

# 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<br>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<br/>(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> -<br>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<br>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         |

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Assimilattransport in Pflanzen

Die in Mesophyllzellen ausgewachsener Blätter (*source*-Organe) synthetisierten Photoassimilate - Kohlenhydrate und Aminosäuren - sind die Energieträger des pflanzlichen Stoffwechsels und bilden die Bausteine für Wachstum und Entwicklung in allen nicht-photosynthetisch aktiven Geweben wie jungen Blättern, Wurzeln, Blüten und Samen (*sink*-Organe). Dabei müssen die Assimilate innerhalb des Blattes zunächst durch mehrere Zellschichten in Richtung der kleinen Leitbündel („minor veins“) transportiert werden, wo sie in das Phloemgewebe beladen und anschließend mit dem Massenstrom in der Pflanze verteilt werden. Saccharose stellt die Haupttransportform von Kohlenhydraten in den meisten höheren Pflanzen dar und erfüllt somit die Funktion eines Bindeglieds zwischen *source*- und *sink*-Geweben (Turgeon, 1989). Der Transport von Saccharose aus dem Mesophyllgewebe über die Bündelscheiden- in die Phloemparenchymzellen erfolgt in der Regel auf symplastischem Wege mittels Diffusion durch die Plasmodesmen (PDs), die interzellulären, cytoplasmatischen Verbindungen, die zwischen diesen Zelltypen in relativ großer Dichte auftreten. Die anschließende Beladung in den Geleitzell-Siebelement-Komplex (GZ/SE-Komplex) verlangt bei den meisten Pflanzen der gemäßigten Breiten einen apoplastischen Schritt und somit die Funktion passiver und aktiver membranständiger Transportsysteme, da diese Pflanzen nur über sehr wenige plasmodesmale Verbindungen zwischen den Phloemparenchymzellen und den Geleitzellen verfügen (Evert und Russin, 1993; van Bel, 1993). Die Saccharose gelangt dabei zunächst in den apoplastischen Raum und wird von dort aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten über einen Saccharosetransporter in den GZ/SE-Komplex transportiert (Riesmeier *et al.*, 1992; Riesmeier *et al.*, 1994). Dabei erfolgt der Saccharosetransport im Symport mit Protonen, die durch die Aktivität einer in der Plasmamembran der Geleitzellen lokalisierten Protonen-ATPase in den Apoplasten gepumpt werden. Der Photoassimilatexport aus dem *source*-Gewebe könnte somit durch Modifikation biochemischer Stoffwechselwege (z.B. Saccharose- und Stärkesynthese), die Veränderung von Membrantransporteigenschaften sowie die plasmodesmale Leitfähigkeit reguliert werden (Schobert *et al.*, 2000). Mit Hilfe molekulargenetischer Ansätze konnte die Rolle der im GZ/SE-Komplex lokalisierten Saccharosetransporter und ATPasen eindeutig belegt werden

(Kühn *et al.*, 1996; Lemoine *et al.*, 1996; Bürkle *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2000). Demgegenüber ist der Anteil des symplastischen Transportweges an der Regulation des Saccharoseexportes aus den Blättern weit weniger verstanden (Stitt 1996; Schobert *et al.*, 2000). Die Analyse wird vor allem dadurch erschwert, dass über die Proteinzusammensetzung und die kodierenden Gene der PDs nur sehr wenig bekannt ist, was den genetischen Zugang über die Manipulation des plasmodesmalen Transportweges bisher weitestgehend verschließt.

Die Phloementladung der Photoassimilate in die *sink*-Gewebe kann in Abhängigkeit von der Pflanzenspezies, dem Gewebetyp und dem Entwicklungszustand entweder einer ausschließlich symplastischen Route folgen oder aber einen apoplastischen Schritt beim Übergang vom GZ/SE-Komplex zu den umgebenden *sink*-Parenchymzellen bzw. zwischen verschiedenen Typen von Parenchymzellen während des Postphloem-Transportes enthalten (Turgeon *et al.*, 1989; Patrick 1997). Bei der symplastischen Entladung diffundiert die vom Massenstrom angelieferte Saccharose aus den GZ/SE-Komplexen in das umgebende *sink*-Gewebe entlang eines Konzentrationsgefälles durch die PDs. Dabei wird die Saccharose zur Aufrechterhaltung des Gradienten in Stärke umgewandelt, oder unverändert bzw. nach Spaltung in Hexosen in der Vakuole zwischengelagert. Im Falle der apoplastischen Entladung gelangt die Saccharose zunächst mit Hilfe eines *sink*-spezifischen Saccharose-Transporters oder aber nach Invertase-katalysierter Spaltung in Glucose und Fructose über Plasmamembran-lokalisierte Hexosetransporter in die umgebenden *sink*-Zellen. Der *sink*-Bedarf (*sink*-Stärke) an Kohlenhydraten sowie die Effizienz des Saccharosestoffwechsels in *sink*-Organen wird dabei als ein weiterer Kontrollpunkt für den Assimilattransport in der Pflanze betrachtet (Ho, 1988). So konnte durch Manipulation des Saccharosestoffwechsels in *sink*-Organen die Assimilatverteilung in transgenen Pflanzen verändert werden, was sich nachhaltig auf die Synthese von Speicherstoffen und den Ertrag auswirkte (Herbers und Sonnwald, 1998).

In den letzten Jahren ist im Hinblick auf die Regulation des Assimilattransportes zwischen *source* und *sink* ein Konzept in den Mittelpunkt gerückt, wonach Pflanzen über ein endogenes Kommunikationssystem verfügen, mit dem durch Austausch regulatorischer Makromoleküle physiologische und entwicklungspezifische Prozesse gesteuert werden (Lucas und Wolf, 1999, Ruiz-Medrano *et al.*, 2001). Zentrale Bedeutung hat dabei offensichtlich der kontrollierte Zell-zu-Zell und systemische Transport von Informationsmolekülen (Proteine und RNA) über die PDs und das Phloem (Jorgensen *et al.*, 1999; Crawford und Zambryski, 1999; Ruiz-Medrano *et al.*, 1999; Haywood *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2002). Einen entscheidenden Beitrag leisteten dabei Ergebnisse zu der Ausbreitung von Viren in Pflanzen,

die im wesentlichen dem Transportweg der Photoassimilate von *source* nach *sink* folgen (Leisner und Turgeon, 1993; Roberts *et al.*, 1997).

## 1.2 Ausbreitung von Viren in Pflanzen

Die erfolgreiche systemische Infektion einer Pflanze durch Viren erfordert sowohl den effizienten Zell-zu-Zell Transport von infektiösem Material innerhalb des lokal infizierten Blattes, als auch den Langstreckentransport des Virus über das Phloem in weiter entfernte Blätter und Organe (zusammengefasst in Carrington *et al.*, 1996; Gilbertson und Lucas 1996; Nelson und van Bel 1998).

### 1.2.1 Zell-zu-Zell Transport

Der Kurzstreckentransport von Viren erfolgt durch PDs entlang des Infektionsweges von einer zumeist mechanisch infizierten Epidermiszelle über Mesophyll, Bündelscheide und vaskuläres Parenchym in den GZ/SE-Komplex, von wo es mit dem Assimilatstrom in der Pflanze verteilt wird. Zu diesem Zweck kodieren die meisten Virusfamilien Transportproteine („Movement Proteins“, MPs), die durch Interaktion mit PDs den Zell-zu-Zell Transport von Virusmaterial ermöglichen (Goshroy *et al.*, 1997; Lazarowitz und Beachy, 1999). MPs sind in der Lage, das plasmodesmale Ausschlussvermögen für Makromoleküle erheblich zu erhöhen, virale Nukleinsäuren zu binden und diese aktiv in Form eines Ribonucleoprotein-Komplexes oder Viruspartikels von Zelle zu Zelle zu transportieren. Dieser MP-vermittelte Transport von Virusgenomen durch die PDs setzt sich aus einer Serie von Prozessen zusammen, die eine Interaktion von MPs mit anderen Virusproteinen und pflanzlichen Wirtsfaktoren umfasst (Lazarowitz, 1999). Das koordinierte Zusammenspiel dieser Komponenten ist in verschiedenen Virusfamilien unterschiedlich gelöst, weshalb die folgenden Strategien zur MP-Funktion diskutiert werden:

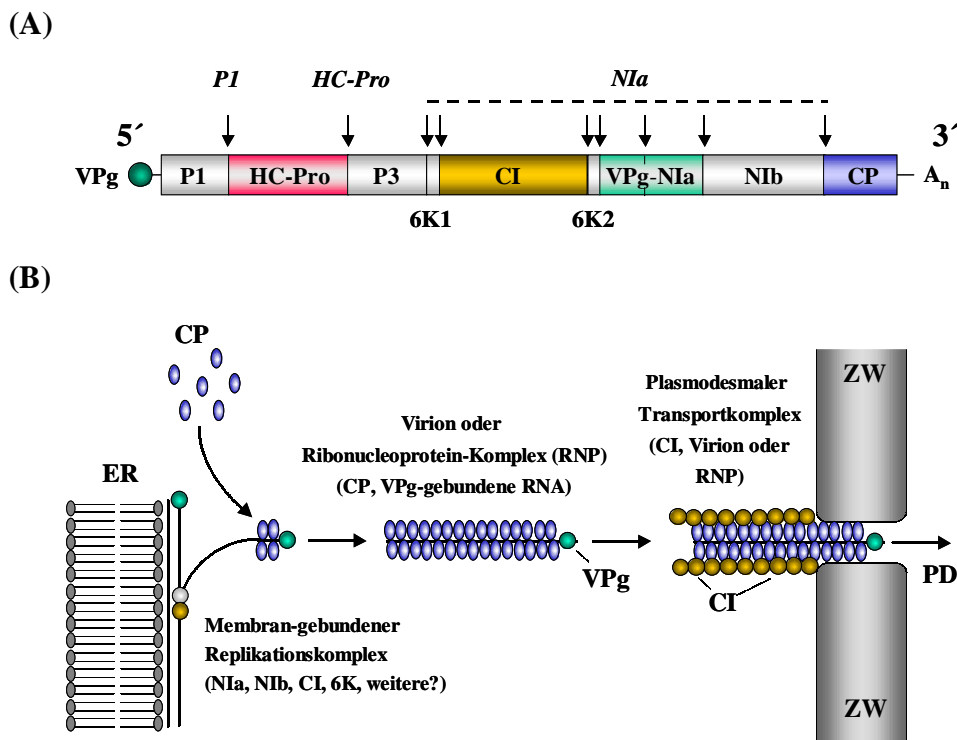
- (1) Virusfamilien mit einem *Tobamovirus*-ähnlichen Mechanismus (u.a. *Tobacco mosaic virus*, TMV) benötigen nur die Wirkung eines einzelnen nicht-strukturellen MP, das direkt das Virusgenom bindet und dieses als Ribonucleoprotein-Komplex nach Modifikation der PDs in die Nachbarzellen transportiert. Der intrazelluläre Transport der MP-RNA-Komplexe in Richtung der PDs erfolgt dabei vermutlich durch transiente Interaktion mit Komponenten des Cytoskeletts (Heinlein *et al.*, 1995; McLean *et al.*, 1995) und des endoplasmatischen Retikulums (Heinlein *et al.*, 1998; Reichel *et al.*, 1999).



