur U. (1997)** Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugar beet growing area in Europe. *Archives of Virology*, **142**, 1499-1504.
- Koenig R., Jarausch W., Li Y., Commandeur U., Burgermeister W., Gehrke M., Lüddecke P. (1991)** Effect of recombinant beet necrotic yellow vein virus with different RNA compositions on mechanically inoculated sugarbeets. *Journal of General Virology*, **72**, 2243-2246.
- Koenig R., Lennefors B.L. (2000)** Molecular analyses of European A, B and P type sources of Beet necrotic yellow vein virus and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Archives of Virology*, **145**, 1561-1570.
- Koenig R., Lüddecke P., Haebberle A. (1995)** Detection of Beet necrotic yellow vein virus strains, variants and missed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *Journal of General Virology*, **76**, 2051-2055
- Koenig R. Stein, B. (1990)** Distribution of beet necrotic yellow vein virus in mechanically inoculated sugar beet plantlets of cultivars with different degrees of rhizomania resistance. *Proceedings of the First Symposium of the International Working Group of Fungal Vectors, Germany*, 87-90
- Kole C. ed (2007)** Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Vegetables, Springer-Verlag
- Konopka-Postupolska D. (2007)** Annexins: putative linkers in dynamic membrane–cytoskeleton interactions in plant cells. *Protoplasma*, **230**, 203–215.
- Kraemer B., Zhang B., Sengupta D., Fields S., Wickens M. (2000)** Using the yeast three-hybrid system to detect and analyze RNA-protein interactions. *Methods in Enzymology*, **328**, 297-321.
- Kraft T. (2001)** Molecular markers - where are we today? *Proc. IIRB 64th Cong. Bruges, Belgium*, 159-166.
- Kruse M., Koenig R., Hoffmann A., Kaufmann A., Commandeur U. (1994)** Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of Beet necrotic yellow vein virus. *Journal of General Virology*, **75**, 1835-1842.
- Kuroda K., Kato M., Mima J., Ueda M. (2006)** Systems for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **71**, 127-136.
- Lalonde S., Ehrhardt D.W., Loque D., Chen J., Rhee S.Y., Frommer W.B. (2008)** Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations. *Plant Journal*, **53**, 610-635.

- Larson L.L., Wintermantel W.M., Hill A., Fortis L., Nunez A. (2008)** Proteome changes in sugar beet in response to Beet necrotic yellow vein virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **72**, 62-72.
- Lee L., Telford E.B., Batten J.S., Scholtkof K.-B.G., Rush C.M. (2001)** Complete nucleotide sequence and genome organization of Beet soilborne mosaic virus, a proposed member of the genus Benyvirus. *Archives of Virology*, **146**, 2443-2453.
- Lee L.Y., Fang M.J., Kuang L.Y., Gelvin S.B. (2008)** Vectors for multi-color bimolecular fluorescence complementation to investigate protein-protein interactions in living plant cells. *Plant Methods*, **4**, 24.
- Legrain P., Selig L. (2000)** Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems. *FEBS Letters*, **480**, 32-36.
- Lein J.C., Asbach K., Tian Y., Schulte D., Li C., Koch G., Jung C., Cai D. (2007)** Resistance gene analogues are clustered on chromosome 3 of sugar beet and cosegregate with QTL for rhizomania resistance. *Genome*, **50**, 61-71.
- Lennefors B.-L., Lindsten K., Koenig R. (2000)** First record of A and B type Beet necrotic yellow vein virus in sugar beets in Sweden. . *European Journal of Plant Pathology*, **106**, 199-201.
- Letschert J.P.W., Lange W., Frese L., Van Den Berg R.G. (1994)** Taxonomy of Beta section Beta. *Journal of Sugar Beet Research*, **31**, 69-85.
- Li X.B., Fan X.P., Wang X.L., Cai L., Yang W.C. (2005)** The cotton ACTIN1 gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. *Plant Cell*, **17**, 859-875.
- Link D., Schmidlin L., Schirmer A., Klein E., Erhardt M., Geldreich A., Lemaire O., Gilmer D. (2005)** Functional characterization of the Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. *Journal of General Virology*, **86**, 2115-2125.
- Liu H., Reavy B., Swanson M., MacFarlane S. A. (2002)** Functional replacement of the tobacco rattle virus cysteinerich protein by pathogenicity proteins from unrelated plant viruses. *Virology*, **298**, 232–239.
- Liu H.-Y., Sears J.L., Lewellen R.T. (2005)** Occurrence of resistance-breaking Beet necrotic yellow vein virus of sugar beet. *Plant Disease*, **89**, 464–468.
- Liu H.-Y., Lewellen R.T. (2007)** Distribution and molecular characterisation of resistancebreaking isolates of Beet necrotic yellow vein virus in the United States. *Pant Disease*, **91**, 847-851.

