

# Identifizierung molekularer Faktoren des plasmodesmalen Makromolekül- und Assimilattransportes in Pflanzen

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Daniel Hofius

geb. am 08.06.1970 in Siegen

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. Uwe Sonnewald
2. Prof. Dr. Ulla Bonas
3. Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Halle (Saale), den 21. August 2003

**urn:nbn:de:gbv:3-000005949**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005949>]

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Assimilattransport in Pflanzen.....	1
1.2	Ausbreitung von Viren in Pflanzen .....	3
1.2.1	Zell-zu-Zell Transport .....	3
1.2.2	Langstreckentransport .....	6
1.3	Einfluss von Virusinfektionen auf den Wirtsmetabolismus und den Transport von Phototassimilaten.....	7
1.4	Expression viraler Transportproteine in transgenen Pflanzen .....	8
1.4.1	TMV-MP .....	9
1.4.2	PLRV-MP17.....	9
1.5	Komponenten des plasmodesmalen Transportweges .....	11
1.6	Transportmutanten .....	13
1.7	Zielsetzung der Arbeit .....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien .....	17
2.2	Pflanzenmaterial und Anzucht.....	17
2.2.1	<i>Nicotiana tabacum</i> .....	17
2.2.2	<i>Solanum tuberosum</i> .....	17
2.2.3	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
2.3	Pflanzentransformation.....	18
2.4	Oligonukleotide und Sequenzierungen.....	19
2.5	Allgemeine Klonierungsverfahren.....	19
2.6	Bakterien-/Hefestämme und Vektoren .....	19
2.7	RNA-Isolierung und <i>Northern Blot</i> -Analyse.....	21
2.8	Reverse Transkription und semiquantitative RT-PCR .....	21
2.9	Orts-gerichtete Mutagenese von cDNA mittels PCR .....	22
2.10	„RACE“-PCR .....	23
2.11	Durchmusterung von Phagen cDNA-Bibliotheken .....	23
2.12	<i>Western Blot</i> -Analyse und Quantifizierung von Immunosignalen .....	23

2.13	Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Preparation von Enzymextrakten.....	24
2.14	Protein-Interaktionsanalysen mit dem Zwei-Hybrid System in Hefe.....	25
2.15	Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten und Stärke.....	26
2.16	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes .....	26
2.17	Virusinfektion und immunologische Bestimmung des Virustiters.....	26
2.18	Farbstoff-gekoppelte Mikroinjektionen.....	27
2.19	Bestimmung von Chlorophyllfluoreszenz und Photosyntheseraten .....	28
2.20	Fluoreszenzmikroskopie .....	28
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Analysen zur Wirkungsweise des <i>Potato leafroll virus</i> Movement Proteins (PLRV-MP17) auf symplastische Transportprozesse in transgenen Pflanzen .....</b>	<b>29</b>
3.1.1	Konstitutive Expression von MP17 und MP17:GFP in <i>Nicotiana tabacum</i> .....	30
3.1.1.1	Verifizierung der MP17:GFP-Expression in transgenen Tabaklinien.....	30
3.1.1.2	Subzelluläre Lokalisierung von MP17 und MP17:GFP.....	32
3.1.1.3	Bestimmung der plasmodesmalen Permeabilität mittels Mikroinjektionen.....	35
3.1.1.4	Korrelation zwischen MP17-Proteingehalten und Kohlenhydratstatus .....	37
3.1.1.5	Resistenzeigenschaften gegenüber der Infektion mit PVY .....	39
3.1.2	Induzierbare Expression von MP17 und MP17:GFP in <i>Nicotiana tabacum</i> .....	43
3.1.2.1	Konstrukte zur Ethanol-induzierbaren Expression von MP17 und MP17:GFP.....	44
3.1.2.2	Primärcharakterisierung AlcMP17 und AlcMP17:GFP transgener Linien.....	46
3.1.2.3	MP17-Expressionskinetik und Phänotypentwicklung nach Ethanol-Induktion.....	47
3.1.2.4	Änderungen des Kohlenhydratstatus nach Ethanol-Induktion von MP17 .....	51
3.1.2.5	Änderungen der Genexpression nach Ethanol-Induktion von MP17.....	53
3.1.2.6	Resistenzeigenschaften gegenüber der Infektion mit PVY .....	56
3.1.2.7	Subzelluläre Lokalisierung von MP17 nach Ethanol-Induktion .....	57
3.1.3	Etablierung eines genetischen Systems zur Identifizierung von <i>Arabidopsis</i> - Mutanten mit potentiellen Defekten in pflanzlichen MP17-Rezeptoren.....	59
3.1.3.1	Phänotyp und Kohlenhydratstatus in MP17 transgenen <i>Arabidopsis</i> C24.....	60
3.1.3.2	Phänotyp und Kohlenhydratstatus in MP17:GFP transgenen <i>Arabidopsis</i> Col-0 .....	62
3.1.3.3	Subzelluläre Lokalisierung von MP17:GFP.....	64
3.1.3.4	Strategie zur Isolierung von MP17-Suppressormutanten und Optimierung des Testsystems .....	66
3.1.3.5	EMS-Mutagenese einer MP17:GFP transgenen <i>Arabidopsis</i> -Linie.....	68
3.1.3.6	Identifizierung und Primärcharakterisierung von MP17-Suppressormutanten.....	68