- (2) Einige Virusgruppen verfügen über eine Reihe verschiedener MPs, die im Falle der *Potexviren* vom sogenannten „triple gene block“ kodiert werden und koordinativ unter Beteiligung des Capsid Proteins (CP) zum Transport des Virusgenoms durch die PDs beitragen. *Closteroviren* benötigen außerdem ein Virus-kodiertes HSP70 Homolog, das sowohl mit PDs assoziiert als auch an Mikrotubuli bindet, womit ein direkter Zusammenhang zwischen intra- bzw. interzellulärem Virustransport und Hitzeschockproteinen (Chaperone) gezeigt wurde (Karasev *et al.*, 1992; Medina *et al.*, 1999; Alzhanova *et al.*, 2001).
- (3) Alternativ erfolgt bei verschiedenen Virusfamilien, wie z.B. den *Tospoviren*, der Transport des Virusgenoms als subvirale oder virale Partikel durch MP-induzierte Tubuli, die sich durch strukturell modifizierte PDs in die Nachbarzelle erstrecken. Die direkte Interaktion des *Tomato spotted wilt virus* MP (NSm) mit einem Myosin/Kinesin-ähnlichen Protein sowie Vertretern der HSP70-aktivierenden DnaJ-Proteine, legt dabei die Beteiligung des Cytoskeletts und molekularer Chaperone am Virustransport nahe (Soellick *et al.*, 2000; von Bargen *et al.*, 2001).

Für die Familie der *Potyviren* bleibt hingegen der Zell-zu-Zell Transport in vielen Bereichen ungeklärt (Revers *et al.*, 1999; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001; Kellmann, 2001). Im Unterschied zu den meisten anderen Viren kodieren sie nicht für ein spezifisches MP, sondern Transportfunktionen wurden für verschiedene Virusproteine gezeigt, die während des Infektionszyklus eine multifunktionale Rolle einnehmen. Dabei handelt es sich um das „Viral Genome-linked“ Protein (VPg), die „Helper-component“ Proteinase (HC-Pro), das „Cylindrical Inclusion“ (CI) Protein sowie das Capsid Protein (CP). Gebildet werden diese Proteine aus einem einzelnen Polyprotein, das von einem einzelsträngigen RNA-Genom kodiert und durch viruseigene Proteinasen gespalten wird (Abb. 1A). So wurden im Falle des CP neben der Beteiligung am Kurzstreckentransport, spezifische Funktionen bei der Genomamplifizierung, der Blattlausübertragung, der Virusassemblierung sowie dem Langstreckentransport postuliert. Die Rolle während des Zell-zu-Zell Transportes leitet sich daraus ab, dass zum einen für die Ausbildung des Transportkomplexes ein Assemblierungskompetentes CP erforderlich ist (Dolja *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1995) und zum anderen die Interaktion mit PDs und die CP-vermittelte Erweiterung des plasmodesmalen Anschlussvermögens gezeigt werden konnte (Rojas *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurde für das CI-Protein, einer an der Genomreplikation beteiligten RNA-Helicase, die essentielle Bedeutung beim Zell-zu-Zell Transport genetisch über eine systematische Mutationsanalyse

nachgewiesen (Carrington *et al.*, 1998). Es wurde ein Modell postuliert, wonach CI Strukturen einen PD-assoziierten Kanal ausbilden, durch den der CP-umhüllte Transportkomplex nach CP-induzierter Erweiterung des plasmodesmalen Ausschlussvermögens transloziert wird (Carrington *et al.*, 1998, Abb. 1B).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Genomstruktur (A) nach Urcuqui-Inchima *et al.* (2001) sowie des postulierten Zell-zu-Zell-Transportes von Potyviren (B) nach Carrington *et al.* (1998).

(A) Potyviren haben ein einzelsträngiges RNA-Genom von etwa 10 kb Länge. Die RNA ist am 3'-Ende polyadenyliert (A<sub>n</sub>) und am 5'-Ende kovalent mit dem viralen „Genome-linked“ Protein (VPg) verbunden. Die RNA kodiert ein einzelnes Polyprotein, das durch Virus-kodierte Proteinasen proteolytisch in die angezeigten 9 funktionellen Proteine gespalten wird. Die Positionen, an denen die viralen Proteinasen das Polyprotein schneiden, ist durch Pfeile angezeigt. Proteine mit Transportfunktion (farbig unterlegt) sind die kombinierte VPg-Proteinase (NIa, „Nuclear Inclusion a“), die „Helper-Component“ Proteinase (HC-Pro), die außerdem RNA-Silencing Suppressoraktivität besitzt und als Blattlausübertragungsfaktor wirkt, das „Cylindrical Inclusion“ (CI) Protein und das Capsid Protein (CP). Weitere Funktionen wurden für das NIb Protein („Nuclear Inclusion“ b, RNA-abhängige RNA-Polymerase) und das 6K2 Protein (Membranverankerung des viralen Replikationskomplexes) beschrieben.

(B) Neusynthetisierte Genome für den Zell-zu-Zell-Transport assoziieren mit dem Capsid Protein in Form eines Virions oder eines Ribonucleoprotein-Komplexes. Das Virion bzw. der Komplex interagiert mit einem PD-assoziierten und aus CI-Einheiten gebildeten Kanal und wird durch diesen möglicherweise nach CP-vermittelter Erweiterung des plasmodesmalen Ausschlussvermögens (Rojas *et al.*, 1997) in die Nachbarzelle transportiert. ER, Endoplasmatisches Retikulum; ZW, Zellwand; PD, Plasmodesma.

## 1.2.2 Langstreckentransport

Der Eintritt in das Phloemgewebe ist der kritische Schritt für die systemische Ausbreitung von Viren und ist damit wohl ein bestimmender Faktor bei der Wirtsspezifität (zusammengefasst in Gilbertson und Lucas 1996, Thompson und Schulz 1999). Als entscheidende Barriere für viele Viren scheinen dabei die PDs zwischen Bündelscheiden und/oder Phloemparenchymzellen und GZ/SE-Komplexen zu fungieren, was fundamentale Unterscheide der plasmodesmalen Struktur innerhalb des Mesophylls und der vaskulären Bündel vermuten lässt (Wang *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 1998).

Sobald die Viren den GZ/SE-Komplex erreichen, werden sie mit dem Assimilatstrom in die *sink*-Gewebe verfrachtet, wobei in vielen Fällen intakte Viruspartikel transportiert werden (Nelson and van Bel 1998; Simón-Buela and Garcia-Arenal 1999; Oparka and Santa Cruz 2000). Aus diesem Grund hat das Capsid Protein (CP) essentielle Bedeutung für den Langstreckentransport vieler Viren (z.B. TMV), aber auch die Mitwirkung weiterer Virusproteine ist an einigen Beispielen belegt (Cronin *et al.*, 1995; Carrington *et al.*, 1996; Ryabov *et al.*, 1999). Daneben spielt vermutlich die Interaktion von Virusfaktoren mit endogenen Komponenten des Langstreckentransportes eine wichtige Rolle, denn über das Phloem werden nicht nur Photoassimilate, sondern eine Vielzahl an Proteinen und RNA-Spezies transportiert, denen eine Rolle als Informationsmoleküle bei der Entwicklung und Regulation physiologischer Prozesse zugesprochen wird (Lucas and Wolf 1999; Ruiz-Medrano *et al.*, 2001). Interessanterweise werden diese Phloemproteine durch PDs aus den Geleitzellen in die Siebelemente transloziert und sind in der Lage, die plasmodesmale Leitfähigkeit von Mesophyllzellen ähnlich wie virale MPs zu erhöhen (Balachandran *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang wurde ein pflanzliches Paralog (CmPP16) zu viralen MPs von Xoconostle-Cázares *et al.* (1999) isoliert, das RNA-Bindungskapazität besitzt und den Transport von RNA über das Phloem vermittelt. Die Aktivität dieser Proteine im GZ/SE-Komplex führt offensichtlich zu einem gegenüber PDs im Mesophyll deutlich erhöhten molekularen Ausschlussvermögen (Kempers und van Bel, 1997), was den Transport nicht-pflanzlicher Proteine wie GFP aus den Geleitzellen in die Siebelemente und von dort in wachsende *sink*-Gewebe ermöglicht (Imlau *et al.*, 1999). Dort geschieht die Entladung der endogenen Makromoleküle symplastisch über unverzweigte primäre, einfache PDs, die ein hohes Ausschlussvermögen (<50 kDa) haben und somit den passiven Durchtritt eines Großteils der Phloemproteine (10-40 kDa), so auch von GFP, erlauben (Oparka *et al.*, 1999;

Oparka and Santa Cruz 2000). Die meisten Viren werden entsprechend aus dem GZ/SE-Komplex in *sink*-Gewebe entladen, doch erfordert die weitere Ausbreitung in das Postphloem-Gewebe die Wirkung spezifischer Transportfaktoren (Santa Cruz, 1999).