- Luo J., Shen G., Yan J., He C., Zhang H. (2006)** AtCHIP functions as an E3 ubiquitin ligase of protein phosphatase 2A subunits and alters plant response to abscisic acid treatment. *Plant Journal*, **46**, 649–657.
- Martin G.B., Bogdanove A.J., Sessa G. (2003)** Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Reviews of Plant Biology*, **54**, 23–61.
- Mas P., Kim W.Y., Somers D.E., Kay S.A. (2003)** Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **426**, 567-570.
- Mayer G., Launhardt H., Munder T. (1999)** Application of the green fluorescent protein as a reporter for Ace1-based, two-hybrid studies. *Biotechniques*, **1**, 86-88.
- McDowell J.M., Woffenden B.J. (2003)** Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*, **21**, 178-183.
- McGinnis K.M., Thomas S.G., Soule J.D., Strader L.C., Zale J.M., Sun T.P., Steber C.M. (2003)** The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell*, **15**, 1120-1130.
- Merkouropoulos G., Shirat A.H. (2003)** The unusual *Arabidopsis* extensin gene atEXt1 is expressed throughout plant development and is induced by a variety of biotic and abiotic stresses. *Planta*, **3217**, 356-366.
- Miernyk J.A., Thelen J.J. (2008)** Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant Journal*, **53**, 597-609.
- Miyanishi M., Kusume T., Saito M., Tamada T. (1999)** Evidence for three groups of sequence variants of beet necrotic yellow vein virus RNA 5. *Archives of Virology*, **144**, 879-892.
- Moissard G., Voinnet O. (2004)** Viral suppression of RNA silencing in plant. *Molecular Plant Pathology*, **5**, 71-82.
- Mouhanna A.M., Langen G., Schlösser E. (2008)** Weeds as alternative hosts for BSBV, BNYVV, and the vector *Polomyxa betae* (German isolates). *Journal of Plant Diseases and Protection*, **115**, 193-198.
- Nielsen S.L., Nicolaisen M., Scheel C., Dinesen I.G. (2001)** First record of beet necrotic yellow virus in Denmark. *Plant Disease*, **85**, 559.
- Ohad N., Shichrur K., Yalovsky S. (2007)** The analysis of protein-protein interactions in plants by bimolecular fluorescence complementation. *Plant Physiology*, **145**, 1090-1099.
- Oltmann W., Burba M., Bolz G. (1984)** *Fortschritte der Pflanzenzüchtung* Vol. 12 edn.: Verlag Paul Parey.

- Paape M., Solovyev A.G., Erokhina T.N., Minina E.A., Schepetilnikov M.V., Lesemann D.E., Schiemann 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. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **19**, 874-883.
- Pazhouhandeh M., Dieterle M., Marrocco K., Lechner E., Berry B., Brault V., Hemmer O., Kretsch T., Richards K.E., Genschik P., Ziegler-Graff V. (2006)** F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **103**, 1994-1999.
- Pérez-Gómez J., Moore I. (2007)** Plant endocytosis: it is clathrin after all. *Current Biology*, **17**, 217-219.
- Pfeffer S., Dunoyer P., Heim F., Richards K.E., Jonard G., Ziegler-Graff V. (2002)** P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, **76**, 6815–6824.
- Pferdmenges F., Korf H., Varrelmann M. (2008)** Identification of rhizomania-infected soil in Europe able to overcome Rz1 resistance in sugar beet and comparison with other resistance-breaking soils from different geographic *European Journal of Plant Pathology*, **10.1007/s10658-008-9388-9**
- Pferdmenges F., Varrelmann M. (2008)** Breaking of Beet necrotic yellow vein virus resistance in sugar beet is independent of virus and vector inoculum densities. *European Journal of Plant Pathology*, **10.1007/s10658-008-9408-9**
- Piroux N., Saunders K., Page A., Stanley J. (2007)** Geminivirus pathogenicity protein C4 interacts with *Arabidopsis thaliana* shaggy-related protein kinase AtSK $\eta$ , a component of the brassinosteroid signalling pathway. *Virology*, **362**, 428-440.
- Ploubidou A., Way M. (2001)** Viral transport and the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, **13**, 97-105.
- Poehlman J.M. ed (1986)** Breeding field crops 3rd edn.: Van Nostrand Reinhold, New York.
- Pompe-Novak M., Wrischer M., Ravnikar M. (2001)** Ultrastructure of chloroplasts in leaves of potato plants infected by potato virus YNTN. *Phyton-Annales Rei Botanicae*, **41**, 215-226.
- Potuschak T., Lechner E., Parmentier Y., Yanagisawa S., Grava S., Koncz C., Genschik P. (2003)** EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell*, **115**, 679-689.