<b>3.2</b>	<b>Analysen zur Interaktion des potyviralen Capsid Proteins mit pflanzlichen Wirtsfaktoren während der Infektion mit <i>Potato virus Y</i></b> .....	<b>72</b>
3.2.1	Identifizierung eines PVY CP interagierenden Proteins aus Tabak (NtCPIP1) und Charakterisierung der Interaktion im Hefe Zwei-Hybrid System .....	72
3.2.1.1	Isolierung von NtCPIP1 und Verifizierung der Interaktion mit PVY CP .....	73
3.2.1.2	Analysen zur Spezifität der Interaktion zwischen PVY CP und NtCPIP1 .....	76
3.2.1.3	Mutations- und Deletionsanalysen von PVY CP und NtCPIP1 zur Identifizierung essentieller Bindungsdomänen .....	77
3.2.2	Verifizierung der <i>in planta</i> Bedeutung der Interaktion durch RNA-Silencing von NtCPIP1 und PVY Infektion transgener Pflanzen .....	79
3.2.2.1	Konstrukt zum RNA-Silencing (RNAi) von NtCPIP1 in Tabak.....	80
3.2.2.2	Verifizierung des Silencing von NtCPIP1 durch <i>Northern</i> -Analyse und RT-PCR.....	80
3.2.2.3	PVY-Infektion von NtCPIP1-RNAi transgenen Tabaklinien .....	82
3.2.2.4	Analyse der Stabilität des RNA-Silencing nach PVY Infektion .....	83
3.2.2.5	Analyse PVY CP-bindender Isoformen von NtCPIP1 .....	84
<b>3.3</b>	<b>Funktionelle Analyse des <i>SXD1</i> (<i>sucrose export deficient 1</i>) Proteins in transgenen Kartoffelpflanzen</b> .....	<b>86</b>
3.3.1	Klonierung eines orthologen <i>SXD1</i> -Gens aus <i>Solanum tuberosum</i> und Verifizierung der Enzymaktivität <i>in vitro</i> .....	86
3.3.2	RNA-Silencing (RNAi) von <i>StSXD1</i> in Kartoffeln und Charakterisierung transgener Linien .....	88
3.3.3	Einfluss verminderter Tocopherolgehalte auf die Stresstoleranz und Photosyntheserate in transgenen Pflanzen.....	90
3.3.4	Einfluss des Tocopherol-Cyclase/ <i>SXD1</i> -Proteins auf den Assimilattransport .....	93
3.3.5	Ultrastruktur und Kallose-Markierung von Plasmodesmen in Vitamin E-defizienten Pflanzen .....	95
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>97</b>
<b>4.1</b>	<b>Wirkungsweise von PLRV-MP17 auf plasmodesmale Transportprozesse und Etablierung eines genetischen Systems zur Identifizierung von MP17-Interaktoren</b> .....	<b>98</b>
4.1.1	Assoziation von MP17 mit verzweigten Plasmodesmen und Modifikation der plasmodesmalen Leitfähigkeit.....	98
4.1.2	Dosisabhängige Modulation des Kohlenhydratstatus und der Virusresistenz.....	100

4.1.3	Venöse Phänotypentwicklung und Modulation <i>sink</i> -assoziierter Transportprozesse nach Ethanol-induzierter MP17-Expression.....	102
4.1.4	Plasmodesmale Affinität von MP17 und Beeinflussung des Assimilatexportes in <i>Arabidopsis</i> .....	108
4.1.5	Identifizierung von MP17-Suppressormutanten mit potentiellen Defekten in MP17-Interaktionspartnern.....	110
<b>4.2</b>	<b>Identifizierung eines DnaJ-ähnlichen Proteins als Capsid Protein-bindenden Wirtsfaktor für die Ausbreitung von Potyviren .....</b>	<b>113</b>
4.2.1	Spezifität der Interaktion zwischen PVY CP und NtCPIP1 und Identifizierung von Interaktionsdomänen .....	114
4.2.2	Transiente und lokale Virusresistenz gegenüber PVY in <i>NtCPIP1</i> -inhibierten Pflanzen .....	116
4.2.3	Mögliche Rolle von molekularen Chaperonen beim intrazellulären und plasmodesmalen Transport von Potyviren .....	118
<b>4.3</b>	<b>Funktionelle Analyse des <i>SXDI</i>-Orthologs in Kartoffeln zeigt eine essentielle Rolle der Tocopherol Cyclase für den plasmodesmalen Assimilattransport .....</b>	<b>120</b>
4.3.1	<i>SXDI</i> -Ortholog in Kartoffel kodiert eine Tocopherol Cyclase .....	120
4.3.2	Verminderte Stresstoleranz in Tocopherol-defizienten Kartoffelpflanzen .....	121
4.3.3	Inhibierung des Assimilatexportes in <i>SXDI</i> -supprimierten Kartoffelpflanzen .....	122
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>130</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>I</b>
	I. Sequenzen .....	i
	II. Sequenzvergleich von <i>SXD1</i> -Proteinen .....	v
	III Oligonukleotide .....	vi