### 1.3 Einfluss von Virusinfektionen auf den Wirtsmetabolismus und den Transport von Phototassimilaten

Die suszeptible Infektion einer Pflanze mit Viren führt häufig neben der Entwicklung systemischer Symptome zu starken Veränderungen im Wirtsmetabolismus. So wurde die Akkumulation von Kohlenhydraten, der Anstieg in der Atmungsrate, eine Verminderung der Photosynthesekapazität, sowie erhöhte Gehalte an Aminosäuren und organischen Säuren beschrieben (Goodmann *et al.*, 1986; Fraser, 1987; Balachandran *et al.*, 1997; Herbers *et al.*, 2000). Außerdem konnte der Anstieg von Transkripten der apoplastischen Zellwand-Invertase in virusinfiziertem Gewebe beobachtet werden (Sturm und Tang, 1999; Herbers *et al.*, 2000), was auf eine erhöhte Kapazität zum Kohlenhydratimport in das betroffene Gewebe schließen lässt. Diese Änderungen in Photosynthese, Kohlenhydratverteilung und Genexpression lassen sich daher als Umstellung von *source*- auf *sink*-Metabolismus interpretieren. Allerdings konnte mit detaillierten biochemischen, physiologischen und histochemischen Studien am Beispiel der Infektion von Kürbiskotyledonen mit dem *Cucumber mosaic virus* (CMV) gezeigt werden, dass die metabolischen Änderungen in Abhängigkeit von der Virusreplikation eine hohe raum-zeitliche Komplexität aufweisen und sich das befallene Gewebe nicht generell als einheitlicher *sink* darstellt (Tésci *et al.*, 1996). Neuere Untersuchungen an CMV-infizierten Melonen zeigen zudem einen Einfluss der Virusinfektion auf den Assimilattransport über das Phloem (Shalitin und Wolf, 2000). So konnte ein signifikanter Anstieg an Saccharose gegenüber der vorherrschenden Zuckertransportform Stachyose im Phloemsaft infizierter Pflanzen detektiert werden. Da *Cucurbitaceen* in der Regel eine symplastische Phloembeladung aufweisen (Turgeon, 1991; Grusak *et al.*, 1996), wurde ein Umschalten von einer symplastischen auf eine apoplastische Beladung, möglicherweise durch einen CMV-MP vermittelten Block des plasmodesmalen Transportweges, postuliert (Shalitin und Wolf, 2000).

Neben der direkten Auswirkung von Virusinfektionen auf die Expression von Genen, die am Metabolismus beteiligt sind (Wang und Maule, 1995), werden häufig Gene induziert, die Abwehrfunktion haben und beispielsweise für „pathogenesis-related“ (PR)-Proteine kodieren (White und Antoniw, 1991). Die zugrundeliegenden Mechanismen der Virus-vermittelten

Genexpression können vielfältig sein und Signalmoleküle wie Salicylsäure beinhalten (Yalpani *et al.*, 1991; Yalpani *et al.*, 1993). Daneben wurde löslichen Zuckern, die an den Infektionsstellen akkumulieren, eine wichtige Rolle bei der Genregulation zugesprochen. So konnte in transgenen Pflanzen, die infolge der Expression einer apoplastischen Hefe-Invertase lösliche Zucker akkumulieren (von Schaewen *et al.*, 1990), gleichzeitig aber durch Einkreuzen der bakteriellen Salicylat-Hydroxylase (*nahG*) kein aktives Salicylat produzieren, eine Zucker-vermittelte und Salicylat-unabhängige Pflanzenabwehr detektiert werden, die zu einer erhöhten Resistenz gegenüber PVY führte (Herbers *et al.*, 2000). Neben der Induktion Abwehr-relevanter Gene wurde am Beispiel der Infektion mit Potyviren gezeigt, dass in direkter Abhängigkeit von der Virusreplikation Transkripte für das Hitzeschockprotein 70 (*Hsp70*) sowie Polyubiquitin (*Pub*) akkumulieren (Aranda *et al.*, 1996). Die Bedeutung dieser Gene für die Virusmultiplikation, die Virusausbreitung oder die Entwicklung von Symptomen bleibt allerdings ungeklärt, wobei die Induktion von HSP70 unabhängig von einer generellen Hitzeschockantwort erfolgt (Aranda *et al.*, 1999) und auch bei der Infektion mit einer Reihe von Vertretern anderer Virusfamilien zu beobachten ist (Escaler *et al.*, 2000).

#### 1.4 Expression viraler Transportproteine in transgenen Pflanzen

Die Expression viraler Zell-zu-Zell Transportproteine („Movement Proteins“, MPs) in transgenen Pflanzen hat wesentlich zum bisherigen Verständnis der Transportprozesse von Viren und Assimilaten beigetragen. Durch Mikroinjektionen von Farbstoffen in verschiedene Zelltypen MP-exprimierender Pflanzen konnte die Kapazität zur Erhöhung der plasmodesmalen Leitfähigkeit für einige MPs wie beispielsweise das TMV-MP (Wolf *et al.*, 1991; Ding *et al.*, 1992) und CMV-MP (Vaquero *et al.*, 1994) gezeigt werden. Entsprechende MP-vermittelte Änderungen plasmodesmaler Eigenschaften wurden mit weiteren, transienten Testsystemen wie Koinjektion von rekombinanten MPs mit Farbstoffen sowie durch Partikelbeschuss mit GFP-markierten MPs bestätigt (Waigmann *et al.*, 1994; Itaya *et al.*, 1998; Oparka *et al.*, 1999). Dabei zeigte sich, dass die Kapazität zur plasmodesmalen Interaktion von TMV und CMV-MP auf „verzweigte“ PDs der *source*-Blattbereiche beschränkt bleibt, und demnach keine MP-Akkumulation an „einfachen“ PDs in *sink*-Gewebe zu detektieren war (Ding *et al.*, 1992; Itaya *et al.*, 1998; Oparka *et al.*, 1999).

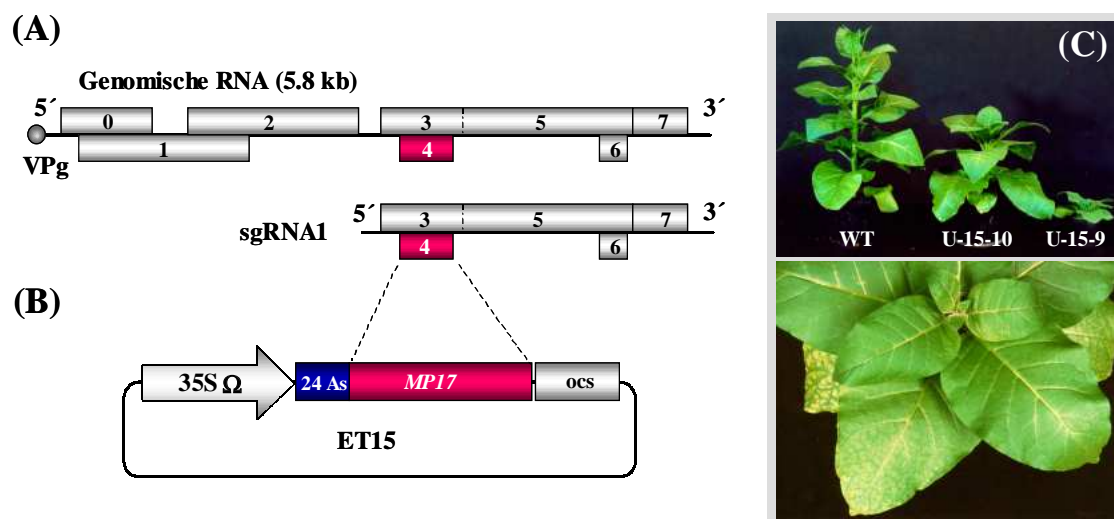
### 1.4.1 TMV-MP

Im Hinblick auf die metabolischen Konsequenzen modifizierter PDs kommt der Untersuchung stabil transformierter Pflanzen entscheidende Bedeutung zu. TMV-MP transgene Tabak- und Kartoffelpflanzen sind in diesem Zusammenhang detailliert analysiert worden und bilden die Basis des Konzeptes, wonach virale MPs in endogene Transportvorgänge für Makromoleküle eingreifen und dadurch *sink-source* Beziehungen und die Verteilung von Photoassimilaten in der Pflanze stören (zusammengefasst in Lucas *et al.*, 1996; Lucas and Wolf 1999). Bei konstitutiver Expression von TMV-MP in Tabak führte dieser Eingriff zur Akkumulation von Stärke und löslichen Zuckern infolge reduzierter Exportraten aus den *source*-Blättern, was in einer Verminderung des Wurzel-Spross-Verhältnisses resultierte (Balachandran *et al.*, 1995). Ähnliche Effekte konnten bei Phloem-spezifischer Expression in transgenen Kartoffelpflanzen beobachtet werden, während die spezifische Akkumulation von TMV-MP in Bündelscheiden und Mesophyllzellen die Reduktion von Kohlenhydraten durch Erhöhung des Saccharoseexportes bewirkte (Almon *et al.*, 1997; Olesinski *et al.*, 1996). Diese komplexen, scheinbar widersprüchlichen Befunde sind bisher wenig verstanden und gaben zu der Hypothese Anlass, dass MPs bei Expression in verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen Signalmolekülen um gemeinsame plasmodesmale Rezeptoren konkurrieren, was sich in spezifischen Effekten auf Assimilattransport und -verteilung auswirkt (Lucas and Wolf 1999). Diese Ergebnisse zeigten auch die Notwendigkeit, weitere MPs bezüglich ihres Einflusses auf PDs und Kohlenhydratstoffwechsel in transgenen Pflanzen zu untersuchen. Das MP des Phloem-limitierten *Potato leafroll virus* (PLRV) wurde unter diesen Gesichtspunkten als weiteres Modellsystem ausgewählt und von Herbers *et al.* (1997) in transgenen Tabakpflanzen untersucht (s. 1.4.2).