- Putz C. (1977)** Composition and structure of Beet necrotic yellow vein virus. *Journal of General Virology*, **35**, 397-401
- Qu F., Ren T., Morris T.J. (2003)** The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *Journal of Virology*, **77**, 511–522.
- Rahim M.D., Andika I.A., Han C., Kondo H., Tamada T. (2007)** RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *Journal of General Virology*, **88**, 1611-1619.
- Ren T., Qu F., Morris T.J. (2000)** HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell*, **12**, 1917-1926.
- Richard-Molard M. (1985)** Beet rhizomania disease-the problem in Europe. *Report of the 1984 British Crop Protection Conference-Pests and Diseases*, 837-845.
- Richard-Molard M.S., Cariolle M. (2001)** Stress hydrique et abiotique et amélioration génétique. *Proc. IIRB 64th Cong. Bruges, Belgium*, 153-158.
- Ringli C. (2005)** The role of extracellular LRR-extensin (LRX) proteins in cell wall formation *Plant Biosystems*, **139**, 32-35.
- Ritter E., Debener T., Barone A., Salamini F., Gebhardt C. (1991)** RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Molecular and General Genetics*, **227**, 81–85.
- Ruffel S., Dussault M.H., Palloix A., Moury B., Bendahmane A., Robaglia C., Caranta C. (2002)** A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant Journal*, **32**, 1067-1075.
- Rush C.M. (2003)** Ecology and epidemiology of benyviruses and plasmodiophorid vectors. *Annual Reviews of Phytopathology*, **41**, 567-592.
- Rush C.M., Liu H.-Y., Lewellen R.T., Acosta-Leal R. (2006)** The continuing saga of Rhizomania of sugar beets in the United States. *Plant Disease*, **90**, 4-15.
- Saito M., Kiguchi T., Kusume T., Tamada T. (1996)** Complete nucleotide sequence of the Japanese isolate S of Beet necrotic yellow vein virus RNA and comparison with European isolates. *Archives of Virology*, **141**, 2163-2175.

- Schirmer A., Link D., Cognat V., Moury B., Beuve M., Meunier A., Bragard C., Gilmer D., Lemaire O. (2005)** Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. *Journal of General Virology*, **86**, 2897-2911.
- Schmidlin L., de Bruyne E., Weyens G., Lefebvre M., Gilmer D. (2008)** Identification of differentially expressed root genes upon rhizomania disease. *Molecular Plant Pathology*, **9**, 741-751.
- Scholten O.E., de Bock T.S.M., Klein-Lankhorst R.M., Lange W. (1999)** Inheritance of resistance to Beet necrotic yellow vein virus in *Beta vulgaris*, conferred by a second gene for resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, **99**, 740-746.
- Seldmayer K. (1964)** Monogerme Zuckerrüben ihre Genetik, Züchtung und Bedeutung für den Zuckerrübenanbau. *Züchter*, **34**, 45-51.
- Serebriiskii I.G., Toby G.G., Golemis E.A. (2000)** Two-hybrid system for characterization of protein-protein interactions in *E.coli*. *Biotechniques*, **29**, 288-296.
- Silhavy D., Burgyan J (2004)** Effects and side-efftsof viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends in Plant Sciences*, **9**, 76-83.
- Smith D.B., Johnson K.S. (1988)** Single-Step Purification of Polypeptides Expressed in Escherichia-Coli as Fusions with Glutathione S-Transferase. *Gene*, **67**, 31-40.
- Soellick T., Uhrig J.F., Bucher G.L., Kellmann J.W., Schreier P.H. (2000)** The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**, 2373-2378.
- Sohi H., Maleki M. (2004)** Evidence for presence of types A and B of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in Iran. *Virus Genes*, **29**, 353-358.
- Somers D.E., Kim W.Y., Geng R. (2004)** The F-box protein ZEITLUPE confers dosage-dependent control on the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time. *Plant Cell*, **16**, 769-782.
- Soosaar J.L.M., Burch-Smith T.M., Dinesh-Kumar S.P. (2005)** Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature reviews*, **3**, 789-798.
- Spicher J. (2008)** Zuckerrübenanbau 2007 in Norddeutschland. *Zuckerrübe*, **1**, 34-36.
- Staiger C.J., Blanchoin L. (2006)** Actin dynamics: old friends with new stories. *Current Opinions in Plant Biology*, **9**, 554–562.

