



Luise Dierker (Autor)

Interaktion des RNA2-kodierten Transportproteins (MP) des *Cherry leaf roll virus* (CLRV) mit dem viralen Hüllprotein (CP) und pflanzlichen Wirtsfaktoren

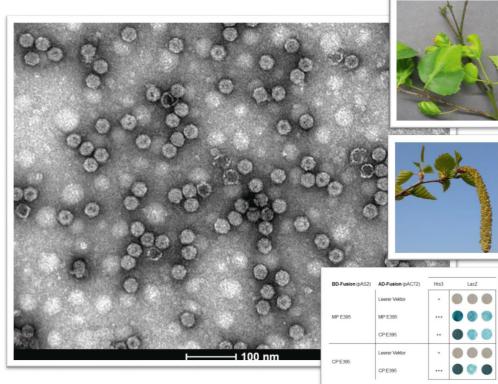
Berliner ökophysiologische
und phytomedizinische Schriften

Luise Dierker

Interaktion des RNA2-kodierten
Transportproteins (MP) des *Cherry*
leaf roll virus (CLRV) mit dem
virusen Hüllprotein (CP) und
pflanzlichen Wirtsfaktoren



Band 42



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7674>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Virus-Wirt-Beziehungen.....	1
1.2 Identifizierung von Virus-Virus- und Virus-Wirt-Interaktionen mit dem YTHS	2
1.2.1 Grundlagen der systemischen Infektion einer Wirtspflanze	2
1.2.2 Prinzip des YTHS	5
1.2.3 Anwendungsmöglichkeiten des YTHS	6
1.3 Das Modellsystem <i>Cherry leaf roll virus Arabidopsis thaliana</i>	7
1.3.1 <i>Cherry leaf roll virus</i>	8
1.3.2 Genomorganisation des CLRV	8
1.3.3 Aus- und Verbreitung des CLRV.....	9
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Chemikalien	12
2.2 Standardpuffer und Lösungen	12
2.3 Größenstandards	12
2.4 Enzyme und Proteine	13
2.5 Oligonukleotide	13
2.6 Viren und Organismen	15
2.6.1 CLRV-Isolate und Virusvermehrung	15
2.6.2 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Stämme	16
2.6.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>S. cerevisiae</i>)	16
2.6.4 Pflanzenmaterial und Untersuchungsstandorte	16
2.7 cDNA-Bibliothek, Vektoren und Konstrukte	17
2.7.1 cDNA-Bibliothek von <i>A. thaliana</i>	17
2.7.2 Vektoren und Konstrukte	17
2.8 Arbeit mit <i>E. coli</i>	18
2.8.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	18

2.8.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	19
2.8.2.1	Chemokompetente <i>E. coli</i> -Standardzellen.....	19
2.8.2.2	Chemokompetente <i>E. coli</i> -Proteinexpressionsstämme.....	19
2.8.2.3	Elektrokompetente <i>E. coli</i> -Zellen	20
2.8.3	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	20
2.8.3.1	Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	20
2.8.3.2	Elektroporation.....	20
2.8.4	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	21
2.8.4.1	Schnellplasmidisolierung	21
2.8.4.2	Plasmidisolierung über Silica-Säulen.....	21
2.9	Molekularbiologische Standardmethoden	21
2.9.1	RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial	21
2.9.1.1	Isolierung mit Silica-Säulen.....	21
2.9.1.2	Nukleinsäureisolierung nach Boom et al. (1990)	22
2.9.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	23
2.9.3	Reverse Transkription.....	23
2.9.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	23
2.9.4.1	PCR mit kommerziellen Polymerasen.....	23
2.9.4.2	Kolonie-PCR mit pTaq-Polymerase	23
2.9.5	Immunocapture-Reverse Transkriptase-PCR (IC-RT-PCR)	24
2.9.6	Agarose-Gelelektrophorese	25
2.9.7	Extraktion von PCR-Amplifikaten aus Agarosegelen	26
2.9.8	Restriktion.....	26
2.9.9	Ligation von PCR-Produkten	26
2.9.10	Sequenzierung.....	26
2.10	Arbeit mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> im Hefe Zwei-Hybrid System	27
2.10.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	27
2.10.2	Herstellung kompetenter Hefezellen und Transformation	28
2.10.3	Sequentielle Transformation einer cDNA-Bibliothek	29
2.10.4	Isolierung positiver Hefeklone.....	29
2.10.5	β-Galaktosidase Filtertest (LacZ)	30
2.10.6	DNA-Isolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	30