### 1.4.2 PLRV-MP17

PLRV wird der Unterguppe der *Poleroviren* innerhalb der Familie der *Luteoviren* zugeordnet und ist genomisch in einer etwa 5,8 kb großen Einzelstrang-(+)RNA organisiert, die aus 8 offenen Leserastern („open reading frame“, ORFs) besteht und am 5'-Ende kovalent mit einem „Genome-linked“ Protein (VPg) verbunden ist (Abb. 2A). Die Zell-zu-Zell-Transportfunktion wird dabei einem 17 kDa großen Protein (MP17) zugeschrieben, das vom

ORF4 der subgenomischen RNA (sgRNA1) kodiert wird (Tacke *et al.*, 1991; Tacke *et al.*, 1993). Diese Annahme beruhte vor allem auf biochemischen Gemeinsamkeiten mit dem TMV-MP (Citovski *et al.*, 1992, Citovsky *et al.*, 1993), wie die durch zwei funktionelle Domänen vermittelte Kapazität zur Nukleinsäurebindung und Protein/Protein-Wechselwirkung, sowie der *in planta* Phosphorylierung durch eine Membran-gebundene Proteinkinase (Tacke *et al.*, 1991, Tacke *et al.*, 1993; Sokolova *et al.*, 1997). Immunolokalisierungen in MP17 exprimierenden und PLRV-infizierten Kartoffelpflanzen belegten zudem die plasmodesmale Lokalisierung von MP17 (Schmitz *et al.*, 1997). Darüber hinaus ließ sich ein indirekter Beweis über die Analogie zum ORF4-kodierten 17 kDa Protein des verwandten *Barley yellow dwarf luteovirus* (BYDV) ableiten, für das eine Transportfunktion während der systemischen Ausbreitung in der Wirtspflanze gezeigt wurde (Chay *et al.*, 1996).



**Abb. 2:** (A) Schematische Darstellung der Organisation des PLRV-Genoms. Die etwa 5,8 kb große genomische Einzelstrang (+) RNA kodiert für 8 große offene Leseraster (ORFs), ist nicht polyadenyliert und wird am 5'-Ende durch ein „Genome-linked“ Protein geschützt. Die ORFs sind in zwei Blöcken organisiert, die durch eine intergene Region getrennt sind. Der Genblock bestehend aus ORF0, ORF1 und ORF2 wird direkt von der genomischen RNA translatiert, während die Expression der offenen Leseraster ORF3, ORF4 sowie ORF5 von einer 2,3 kb großen subgenomischen RNA1 (sgRNA1) und die Expression von ORF6 und ORF7 von der sgRNA2 (nicht dargestellt) erfolgt. Das MP17 Zell-zu-Zell Transportprotein wird dabei von ORF4 kodiert (modifiziert nach Tacke *et al.*, 1993).

Die konstitutive Expression einer um 24 Aminosäuren (As) N-terminal verlängerten Version des MP17 unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors (B) führte zu einer drastischen Wuchsretardierung in transgenen Tabaklinien (U-15-10, U-15-2) im Vergleich zum Wildtyp (WT) (C). Die transgenen Pflanzen zeigen in *source*-Blättern ein charakteristisches chlorotisches Mosaik, das von einer massiven Akkumulation an löslichen Zuckern und Stärke begleitet wurde (Herbers *et al.*, 1997).

Die konstitutive Expression des N-terminal verlängerten MP17 unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors (Abb. 2B) führte in transgenen Tabakpflanzen zu einem drastischen Phänotyp,

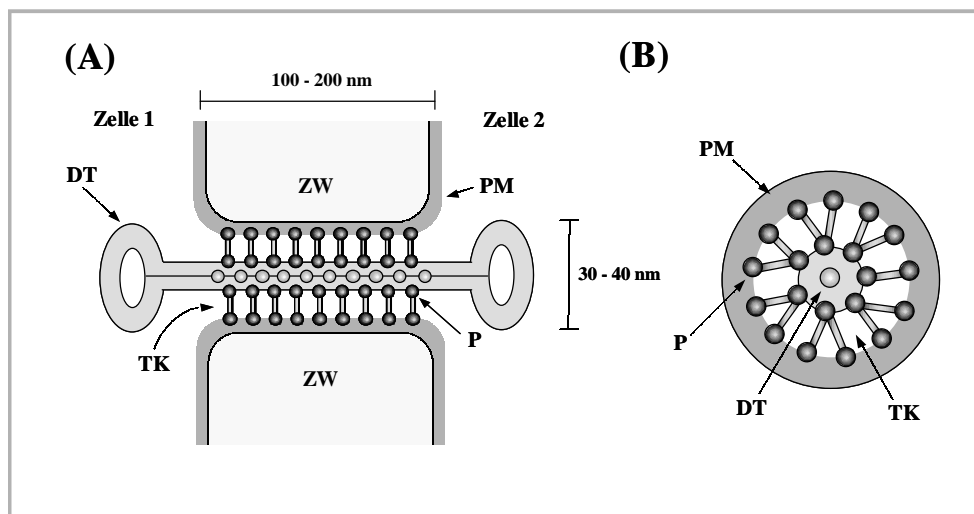
der durch reduzierten Wuchs und chlorotische Aufhellungen der Interkostalfelder in *source*-Blättern gekennzeichnet war (Abb. 2C). Phänotypisch betroffene Blätter zeigten eine Akkumulation von löslichen Kohlenhydraten und Stärke, was in einer veränderten Genexpression und reduzierter Photosynthesekapazität resultierte. Strukturelle Veränderungen Phloem-spezifischer PDs während der frühen Pflanzenentwicklung sowie deutlich erniedrigte Kohlenhydrat- und ATP-Gehalte in den Mittelrippen der transgenen Pflanzen deuteten dabei auf einen spezifischen Effekt des MP17 auf Sacharosemetabolismus und Assimilattransport im Phloemgewebe hin. Darüber hinaus führte die MP17-Expression zu einer eingeschränkten Resistenz gegenüber einer Virusinfektion mit dem *Potato virus Y* (PVY). Der MP17-vermittelte Schutz gegenüber der Virusmultiplikation und -ausbreitung war vor allem während der frühen Infektionsphase zu beobachten und unterschied sich daher deutlich von der beschriebenen effizienten Breitspektrumresistenz, die nach Transformation des identischen Konstruktes in Kartoffelpflanzen zu beobachten war (Tacke *et al.*, 1996). Die Gründe für die beobachteten Unterschiede zwischen Tabak und Kartoffel sind dabei weitestgehend unverstanden.

## 1.5 Komponenten des plasmodesmalen Transportweges

Trotz der zentralen Bedeutung der PDs für den symplastischen Assimilattransport und die Zell-zu-Zell Kommunikation, sind sowohl die Beschaffenheit der strukturellen Komponenten als auch die Mechanismen des plasmodesmalen Transportprozesses wenig verstanden. Ultrastrukturelle Studien zur Charakterisierung der Basisstruktur der PDs haben gezeigt, dass proteinöse Partikel sowohl in die innere und äußere Hülle des zentralen, vom endoplasmatischen Retikulum abgeleiteten Desmotubulus, als auch in die innere Oberfläche der Plasmamembran eingebettet sind. Desmotubulus und Plasmamembran sind zudem über Proteinstrukturen miteinander verbunden, wodurch der cytoplasmatische Kanal, durch den der Molekültransport von Zelle zu Zelle erfolgt, überbrückt und in 8-10 Mikrokanäle unterteilt wird (zusammengefasst in Ding 1998, Abb. 3). Durch Kombination biochemischer Behandlungen und mikroskopischer Methoden konnte zudem die proteinöse Beschaffenheit einiger plasmodesmaler Komponenten bestätigt werden (Tilney *et al.*, 1991; Turner *et al.*, 1994; Ritzenthaler *et al.*, 2000). Proteinbiochemische Ansätze zur Reinigung intakter PDs aus Zellwandfraktionen sind vielfach belegt, doch erwiesen sich die geringe Proteinmenge und die Kontamination mit Zellwandproteinen als limitierend (Epel, 1994; Epel *et al.*, 1995). Dennoch wurden mit einigen gegen diese Proteine hergestellten Antikörpern plasmodesmale



Epitope in immunocytologischen Studien erkannt, auch wenn keines der für die potentiellen PD-Proteine kodierenden Gene bisher isoliert werden konnte (Epel, 1994; Epel *et al.*, 1996; Waigmann *et al.*, 1997). Die Verwendung verschiedenster Antikörper gegen tierische und pflanzliche Proteine gab zusätzliche Hinweise auf die plasmodesmale Proteinzusammensetzung. So konnten „gap junction“-verwandte Proteine (Yahalom *et al.*, 1991), Actin- (White *et al.*, 1994) und Myosin-ähnliche Proteine (Radford and White 1998) sowie Myosin VIII (Reichelt *et al.*, 1999) und Calreticulin (Baluska *et al.*, 1999) in plasmodesmalen Strukturen mikroskopisch identifiziert werden.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung eines die Zellwand (ZW) durchspannenden PD im longitudinalen (A) und transversalen (B) Querschnitt. Der Molekültransport erfolgt durch den cytoplasmatischen Transportkanal (TK) zwischen der Plasmamembran (PM) und dem aus dem ER abgeleiteten Desmotubulus (DT). Verbunden sind PM und DT über speichenartige Proteinstrukturen (P), die den TK in mehrere Mikrokanäle unterteilen. Modifiziert nach Ding (1998) und Wu *et al.* (2002).