- Suter B., Kittanakom S., Stagljar I. (2008)** Two-hybrid technologies in proteomics research. *Current Opinions in Biotechnology*, **19**, 316-323.
- Takemoto D., Doke N., Kawakita K. (2001)** Characterization of elicitor-inducible tobacco genes isolated by differential hybridization. *Journal of General Plant Pathology*, **67**, 89-96.
- Tamada T. (1999)** Benyvirus. In *Encyclopedia of Virology*. Edited by A. Granoff and R. Webster. Academic Press, New York., pp. 154-160.
- Tamada T. (2007)** Susceptibility and resistance of *Beta vulgaris* subsp. *maritima* to foliar rub-inoculation with Beet necrotic yellow vein virus. *Journal of General Plant Pathology*, **73**, 76-80.
- Tamada T., Baba T. (1973)** Beet necrotic yellow vein virus from Rhizomania-affected sugar beet in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **39**, 325-332.
- Tamada T., Schmitt C., Saito M., Guilley H., Richards K. (1996)** High resolution analysis of the readthrough domain of Beet necrotic yellow vein virus readthrough protein: a KTER motif is important for efficient transmission of the virus by *Polomyxa betae*. *Journal of General Virology*, **77**, 1359-1367.
- Tamada T., Uchino H., Kusume T., Saito M. (1999)** RNA 3 Deletion Mutants of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Do Not Cause Rhizomania Disease in Sugar Beets. *Phytopathology*, **89**, 1000-1006.
- Tamada T.S., Abe H., Saito M., Kiguchi T.; Harada T. (1989)** Production and pathogenicity of isolates of Beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *Journal of General Virology*, **70**, 3399-3409.
- Uetz P., Hughes R.E. (2000)** Systematic and large-scale two-hybrid screens. *Current Opinions in Microbiology*, **3**, 303-308.
- van Criepling W., Beyaert R. (1999)** Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biological Procedures Online*, **2**, 1-38.
- van den Burg H.A., Tsitsigiannis D.I., Rowland O., Lo J., Rallapalli G., Maclean D., Takken F.L., Jones J.D. (2008)** The F-box protein ACRE189/ACIF1 regulates cell death and defense responses activated during pathogen recognition in tobacco and tomato. *Plant Cell*, **20**, 697-719.
- van der Biezen E.A., Jones J.D.G. (1998)** Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, **12**, 454-456.
- Varrelmann M. (2007)** Vorkommen, Ausbreitung und Pathogenität verschiedener Formen des Rizomaniaviruss (Beet necrotic yellow vein virus, BNYVV) Übersichtsbeitrag zur Biologie und Variabilität von Rizomania und zum Nachweis von möglicherweise auftretenden resistenzüberwindenden Isolaten. *Zuckerindustrie*, **132**, 113-120.