2.10.7 Transformation von Plasmiden aus <i>S. cerevisiae</i> in <i>E. coli</i>	31
2.11 Proteinchemische Methoden	31
2.11.1 Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	31
2.11.2 Reinigung (His_6) fusionierter Proteine.....	31
2.11.3 Aufreinigung von bakteriellen Einschlusskörpern aus <i>E. coli</i>	32
2.11.4 Colorimetrische Proteinbestimmung	33
2.11.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.11.5.1 Probenvorbereitung	33
2.11.5.2 Analytische SDS-PAGE	33
2.11.5.3 Coomassie-Färbung	34
2.12 Serologische Methoden	35
2.12.1 Verwendete Antikörper	35
2.12.2 Elektroblot-Immunoassay (EBIA)	35
2.12.3 Tissue Print.....	36
2.12.4 <i>Antigen-Coated-Plate-Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ACP-ELISA)</i>	37
2.12.5 Protein-Overlay Blot.....	37
2.12.6 Nachweis mit CDP-Star	37
2.12.7 Colorimetrischer Proteinnachweis auf Nitrocellulose-Membranen.....	38
2.13 Sekundärstrukturanalyse	38
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Charakterisierung der MP-kodierenden Region des CLRV	39
3.1.1 Strukturanalyse der MP-kodierenden Region des CLRV-Isolats E395	39
3.1.2 Konstruktion von MP-Deletionsmutanten.....	43
3.1.3 Generierung von Gal4-AD-/BD-Konstrukten der CLRV-Proteine MP und CP für YTH-Analysen	44
3.1.3.1 Kontrolle der Fusionsproteine auf direkte Transkriptionsaktivierung.....	46
3.1.3.2 Etablierung der Positiv- und Negativkontrollen	47
3.1.4 Interaktionsstudie mit den MP-Deletionsmutanten.....	47
3.2 Homo- und Heterodimerisierung CLRV-Proteine MP und CP	50
3.2.1 Homo- und Heterodimerisierung der Volllängenproteine MP und CP des Isolats E395.....	50
3.2.2 Interaktionsstudie mit den Volllängen-MP verschiedener CLRV-Isolate	51

3.3	Interaktion des CDRV-MP E395 mit anderen MP der 30 K Familie	52
3.4	Identifikation potentieller pflanzlicher Interaktionspartner aus <i>A. thaliana</i> Col-1	54
3.4.1	Überprüfung der spezifischen Interaktion der GAL4-BD-Fusionsproteine	54
3.4.2	Durchmusterung der cDNA-Bibliothek von <i>A. thaliana</i> Col-1 mit CDRV-Vollängenproteinen.....	55
3.4.3	Durchmusterung der cDNA-Bibliothek von <i>A. thaliana</i> Col-1 mit den MP-Deletionsmutanten $\Delta N1$ und $\Delta C2$	56
3.4.4	Sequenzanalyse der identifizierten pACT2-AD-Plasmide.....	58
3.4.5	Interaktion des CDRV-MP mit dem Protein At-4/1 aus <i>A. thaliana</i>	61
3.5	Heterologe Expression und Aufreinigung des MP von CDRV- E395.....	62
3.5.1	Klonierung des CDRV-MP	62
3.5.2	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> und Aufreinigung von rekombinanten CDRV-MP durch Affinitätschromatographie.....	63
3.5.2.1	Native Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose	63
3.5.2.2	Denaturierende Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose.....	66
3.5.2.3	Isolierung bakterieller Einschlusskörper und Renaturierung des MP	67
3.5.3	Bestätigung der MP-CP-Interaktion mittels Protein-Overlay-Blot.....	69
3.6	Herstellung eines Anti-Peptid Antikörpers gegen das CDRV-MP	70
3.6.1	Reaktion des Peptidantikörpers gegen Proteine im ACP-ELISA	71
3.6.2	SDS-PAGE und EBIA	75
3.6.3	Tissue Print.....	76
3.7	Nachweis von 4/1-Orthologen in Wirtspflanzen von CDRV	77
3.7.1	Nachweis mittels degenerierter Oligonukleotide	77
3.7.2	Nachweis mittels At-4/1-spezifischer Antikörper	81
3.8	Lokalisation von CDRV-Partikeln und dem viralen Transportprotein in männlichen und weiblichen Blütenständen von <i>Betula pendula</i>	83
3.8.1	Detektion und Lokalisation von CDRV in Blütenständen im Jahresverlauf	83
3.8.1.1	Symptomentwicklung	84
3.8.1.2	Molekularer Nachweis von CDRV	85
3.8.1.3	Lokalisation von CDRV-Partikeln mittels Tissue Print	86
3.8.2	Detektion des CDRV-MP in Blütenständen von <i>Betula pendula</i>	89
4	Diskussion	91



INHALTSVERZEICHNIS

5	Zusammenfassung	108
6	Summary.....	110
7	Literaturverzeichnis.....	112
8	Anhang	122