Erste Ansätze zum Verständnis der Mechanismen des plasmodesmalen Transportes von endogenen Proteinen und viralen MPs lieferten Mikroinjektionsstudien mit strukturell (über Crosslinking) modifiziertem KNOTTED1 (KN1) sowie Goldpartikel-gebundenem KN1 und CMV-MP (Kragler *et al.*, 1998; Kragler *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die KN1/CMV-MP vermittelte Erhöhung des plasmodesmalen Ausschlussvermögens von dem eigentlichen Transportvorgang durch den plasmodesmalen Mikrokanal entkoppelt werden kann und dass Transport-kompetente Proteine durch die Wirkung von molekularen Chaperonen entfaltet werden müssen. Somit wurde für den Transport durch PDs ein Prozess aus zwei Schritten postuliert, der physikalische Änderungen sowohl des plasmodesmalen Transportweges als auch der transportierten Proteine erfordert (Haywood *et al.*, 2002). Daneben gibt es Hinweise, dass die Transportkapazität endogener und viraler Proteine durch

weitere strukturelle Modifikationen, wie proteolytische Prozessierung (Xoconostle-Cázares *et al.*, 2000) und Protein-Phosphorylierung (Waigmann *et al.*, 2000) kontrolliert werden kann. Letzteres wurde durch Expression von verschiedenen TMV-MP Varianten in transgenen Pflanzen demonstriert, die durch Aminosäuresubstitutionen in der C-terminalen Phosphorylierungsdomäne den phosphorylierten Status imitierten und dadurch den plasmodesmalen Transport inhibierten (Waigmann *et al.*, 2000).

## 1.6 Transportmutanten

Mutanten spielen bei der Aufklärung physiologischer, biochemischer, phytopathologischer und entwicklungsbiologischer Prozesse eine zentrale Rolle, wobei *Arabidopsis thaliana* als genetische Modellpflanze besondere Bedeutung hat. Mit der vollständigen Sequenzinformation des *Arabidopsis*-Genoms (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) und der Verfügbarkeit einer gesättigten Markerpopulation ist es nun möglich, auch Mutationen, die nicht über T-DNA oder Transposoninsertion markiert sind, in einem überschaubaren Zeitrahmen zu identifizieren (Lukowitz *et al.*, 2000). Damit können die Vorteile chemischer Agentien wie beispielsweise Ethylmethansulfonat (EMS) verstärkt genutzt werden, die hohe Mutationsraten aufweisen und vornehmlich Einzelbasenaustausche induzieren.

In den letzten Jahren hat man sich diese Vorteile von *Arabidopsis* zunutze gemacht, um Wirtskomponenten zu identifizieren, die die Suszeptibilität oder Resistenz gegenüber Viren kontrollieren. Durch verschiedene Ansätze basierend auf der Analyse der natürlichen Variabilität zwischen *Arabidopsis*-Ökotypen sowie der Durchmusterung von mutagenisierten Populationen im Hinblick auf Multiplikation und systemische Ausbreitung von Viren, wurden einige Loci innerhalb von *Arabidopsis*-Genen isoliert, die Virus-Pflanzen-Interaktionen beeinflussen. Zu diesen gehören auch Loci, die die systemische Ausbreitung der Viren kontrollieren und daher als Mutanten für den Langstreckentransport von Viren anzusehen sind. Beispielsweise sind *RTM1* und *RTM2* koordinativ an der Beschränkung der systemischen Ausbreitung des *Tobacco etch virus* beteiligt, wobei *RTM1* für ein Jacalin-ähnliches Protein und *RTM2* für ein Protein mit Homologie zur Familie der „kleinen“ Hitzeschockproteine (HSP) kodiert (Chisholm *et al.*, 2000; Whitham *et al.*, 2000). Beide Proteine des RTM-Systems wirken im Phloem, allerdings ist die exakte Rolle dieser Proteine beim Block der systemischen TEV-Infektion noch nicht geklärt (Chisholm *et al.*, 2001).

Im Hinblick auf die Identifizierung von Mutanten des Photoassimilattransportes gibt es nur wenige Hinweise auf systematische Ansätze in *Arabidopsis*. Wesentlich für die

erfolgreiche Identifizierung von Mutanten ist die Verfügbarkeit geeigneter Testverfahren. Als Konsequenz eines verminderten Assimilattransportes ist ein gehemmter Wuchs bzw. die Akkumulation von Assimilaten in *source*-Blättern zu erwarten. Die auf diese Weise identifizierten *sex* (*starch excess*)-Mutanten zeigten allerdings in den meisten Fällen Mutationen im Stärkemetabolismus und waren somit nicht in einer spezifischen Transportfunktion betroffen (Caspar *et al.*, 1991, Zeeman *et al.*, 1998a; Zeeman *et al.*, 1998b; Yu *et al.*, 2001). Dafür wurde aber die Isolierung einer Transportmutante beschrieben, die in der Saccharosetransporter (SUC2)-vermittelten, apoplastischen Phloembeladung beeinträchtigt ist (Gottwald *et al.*, 2000). Die SUC2-defizienten Mutanten zeigten im homozygoten Zustand einen reduzierten Wuchs, eine verzögerte Entwicklung sowie Sterilität. Die Inhibierung des effizienten Saccharosetransportes resultierte in der Akkumulation von Stärke in den *source*-Blättern und lieferte den genetischen Nachweis, dass die apoplastische Phloembeladung auch in *Arabidopsis* kritisch für Wachstum, Entwicklung und Reproduktion ist. Einige Eigenschaften dieses Export-defizienten Phänotyps wurden auch für eine Maismutante, *sed1* oder *sxd1* (*sucrose export defective1*) beschrieben, die infolge struktureller Veränderungen der PDs zwischen Bündelscheide und vaskulärem Parenchym lange Zeit als einzige Transportmutante mit spezifischem Defekt in einer PD-Komponente angesehen wurde (Russin *et al.*, 1996; Botha *et al.*, 2000). Das *SXD1*-Gen kodiert allerdings für ein neuartiges, Chloroplasten-lokalisiertes Protein, das offensichtlich nur indirekt, über eine postulierte Signalfunktion zwischen Chloroplasten und Zellkern, an der Differenzierung von Bündelscheidenzellwänden und PDs während des *sink/source*-Übergangs beteiligt sein könnte (Provencher *et al.*, 2001). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem *SXD1*-Protein um eine Tocopherol Cyclase handelt (Porfirova *et al.*, 2002), wobei der Zusammenhang zwischen Tocopherol (Vitamin E) und der Ausbildung funktioneller PDs völlig ungeklärt ist. „Echte“ PD-Mutanten mit veränderten Transporteigenschaften infolge beeinträchtigter Strukturkomponenten sind daher weiterhin nicht eindeutig identifiziert, auch wenn es einen ersten Hinweis für einen systematischen Screeningansatz gibt. So beschreiben Kim *et al.* (2002) die Durchmusterung von Embryo-Letallinien auf veränderte Transporteigenschaften für fluoreszierende Farbstoffe und die Isolierung einer Mutante, *ise-1* (*increased size exclusion limit-1*), die ein gegenüber Wildtyp-Embryonen erhöhtes plasmodesmales Ausschlussvermögen zeigt. Der Ansatz verdeutlicht, dass zur Identifizierung von PD-Mutanten Strategien gewählt werden müssen, die die Annahme berücksichtigen, dass Mutanten mit veränderter PD-Struktur eine erhebliche Wuchsretardierung oder Letalität aufweisen.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Ansätze verfolgt werden, um molekulare Faktoren des plasmodesmalen Transportes von Viren und Photoassimilaten zu identifizieren.

- (1) Im ersten Ansatz sollten die zellbiologischen, metabolischen und virologischen Auswirkungen MP-vermittelter Änderungen des plasmodesmalen Transportweges am Beispiel des *Potato leafroll virus* MP (PLRV-MP17) untersucht und daran beteiligte Wirtsfaktoren identifiziert werden. Dazu sollten zunächst Tabaklinien, die konstitutiv eine Fusion aus MP17 und GFP exprimierten, mit Hilfe von subzellulären Lokalisierungsstudien, Farbstoff-gekoppelten Mikroinjektionen, Kohlenhydratanalysen und Virusresistenz-Bestimmungen charakterisiert und mit MP17-transgenen Pflanzen verglichen werden, für die zuvor ein pleiotroper Phänotyp beschrieben wurde (Herbers *et al.*, 1997). Um darüber hinaus zwischen primären Effekten von MP17 und metabolischer Adaptation der Pflanzen infolge hoher und konstitutiver Expression unterscheiden zu können, sollte MP17 unter Kontrolle eines Ethanol-induzierbaren Promotors (*alc*-System) in transgenen Pflanzen exprimiert und die MP17-vermittelten Änderungen kinetisch aufgeschlüsselt werden. Schließlich sollte die ektopische Expression von MP17 auf *Arabidopsis thaliana* übertragen und ein genetisches System etabliert werden, um Mutanten mit potentiellen Defekten in pflanzlichen MP17-Interaktoren zu identifizieren.
- (2) Im zweiten Ansatz sollten Wirtsfaktoren des intra- und interzellulären Transportes von Potyviren identifiziert werden. Da potyvirale Capsid Proteine (CPs) sowohl an der Assemblierung des Transportkomplexes als auch an der Modifikation der plasmodesmalen Leitfähigkeit beteiligt sind, sollten im Hefe Zwei-Hybrid System PVY CP-bindende pflanzliche Proteine isoliert und die Interaktionen molekular charakterisiert werden. Um die funktionale Rolle der Interaktion in *planta* zu verifizieren, sollte die Expression der PVY CP-bindenden Wirtsfaktoren in transgenen Pflanzen moduliert und Änderungen der Suszeptibilität gegenüber der Infektion mit PVY analysiert werden.
- (3) In einem dritten Ansatz sollte die Bedeutung des pflanzlichen SxD1-Proteins für die Ausbildung funktionaler PDs und den symplastischen Assimilattransport untersucht werden. Die *sxd1*-Mutante in Mais wurde zuvor als Assimilatexport-defiziente Transportmutante mit spezifischem Defekt in einer PD-Komponente betrachtet. Hingegen erfolgte die Isolierung einer homologen Mutante in *Arabidopsis* (*vte1*) auf Basis eines