- Varshavsky A. (1997)** The ubiquitin system. *Trends in Biochemical Sciences*, **10**, 383-387.
- Vasavada H.A., Ganguly S., Germino F.J., Wang Z.X., Weissmann S.M. (1991)**  
A contingent replication assay for the detection of protein-protein interactions in animal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88**, 10686-10690.
- Vetter G., Hily J.M., Klein E., Schmidlin L., Haas M., Merkle T., Gilmer D. (2004)** Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein. *Journal of General Virology*, **85**, 2459-2469.
- Vitale A. (2002)** Physical methods. *Plant Molecular Biology*, **50**, 825-836.
- Voinnet O. (2005)** Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics*, **6**, 206-220.
- Voinnet O., Pinto Y. M., Baulcombe D. C. (1999)** Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**, 14147–14152.
- von Bargen S., Salchert K., Paape M., Piechulla B., Kellmann J.-W. (2001)**  
Interactions between the tomato spotted wilt virus movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. *Plant Physiology and Biochemistry*, **39**, 1083–1093.
- von Mering C., Krause R., Snel B., Cornell M., Oliver S.G., Fields S., Bork P. (2002)** Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature*, **417**, 399-403.
- Wallrabe H., Periasamy A. (2005)** Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Current Opinions in Biotechnology*, **16**, 19-27.
- Walter, M., Chaba, C., Schutze K., Batistic O., Weckermann K., Nake C., Blazevic D., Grefen C., Schumacher K., Oecking C., Harter K., Kudla J. (2004)** Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal*, **40**, 428-438.
- Wei T., Chen H., Ichiki-Uehara T., Hibino H., Omura T. (2007)** Entry of rice dwarf virus into cultured cells of its insect Vector involves clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology*, **81**, 7811–7815.
- Williamson V.M., Kumar A. (2006)** Nematode resistance in plants:the battle underground. *Trends in Genetics*, **22**, 396-403.
- Wirtschaftliche Vereinigung Zucker (2008)** Zuckermarkt – Anbau und Erzeugung. [www.zuckerwirtschaft.de](http://www.zuckerwirtschaft.de)
- Xia Y., Lu L.J., Gerstein M. (2006)** Integrated Prediction of the Helical Membrane Protein Interactome in Yeast. *Journal of Molecular Biology*, **357**, 339–349.

- Yang C.-W., González-Lamonde R., Ewan R.A., Rowland O., Yoshioka H., Shenton M., Ye H., O'Donnell E., Jones J.D.G., Sadanandom A. (2006)** The E3 Ubiquitin ligase activity of Arabidopsis PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense. *Plant Cell*, **18**, 1084-1098.
- Zhang B., Kraemer B., Sengupta D., Fields S., Wickens M. (2000)** Yeast three-hybrid system to detect and analyze RNA-protein interactions. *Methods Enzymology*, **318**, 399-419.
- Zhou F., Wu G., Deng W., Pu Y., Wei Y., Li Y. (2007 )** Interaction of rice dwarf virus outer capsid P8 protein with rice glycolate oxidase mediates relocalization of P8. *FEBS Letters*, **581** 34-40.
- Zhu S., Gao F., Cao X., Chen M., Ye G. , Wei C., Li Y. (2005)** The Rice Dwarf Virus P2 Protein Interacts with ent-Kaurene Oxidases in Vivo, Leading to Reduced Biosynthesis of Gibberellins and Rice Dwarf Symptoms. *Plant Physiology*, **139**, 1935–1945.

## 8. Anhang

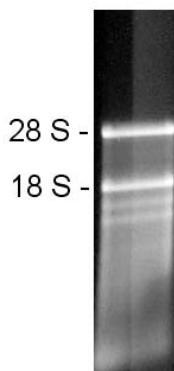
### 8.1. Construction of a random primed normalized cDNA library from *Beta vulgaris*

Material supplied

Total RNA from *Beta maritima* delivered on dry ice.

Analysis of RNA

Prior to cDNA synthesis the total RNA was analyzed for its integrity by spectrophotometry and denaturing agarose gel electrophoresis (see Fig. 1).



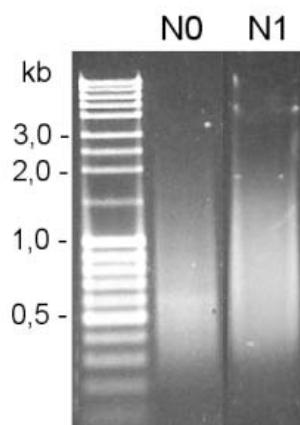
**Figure 1:** Analysis of total RNA from *Beta maritima* (2 µg) on a 1,2% denaturing agarose gel.

cDNA synthesis

The cDNA was synthesized according to our standard random priming protocol starting from poly A+ RNA purified from total RNA. With the poly A+ RNA first-strand cDNA synthesis was performed using a random-Xhol-linker primer and M-MLV-RNase H reverse transcriptase. Synthesis of the second strand was carried out with a second random linker primer and Klenow DNA-polymerase. The resulting N0-cDNA was then amplified with 14 cycles of LAPCR (Barnes 1994, PNAS 91:2216-2220) (see Fig. 2, lane N0)

## Normalization

Normalization was achieved by one cycle of denaturation and reassociation of the amplified N0-cDNA, resulting in N1-cDNA. Reassociated ds-cDNA was separated from the remaining ss-cDNA (normalized cDNA) by passing the mixture over a hydroxylapatit column. After hydroxylapatit chromatography, the N1 ss-cDNA was amplified with 13 LA-PCR cycles (see Fig. 2, lane N1).



**Figure 2:** Agarose gel electrophoresis (1,3% agarose) of the N0- and N1-cDNA from *Beta maritima* (100 ng each).

## Cloning and library amplification

For directional cloning, the N1 cDNA was first subjected to a limited exonuclease treatment to generate *Eco* RI overhangs at the 5'-ends and was then digested with *Xho* I.

Prior to cloning, the N1 cDNA was size-fractionated. For that purpose, the cDNA was separated on a 1,3% agarose gel. Following elution of cDNAs greater than 0,4 kb the cDNA was ligated into *Eco* RI and *Xho* I sites of the plasmid vector pJG4-5.

The following adapter sequences remain attached to the cDNA ends:

5'-end (*Eco* RI-site) 5'-GAATTCCCATCAGGCAGAGACAGAACGCA-3'  
3'-end (*Xho* I-site) none

The cDNA inserts can be released from the vector by an *Eco* RI / *Xho* I digestion.

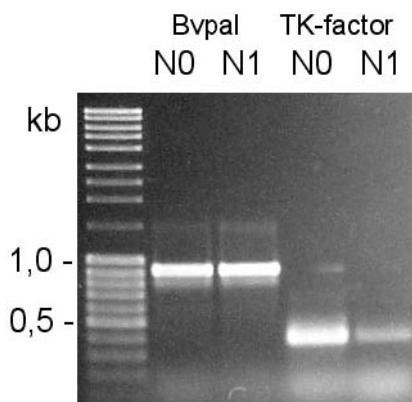
Ligations were electroporated into T1 Phage resistant TransformMax<sup>TM</sup> EC100<sup>TM</sup> (Epicentre) electro-competent cells. After transformation, glycerol was added to a final concentration of 16% (v/v) and the cells were frozen at – 70°C. After a freeze-thaw cycle, the titer of the library was determined. In total, a number of 1.400.000 recombinant clones was achieved.

For library amplification 500 ml of ampicillin-containing LB-medium was inoculated with the normalized primary library and plasmid-containing cells were grown to an OD600 of 0,5. Prior to freezing at – 70 °C glycerol was added to a final concentration of 16%. After a freeze-thaw cycle, the titer was determined to be about 15.000 cfu/µl. The amplified library is delivered in 16 aliquots of 45 ml and 4 aliquots of 1 ml

#### Quality control Gene-specific PCR analysis

To analyze the quality of the N0- and N1-cDNA and the success of the normalization process we performed gene-specific PCR using the customer-provided primer pairs PA-1/Pa-2 and OH15 sense/OH15rev3 that generate a 925 bp fragment of the Bvpal-cDNA and a 374 bp fragment of the Beta-specific transcription factor cDNA.

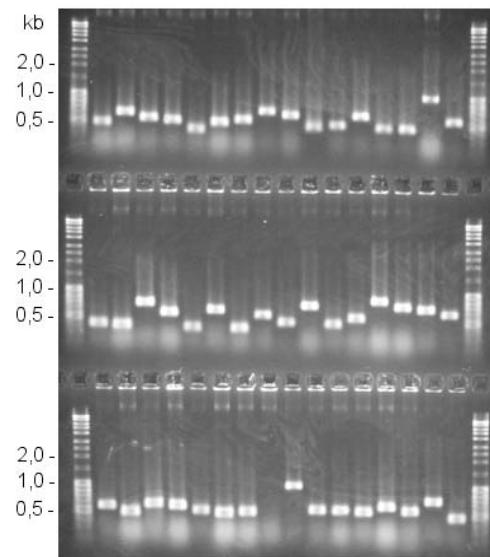
The PCR-products obtained from 10 ng N0- and N1-cDNA after 28 (Bvpal-cDNA) and 26 (Beta-specific transcription factor) cycles under the conditions recommended by the customer were checked by agarose gel electrophoresis (see Fig. 3). The results of the gene specific PCR analysis suggest higher expression of the Beta-specific transcription factor mRNA in comparison to that of the Bvpal mRNA. Accordingly, the relative abundance of the transcription factor is decreased in the normalized cDNA while that of Bvpal-cDNA remains unchanged.