Vitamin E-defizienten Phänotyps, der durch einen Defekt in der *SXD1/VTE1*-kodierten Tocopherol Cyclase hervorgerufen wurde. Um zu überprüfen, ob das *SXD1/VTE1*-Protein gleichermaßen für die Ausbildung funktionaler PDs und die Biosynthese von Tocopherol (Vitamin E) verantwortlich ist, sollte das homologe *SXD1*-Gen aus *Solanum tuberosum* isoliert und die Expression von *StSXD1* in transgenen Pflanzen über RNA-Silencing supprimiert werden. Durch biochemische und physiologische Analysen sollten die Auswirkungen des *StSXD1*-Silencing einerseits auf den Tocopherolstoffwechsel, andererseits auf den symplastischen Assimilattransport und die Kohlenhydratverteilung in den transgenen Kartoffelpflanzen untersucht werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht weiter spezifiziert, in analytischer Qualität von den Firmen Amersham Pharmacia (Braunschweig), Biomol (Hamburg), Boehringer Mannheim (Mannheim), Bio-Rad (München), Calbiochem (San Diego, USA), Difco (Detroit, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka (Buchs, Schweiz), New England Biolabs (Frankfurt), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Stratagene (Amsterdam, Niederlande), Sigma Aldrich (Steinheim), und Whatman (Maidstone, England) bezogen.

### 2.2 Pflanzenmaterial und Anzucht

#### 2.2.1 *Nicotiana tabacum*

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. Varietät Samsun NN) wurden von Vereinigte Saatzuchten EG (Ebstorf) bezogen und in Gewebekultur unter einem 16 h Licht / 8 h-Dunkelrhythmus bei 24°C, 50% Luftfeuchte sowie einer Belichtung von ca. 150  $\mu\text{E}$  auf Murashige Skoog (MS) Medium (Sigma) mit 2% (w/v) Saccharose und geeigneten Hormonen und Antibiotika gehalten. Pflanzen für biochemische, mikroskopische und virologische Analysen wurden bei 16 h Licht mit Zusatzbeleuchtung (ca. 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und 8 h Dunkelheit im Gewächshaus kultiviert. Die relative Feuchte lag zwischen 60 und 70% und die Temperatur betrug während der Lichtperiode 25°C sowie 18°C während der Dunkelphase. Die Tabakpflanzen für Mikroinjektionsexperimente wurden in einem Temperaturkontrollierten Gewächshaus (25°C Tag / 16°C Nacht) unter natürlichem Sonnenlicht angezogen.

#### 2.2.2 *Solanum tuberosum*

Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L. Varietät Solara) wurden von Vereinigte Saatzuchten EG (Ebstorf) erhalten und in Gewebekultur unter vergleichbaren Licht/Feuchte-

Bedingungen wie Tabakpflanzen (2.2.1), aber bei 21°C kultiviert. Die physiologischen und biochemischen Analysen erfolgten bei einem Rhythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit unter kontrollierten Bedingungen in einer Klimakammer (70% Luftfeuchte; 19°C Tag / 15°C Nacht; 500 µE Licht) oder unter Gewächshausbedingungen mit Zusatzbeleuchtung (ca. 250 µE).

### 2.2.3 *Arabidopsis thaliana*

Saatgut der *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Columbia (Col-0), C24 und *Landsberg erecta* (*Ler*) wurden von S. Misera (früher IPK Gatersleben), R. Jost (IPK Gatersleben) sowie von H. Hillebrand (Sungene, Gatersleben) zur Verfügung gestellt. Die Anzucht in Gewebekultur erfolgte nach Stratifizierung der Aussaat (2 Tage in Dunkelheit, 4°C) unter vergleichbaren Bedingungen wie die Kultivierung von Kartoffelpflanzen (2.2.2) aber auf modifiziertem MS-Medium (Sigma) ergänzt durch Gamborg's Vitaminlösung (1:1000, Sigma). Die Anzucht von *Arabidopsis* unter Kurztagbedingungen erfolgte in einem Klimaraum bei 21°C, 9 h Licht (150 µE) und 60-65% rel. Luftfeuchte mit einer Nachtabenkung auf 18°C. Die Arbeiten zur Identifizierung und Charakterisierung von EMS-Mutanten wurden, sofern nicht anders spezifiziert, unter Langtagbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit) im Gewächshaus mit einem Temperatur/Feuchte-Regime wie bei der Anzucht von Tabak (2.2.1) durchgeführt.

## 2.3 Pflanzentransformation

Pflanzentransformationen wurden mit Hilfe des *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers unter Verwendung des *Agrobacterien*-Stamms C58C1 mit dem Helferplasmid pGV2260 (Deblaire *et al.*, 1985) durchgeführt. Dabei erfolgte die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* in YEB-Medium (Vervliet *et al.*, 1975) und die Transformation von *Agrobacterium* mit binären Vektorplasmiden wurde entsprechend der Methode von Höfgen und Willmitzer (1988) ausgeführt.

Die Transformation von Tabakpflanzen folgte der in Rosahl *et al.* (1987) beschriebenen Methode, und Kartoffelpflanzen wurden nach dem Protokoll von Rocha-Sosa *et al.* (1989) transformiert.

*Arabidopsis*-Pflanzen (Ökotypen Col-0, C24, *Ler*) wurden zur Transformation etwa 4 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und danach zur Blüteninduktion in den Langtag transferiert. Blütensprosse 6-8 Wochen alter Pflanzen wurden mit *Agrobacterium*-

Suspension [ $OD_{600} = 0,8$ ; 5% (w/v) Saccharose; 0,05% (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, USA)] entweder nach der Vakuum-Infiltrationsmethode von Bechthold *et al.* (1993) oder nach dem Protokoll von Clough und Bent (1998) transformiert, wobei bei letzterer Methode der Blütenstand ohne Anlegen eines Vakuums für ca. 5 s in die *Agrobacterium*-Suspension eingetaucht wurde („floral dip“). Die Pflanzen wurden anschließend unter einer abgedunkelten Haube für 24 h bei RT stehen gelassen und danach im Gewächshaus bis zur Samenreife gehalten. Das reife Saatgut (T1-Generation) wurde sterilisiert [2 min 70% (v/v) Ethanol, 5 min 5% (v/v) NaOCl, 5-10x Waschen mit H<sub>2</sub>O bidest], zur Selektion der transgenen Pflanzen auf MS-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml) ausplattiert und unter Langtagbedingungen kultiviert. Kanamycin-resistente Keimlinge wurden auf MS-Medium umgesetzt und nach 2-3 Wochen ins Gewächshaus in Erdkultur transferiert.

## 2.4 Oligonukleotide und Sequenzierungen

Universelle Sequenzierprimer (SK, KS, M13 universal, BK reverse, T7) wurden von der Firma Stratagene bezogen. Spezielle Sequenzier- und PCR-Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg) und Metabion (Martinsried) synthetisiert (vgl. Anhang). Sequenzierungen wurden entweder als Serviceleistung von Susanne König am IPK Gatersleben (PGRC) oder von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

## 2.5 Allgemeine Klonierungsverfahren

Grundlegende Techniken der Nukleinsäuremanipulation wie z.B. Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen, Verknüpfen von DNA mit Hilfe von Ligasen, Reinigung von DNA-Fragmenten, Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon-Membranen, Anzucht von Bakterien, Transformation von *E. coli*-Zellen, Präparation von Plasmiden, und die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten zur Verwendung als Hybridisierungssonde wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

## 2.6 Bakterien-/Hefestämme und Vektoren

Für allgemeine Klonierungsverfahren, die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*, die Durchmusterung von Phagen-cDNA-Bibliotheken, die Orts-gerichtete Mutagenese von DNA



sowie für Arbeiten mit dem Zwei-Hybrid System in Hefe wurden folgende Bakterien-/Hefestämme und Vektoren eingesetzt.