**Figure 3:** Relative abundance of a 925 bp Bvpal fragment and a 374 bp fragment of the Beta-specific transcription factor in the N0- and N1-cDNA from *Beta maritima* as obtained after 28 and 26 PCR cycles from equal amounts (10 ng) of cDNA.

Colony PCR analysis of the primary N1-cDNA library and determination of mean insert size. With 48 randomly chosen clones of the primary cDNA library colony PCR analysis was performed. PCR reactions were carried in with the 5'-PCR primer used for cDNA amplification and a primer binding 40 bp downstream from the *Xho* I site in the vector. Therefore, together with the insert, 40 bp of the vector DNA are co-amplified.

PCR products were analyzed after 30 cycles on a 1,3% agarose gel (Fig. 4).



**Figure 4:** Colony PCR analysis. PCR products were run on a 1,3% agarose gel.

**Table 2:** Statistical evaluation of colony PCR

Insert size	Number	Percent
> 1000 bp	2	4
400 - 1000bp	45	94
< 400 bp	0	0
without insert	1	2

Mean insert size of the 48 clones analyzed: 600 bp

---

## Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Mark Varrelmann für die Überlassung des interessanten Themas, die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Bei Prof. Dr. Heiko Becker möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Mein Dank gilt auch der Gemeinschaft zur Förderung der privaten Pflanzenzüchtung (GFP) und der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen e.V. (AiF), die mich finanziell in dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich den ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pflanzenvirologie des Departments für Nutzpflanzenwissenschaften aussprechen, denn ohne sie wären die molekularen Arbeiten im Labor für mich um einiges schwieriger gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Zuckerrübenzüchterhäusern KWS SAAT AG, Strube-Dieckmann und Sygenta Seeds AB für die hilfreichen Sequenzierungs- und Kartierungsarbeiten meiner Kandidaten bedanken.

Besonderer Dank gebührt meiner Laborkollegin, Mitdoktorandin und der im Rahmen dieser Arbeit neu gewonnen guten Freundschaft mit Elke Nitschke, vor allem für ihre Diskussionsbereitschaft, das Korrekturlesen meiner Dissertation und den vielen gemeinsamen Erkundigungen in Göttingen.

Von ganzem Herzen möchte ich Grit Haseneyer für ihre Geduld, ihre Unterstützung, das offene Ohr zu jeder Zeit sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit und den immerwährenden Glauben an mich, danken.

---

Allen Mitarbeitern des Fachgebietes Pflanzenschutz und Pflanzenpathologie möchte ich besonders für die letzten Monate am IPP danken, denn ohne Euch wäre es zum Schluß nur halb so schön gewesen. Bei Nadine Riediger und Christina Eynck möchte ich mich vor allem für die vielen lustigen Stunden und gemeinsamen Aktivitäten bedanken.

Mein tiefer Dank gilt meinen Eltern, die immer für mich immer da sind und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

---

## **Verzeichnis der Publikationen und Tagungsbeiträge**

### **Publikationen:**

**Draghici, H.K.D., Pilot, R., Thiel, H. & Varrelmann, M. (2008)** Functional mapping of PVX RNA-dependent RNA-replicase using pentapeptide scanning mutagenesis – identification of regions essential for replication and subgenomic RNA amplification. *Virus Research*, in press.

**Peltier, C., Hleibieh, K. Thiel, H., Klein, E., Bragard, C. & Gilmer, D. (2008)** Molecular Biology of the Beet necrotic yellow vein virus. *Plant Viruses*, **2**, 14-24.

**Thiel H., Hleibieh, K., Gilmer, D. & Varrelmann M. (2009)** Beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor interacts with a sugar beet F-box protein from resistant and susceptible genotypes involved in the induction of a hypersensitive resistance response. submitted to *Journal of Virology*,

**Thiel, H. & Varrelmann, M. (2009)** Identification of beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor interacting sugar beet proteins which represent putative virus targets or components of plant resistance.

*Molecular Plant Microbe Interactions*, in press.

### **Poster und Präsentationen:**

**Thiel, H. & Varrelmann, M. (2006)** Etablierung eines YTH-Systems zur Charakterisierung der Interaktion zwischen beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) Pathogenitätsfaktor P25 und einer Rz2+Rz3 resistenten Zuckerrübe auf Proteinebene. *DPG-Arbeitskreis "Pflanzenvirologie"*, 29-31.03.2006 - Freudenstadt, Deutschland.