**Tab. 2-1:** Verwendete Bakterien- und Hefestämme.

| Stamm                        | relevanter Genotyp   | Herkunft/Referenz                          |
|------------------------------|--|--|
| <i>E. coli</i> XLI Blue      | <i>recA1 endA, gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F', <i>proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>)<sup>c</sup></i>   | Bullock <i>et al.</i> , 1987<br>Stratagene |
| <i>E. coli</i> XLI Blue MRF' | $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)<sup>c</sup></i>                                    | Stratagene                                 |
| <i>E. coli</i> XL0LR         | $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)<sup>c</sup> Su<sup>-</sup> λ<sup>r</sup></i>              | Stratagene                                 |
| <i>E. coli</i> M15 [pREP4]   | <i>nal<sup>S</sup> str<sup>S</sup> rif<sup>S</sup> thi<sup>-</sup> lac<sup>-</sup> ara<sup>+</sup> gal<sup>+</sup> mtl<sup>-</sup> f recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup> lon<sup>+</sup></i>            | Qiagen                                     |
| <i>E. coli</i> TOP10F'       | <i>F'(tet<sup>r</sup>) mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rspL (Str<sup>R</sup>) end A1 nupG</i>   | Invitrogen                                 |
| <i>E. coli</i> KC8           | <i>hsdR leuB60o trpC9830 pyrF::Tn5 hisB463 lacDX74 strA galU K</i>   | Clontech                                   |
| <i>S. cerevisiae</i> Y190    | <i>MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 gal4Δ gal80Δ cyh<sup>r</sup>2 LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3 URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i> | Harper <i>et al.</i> , 1993                |

**Tab. 2-2:** Verwendete Vektoren.

| Bezeichnung                 | Verwendung/Resistenz  | Herkunft/Referenz   |
|-----------------------------|---|---|
| BinAR                       | binärer Vektor, Kan <sup>r</sup>  | Höfgen und Willmitzer, 1990                                 |
| p35S- <i>alcR</i>           | binärer Vektor, <i>alc</i> -System, Kan <sup>r</sup>                                  | Caddick <i>et al.</i> , 1998                                |
| pUC- <i>alcA</i>            | Klonierungsvektor <i>alc</i> -System, Amp <sup>r</sup>                                | Caddick <i>et al.</i> , 1998                                |
| pUC-RNAi                    | Klonierungsvektor hpRNA-Konstrukt mit <i>StGA20</i> -Oxidase Intron, Amp <sup>r</sup> | von Chencai Chu; Peking<br>Chen <i>et al.</i> , eingereicht |
| pBlueskript SK <sup>-</sup> | <i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Amp <sup>r</sup>                                    | Stratagene  |
| pCR-Blunt                   | <i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Amp <sup>r</sup>                                    | Invitrogen  |
| pCR2.1                      | <i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Kan <sup>r</sup>                                    | Invitrogen  |
| pGEM-T                      | <i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Amp <sup>r</sup>                                    | Promega   |
| pUC18, pUC19                | <i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Amp <sup>r</sup>                                    | Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985                         |
| pQE11                       | <i>E. coli</i> Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup>                                    | Qiagen  |
| pAD-GAL4                    | GAL4 AD-Vektor, Amp <sup>r</sup>  | Stratagene  |
| pGBT9                       | GAL4 BD-Vektor, Amp <sup>r</sup>  | Clontech  |
| pGBKT7                      | GAL4 BD-Vektor, Kan <sup>r</sup>  | Clontech  |

## 2.7 RNA-Isolierung und Northern Blot-Analyse

RNA aus Pflanzengewebe wurde nach der Methode von Logemann *et al.* (1987) isoliert. Zwischen 20 und 40 µg Gesamt-RNA wurden nach einem Denaturierungsschritt in einem 1,5% (w/v) Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und durch Kapillartransfer über Nacht auf GeneScreen Membranen (NEN, Boston, USA) übertragen. Die radioaktive Markierung von cDNA Fragmenten erfolgte durch Verwendung des „High Prime“-Kits (Boehringer, Mannheim) und [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech). Die Hybridisierung der Membranen in „Church“-Puffer (Church und Gilbert, 1984) wurde wie bei Herbers *et al.* (1994) beschrieben durchgeführt und Transkript-spezifische Signale wurden durch Exposition gegen einen Röntgenfilm (Kodak) detektiert oder mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji Bas 2000; Fuji, Tokio, Japan) quantifiziert.

## 2.8 Reverse Transkription und semiquantitative RT-PCR

Die reverse Transkription von pflanzlicher oder viraler RNA und Amplifizierung der einzelsträngigen cDNA über PCR erfolgte entweder in einem gekoppelten Reverse-Transkriptions/cDNA-Amplifikations-Assay nach dem Protokoll der Tth DNA-Polymerase (Biomaster, Köln), oder in einem Zwei-Schritt-Ansatz, der die cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase [M-MLV (H-), Promega] und Oligo-dT-Primer (dT<sub>[30]</sub>V[G/C/A]) sowie anschließende PCR-Amplifizierung mit *rTaq* DNA-Polymerase (Takara Shouzo, Japan) und genspezifischen Oligonukleotiden umfasste.

Zur Analyse der über RNA-Silencing verminderten Expression endogener Gene wurde die Methode der semiquantitativen RT-PCR von Romeis *et al.* (2001) adaptiert. 20 µg Gesamt-RNA (vgl. 2.7) wurde zunächst mit DNase (Boehringer Mannheim) bei 37°C für 45 min verdaut und diese anschließend für 10 min bei 65°C inhibiert. Nach Phenol/Choroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Behandlung wurde die RNA mit 1/10 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 5,2) gefällt, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und in 100 µl DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O gelöst. Die cDNA Erststrangsynthese wurde in einem Ansatz mit 12,5 µl DNase behandelte RNA, 5 µl 5x Reaktions-Puffer, 2 µl dNTPs (2,5 mM), 1 µl Oligo-dT-Primer (50 mM, dT<sub>[30]</sub>V[G/C/A]) und 2,5 µl DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O nach Inkubation für 5 min bei 65°C, dann für 5 min bei 37°C, und schließlich nach Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase [M-MLV (H-), Promega] und 1 µl RNase-Inhibitor (Boehringer, Mannheim)

bei 37°C (60 min) durchgeführt. Nach Hitzeinaktivierung für 5 min bei 95°C wurde die cDNA als Matrize für die anschließende PCR eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde parallel mit genspezifischen Primern und Kontrollprimern für Actin (AC1 und AC2; Romeis *et al.*, 2001) durchgeführt. Aliquots des PCR-Ansatzes (1/10-1/20 des Gesamtvolumens) wurden sukzessive im linearen PCR-Bereich in Abhängigkeit von dem zu untersuchenden Gen (25-35 Zyklen) genommen, gelelektrophoretisch getrennt und die Signalstärke der PCR-Produkte verglichen.

## 2.9 Orts-gerichtete Mutagenese von cDNA mittels PCR

Die Einführung von Mutationen in DNA-Sequenzen zur Generierung von Aminosäureaustauschen wurde durch eine PCR-basierte Strategie mittels des QuickChange™ Systems (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers und den Modifikationen von Wang und Wilkinson (2000) erzielt. Bei dieser Methode wird zunächst über PCR unter Verwendung von *PfuTurbo* DNA-Polymerase, einem komplementären Primerpaar mit der gewünschten Mutation, sowie doppelsträngiger Plasmid-DNA als Matrize ein mutiertes Plasmid generiert. Durch den Restriktionsverdau mit *DpnI* wird anschliessend die nicht-mutierte und methylierte Parental-DNA abgebaut und das mutierte Plasmid in superkompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert.

Für die Orts-gerichtete Mutagenese der *PVY CP* cDNA setzten sich die PCR-Ansätze aus 150-200 ng der jeweiligen Primer (33-mer), 10-20 ng Plasmid-DNA, 400 µM dNTPs, 2,5 U *PfuTurbo* DNA-Polymerase und dem 10x Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl zusammen. Die PCR-Reaktion wurde bei folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierung bei 95°C für 30 s, gefolgt von 16 Zyklen bestehend aus 30 s Denaturierung bei 95°C, Anlagerung der Primer bei 55°C für 1 min, und Primerverlängerung bei 68°C für 2 min/kb. Konnte kein PCR-Produkt in der erwarteten Grösse erhalten werden, so wurden 10% DMSO zum Ansatz beigefügt, um Sekundärstrukturen der Primer aufzubrechen. Außerdem wurde gegebenenfalls der Denaturierungsschritt auf 45 s verlängert und die Temperatur zur Primeranlagerung auf 60°C erhöht. Die Einführung der korrekten Mutation wurde schließlich über Sequenzierung der Plasmide verifiziert.

## 2.10 „RACE“-PCR

Die Isolierung von 5'- und 3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) Fragmenten des *Stsxd1* EST-Klons wurde mit dem „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit“ der Firma Clontech (Palo Alto, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden spezifische Oligonukleotide der *StSXD1* cDNA (StSXD1-5'RACE; StSXD1-3'RACE, s. Anhang), die Primer des „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit“ [5'-RACE (5'CDS), 3'-RACE (3'CDS), SmartII, UPM, NUP) sowie Gesamt-RNA aus Blattmaterial von *Solanum tuberosum* Var. Solara verwendet. Nach der reversen Transkription wurden die *Stsxd1*-spezifischen 5'- und 3'-cDNA-Enden mit Hilfe des „Advantage® 2 Polymerase Mix“ (Clontech) und einer „touch down“-PCR (Temperaturgradient zur Anlagerung der Oligonukleotide) nach dem folgenden Programm amplifiziert: 5 Zyklen Denaturierung bei 94°C (10 s) sowie Primeranlagerung und Extension bei 72°C (3 min), danach 5 Zyklen Denaturierung bei 94°C (10 s), Primeranlagerung bei 70°C (20 s) und Extension bei 72°C (3 min), und schließlich 25 Zyklen mit Denaturierungsschritt (94°C, 10s), Primeranlagerung bei 68°C (20 s) und Primerverlängerung bei 72°C (3 min). Die erhaltenen 5' und 3' PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des „TOPO TA Cloning® Kit“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben in den pCR2.1 Vektor kloniert und die erhaltenen Plasmide sequenziert. Aus den gewonnenen Sequenzdaten wurden spezifische Oligonukleotide abgeleitet, um die Vollängen-cDNA mittels PCR unter Verwendung der *PfuTurbo* DNA-Polymerase zu amplifizieren.

## 2.11 Durchmusterung von Phagen cDNA-Bibliotheken

Die Durchmusterung einer Phagen  $\lambda$ -ZAP II cDNA-Bank aus Tabak-Blattmaterial (Herbers *et al.*, 1995) zur Isolierung des Vollängen cDNA-Klons und putativen Isoformen von *NtCPIP1* erfolgte mit einem radioaktiv markierten cDNA-Fragment nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989).