---

**Thiel, H. & Varrelmann, M. (2006)** Fishing for sugar beet proteins interacting with BNYVV RNA3 encoded P25 pathogenicity factor *IIRB Study group on "Pests and Diseases"*, 24.-26.05.2006 – Sevilla, Spanien.

**Thiel, H. & Varrelmann, M. (2006)** Etablierung eines "Yeast two-hybrid Systems" zur Charakterisierung der Interaktion zwischen beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) und Rz2+Rz3 resistenten Zuckerrübe auf Proteinebene. *55. Deutsche Pflanzenschutztagung*. 25. - 28. 09 2006 - Göttingen, Deutschland.

**Thiel, H. & Varrelmann, M. (2007)** "Yeast two hybrid" Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionen des Pathogenitätfaktors P25 des beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) mit Kandidaten einer cDNA -Bibliothek des Rübengenoms. *DPG - Arbeitskreis „Pflanzenvirologie“*, 29.-30.03.2007 – Quedlinburg, Deutschland.

**Thiel, H. & Varrelmann, M. (2008)** Sugar beet proteins interacting with RNA-3 encoded pathogenicity factor of Beet necrotic yellow vein virus. *71st IIRB Congress*. 13 - 14.02.2008. Brüssel, Belgien.

**Thiel, H. & Varrelmann, M (2008)** Protein-protein interaction screen of a sugar beet cDNA library identifies several proteins physically interacting with the beet necrotic yellow vein virus pathogenicity factor P25. *7. Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, 01.-04.09.2008 - Quedlinburg, Deutschland.

**Thiel, H. & Varrelmann, M. (2009)** The P25 pathogenicity factor of Beet necrotic yellow vein virus physically interacts with several sugar beet proteins possibly involved in virus pathogenicity or plant resistance. *35th General Meeting of the ASSBT*, 25-28.02.2009 - Orlando, USA.

**Thiel, H. & Varrelmann, M. (2009)** Applying P25 pathogenicity factor of beet necrotic yellow vein virus in yeast two-hybrid interaction hunt on the Rz2 sugar beet proteome identifies several candidate proteins possibly involved in virus

---

pathogenicity or plant resistance. Advances in Plant Virology - Harrogate International Centre, 01.-03.04.2009 - Harrogate, England.

**Thiel, H. & Varrelmann, M. (2009)** Protein-protein interaction screen of a sugar beet cDNA library with the beet necrotic yellow vein virus pathogenicity factor P25 identifies proteins possibly involved in virus pathogenicity and plant resistance response. *5th Joint meeting of Dutch and German Plant Virologists*, 08.-09.04.2009 - Hamburg, Deutschland.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Heike Thiel  
Geburtsdatum: 23.07.1976 in Gehrden

### Schulausbildung:

1983 – 1987 Grundschule Bordenau  
1987 – 1989 Orientierungsstufe Süd, Neustadt a. Rbge  
1989 – 1996 Gymnasium Neustadt a. Rbge.  
Abschluss: Abitur

### Berufsausbildung :

1996 - 1998 Ausbildung zur Gärtnerin,  
Fachrichtung Zierpflanzenbau  
Gärtnerei Ehlers-Ernst GmbH, Wunstorf/Steinh.  
**Abschluss: Gärtnerin**

### Studium:

1998 - 2003 Studium der Gartenbauwissenschaften  
an der Universität Hannover  
**Abschluss: Diplom- Agraringenieurin**  
10/1998 - 10/2000 Grundstudium  
10/2000 Vordiplom  
11/2000 - 10/2002 Hauptstudium  
11/2002 - 10/2003 **Diplomarbeit:**  
Untersuchungen zur Mikrosporenkultur bei  
*Arabidopsis thaliana* im Vergleich zu *Brassica napus*

### Anstellungen:

09/2004 - 09/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der  
Universität Göttingen,  
Department für Nutzpflanzenwissenschaften,  
AG Pflanzenvirologie

seit 10/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für  
Zuckerrübenforschung (IfZ), Göttingen

---

## **E r k l ä r u n g e n**

1. Hiermit erkläre ich, daß diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits anderen Prüfungsbehörden vorgelegen hat.

Weiter erkläre ich, daß ich mich an keiner anderen Hochschule um einen Doktorgrad beworben habe.

Göttingen, den .....

2. Hiermit erkläre ich eidesstattlich, daß diese Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

Göttingen, den .....