## 2.12 Western Blot-Analyse und Quantifizierung von Immunosignalen

Gewebeproben gleicher Menge (50-100 mg FG) oder Blattfläche (0,64 cm<sup>2</sup>) von Tabak-, Kartoffel-, und *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in 2x SDS-Probenpuffer [50 mM Tris-HCl, 5%

(v/v)  $\beta$ -ME, 10% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, pH 6,8] homogenisiert. Nach Hitzedenaturierung für 10 min wurden die Zelltrümmer pelletiert und gleiche Volumen des Überstandes auf 12,5 oder 15% (v/v) SDS-Polyacrylamidgelen über Gelelektrophorese getrennt (Lämmli, 1970). Die Proteine wurden auf Nitrocellulose-Membranen (Porablot; Macherey-Nagel, Düren) transferiert und anschließend die Membran zunächst für eine Stunde in „Blocking“-Puffer [TBS/T: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,1% (w/w) Tween 20 (Sigma)] mit 5% Milchpulver und danach mindestens für 1 h oder über Nacht mit Antiserum [1:5000 in TBS/T mit 1% (w/v) Milchpulver] inkubiert. Die Entwicklung der Immunoblots erfolgte mit dem „SuperSignal West Dura Extended Duration“-Substrat (Pierce, Rockford, USA) nach Inkubation (1 h) mit „Horseradish Peroxidase“ (HRP)-gekoppeltem sekundären Antikörper [1:100000 Verdünnung in TBS/T mit 1% (w/v) Milchpulver]. Antikörper-spezifische Signale wurden durch Exposition gegen Kodak Röntgenfilme (Sigma) detektiert oder mit Hilfe einer CCD-Kamera und dem ChemiDoc-System (Bio-Rad, München) in Echtzeit aufgenommen und quantifiziert. Die Normalisierung der *Western Blots* erfolgte durch eine zusätzliche Beprobung und Quantifizierung mit dem anti-Transketolase Antiserum (Henkes *et al.*, 2001).

### 2.13 Proteinexpression in *E. coli* und Preparation von Enzymextrakten

Zur Bestimmung der *in vitro* Enzymaktivität von StSXD1 wurden die cDNA-Fragmente in den Expressionsvektor pQE11 ligiert und die erhaltenen Plasmide in *E. coli* M15 (pREP4)-Zellen transformiert. Mit 1 ml einer ü.N.-Kultur wurden 50 ml LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) mit geeigneten Antibiotika inokuliert und bis zu einer  $OD_{600}$  von etwa 0,5 bei 37°C inkubiert. Die Expression der Proteine wurde durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert und die Zellen nach 3-4 Stunden durch Zentrifugation für 15 min bei 2500 g und 4°C geerntet. Das Pellet wurde in 5 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 8,0) gewaschen, in 0,5 ml Puffer resuspendiert und die Bakterien durch zweimaliges Sonifizieren für 20 s aufgeschlossen. Die Suspension wurde nach Zugabe von CHAPS [Endkonzentration 0,2 % (v/v)] für 30 min bei 4°C geschüttelt, die Zelltrümmer für 10 min bei 2500 g und 4°C pelletiert und der Überstand für die Enzymmessungen eingesetzt.

Zur Verifizierung der Proteinexpression wurde ein Aliquot (1 ml) der Induktionskultur separat pelletiert, mit 2x Probenpuffer (Lämmli, 1970) über einen Denaturierungsschritt (5 min, 95°C) aufgeschlossen und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrollkultur analysiert.

## 2.14 Protein-Interaktionsanalysen mit dem Zwei-Hybrid System in Hefe

Zur Isolierung und Charakterisierung von PVY CP-interagierenden pflanzlichen Wirtsfaktoren wurde das GAL4-basierte Hefe Zwei-Hybrid System (Fields und Song, 1989) unter Verwendung konventioneller Techniken und Protokolle von MacDonald (Hrsg.) *et al.* (2001) und dem Yeast Protocol Handbook (1999) eingesetzt.

Die verwendete Hefe Zwei-Hybrid cDNA Bank war zuvor, wie von Börnke (2001) beschrieben, aus Gesamt-RNA von *source*-Tabakblättern (*Nicotiana tabacum* L. Varietät Samsun NN) mit Hilfe des „HybriZAP™ Two-Hybrid cDNA Gigapack Cloning Kit“ und dem Vektor pAD-GAL4 (Stratagene) erstellt worden. Dabei wurden die verwendeten Tabakblätter vor der Aufarbeitung mit den Petiolen ü.N. in 300 mM Saccharoselösung inkubiert, um zum einen die Redundanz photosynthetischer Gene zu reprimieren und zum anderen die Häufigkeit Abwehr-relevanter Transkripte zu erhöhen (Herbers *et al.*, 1996b).

Zur Durchmusterung der gerichteten, mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) translational fusionierten cDNA-Bank, wurde die „Köder“ (Bait) cDNA in offenem Leserahmen mit der GAL4-Bindungsdomäne (GAL4-BD) in den Vektor pGBT9 (Clontech) kloniert. Das „Bait“-Plasmid wurde zunächst in den Hefe-Reporterstamm Y190 (Harper *et al.*, 1993) transferiert, und in diesen die GAL4-AD cDNA-Plasmide nach der in Schiestl und Gietz (1989) beschriebenen PEG/LiAc/ssDNA-Methode transformiert. Zur Selektion interagierender Plasmide wurden die Hefezellen auf Minimalmedium ohne die Aminosäuren Tryptophan, Leucin, Histidin (SD Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>) und mit 25 mM 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT; Gietz *et al.*, 1995; Bartel und Fields 1995) ausplattiert. Die Transformationseffizienz wurde durch Ausplattieren von Aliquots auf SD Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup> Platten bestimmt. Nach 7-10 Tagen Inkubation bei 30°C wurden Hefekolonien mit deutlichem Wachstum (mind. 2 mm im Durchmesser) isoliert und auf Expression des *lacZ*-Reportergens nach der von Breeden und Nasmyth (1985) beschriebenen  $\beta$ -Galaktosidase Filterlift-Assay-Methode getestet. Hefekolonien, die sowohl Wachstum in Abwesenheit von Histidin als auch *lacZ*-Aktivität zeigten, wurden zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Gesamt-DNA wurde aus den Hefezellen isoliert und nach Elektroporation in den *E. coli*-Stamm KC8 (Clontech) auf Anwesenheit der GAL4-AD cDNA-Plasmide selektioniert. Die Spezifität der Interaktion wurde über Kotransformation der cDNA-Plasmide bzw. des „Bait“-Plasmids mit den nicht-verwandten Kontrollplasmiden pBD-p53 (Iwabuchi *et al.*, 1993), pBD-SNF1 und pAD-SNF4 (Harper *et al.*, 1993) verifiziert.

Zur Analyse der direkten Interaktion von zwei bekannten Proteine wurden zunächst die entsprechenden Plasmide in den Reporterstamm Y190 transformiert und die Transformanten für 3-4 Tage bei 30°C auf SD Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup> selektiert. Danach wurden die Zellen auf SD Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/His<sup>-</sup> Medium über überimpft und auf *HIS3*- und *lacZ*-Expression getestet.

### 2.15 Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten und Stärke

Für die Bestimmung von löslichen Zuckern und Stärke wurde Blattgewebe gleichen Frischgewichtes (50-100 mg) oder identischer Fläche (0,33 cm<sup>2</sup>) mit 80% (v/v) Ethanol (20 mM HEPES-KOH, pH 7,5) bei 80°C für 2 h extrahiert. Die Bestimmung von Glucose, Fructose, und Saccharose im Überstand erfolgte mit einem gekoppelten optisch-enzymatischen Test wie bei Stitt *et al.* (1989) beschrieben. Zur Stärkebestimmung wurde das extrahierte Gewebe mit 0,2 N KOH für 1 h bei 95°C aufgeschlossen und anschließend der pH-Wert mit 1N Essigsäure auf 5,5-6,0 eingestellt. Die Quantifizierung der Stärke erfolgte nach Hydrolyse mit Amyloglukosidase (2U/ml, Boeringer, Mannheim) für 2 h bei 55°C über die Messung der Glucoseeinheiten.

Die qualitative Analyse der Stärkeverteilung in Blättern transgener Pflanzen wurde mit Hilfe der Jodfärbung durchgeführt. Blätter wurden zunächst mit 80% (v/v) Ethanol im Wasserbad bei 55°C vollständig entfärbt und anschließend für 5-10 min mit Lugol'scher Lösung [0,3% (w/v) Iod, 0,7% (w/v) Kaliumiodid] inkubiert. Die Färbung wurde schließlich durch Waschen der Blätter in H<sub>2</sub>O abgestoppt.

### 2.16 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Der Gesamtchlorophyllgehalt von Kartoffel-Blattmaterial wurde nach Extraktion mit 80% (v/v) Ethanol über die Extinktion bei 652 nm photometrisch bestimmt und nach Arnon (1949) mit  $E_{652} / 34,5 = \text{mg Chlorophyll m}^{-1}$  berechnet.

### 2.17 Virusinfektion und immunologische Bestimmung des Virustiters

Für die Infektion von Tabakpflanzen wurde ein PVY<sup>N</sup> (Stamm N) Isolat von der Bundesanstalt für Züchtungsforschung and Kulturpflanzen (Aschersleben) erhalten und Virusextrakt durch Homogenisieren von infiziertem Blattmaterial in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0 (~1 g Blattmaterial in 20 ml Puffer) hergestellt. Zur

Pflanzeninokulation wurden untere *source*-Blätter mit Carborundum (SiC, Sigma) bestreut, der Virusextrakt mit einem Pistill auf der Blattoberfläche gleichmäßig verrieben, und die behandelten Blätter nach wenigen Minuten Einwirkzeit mit Wasser abgespült. Virussympptome konnten in systemischen Blättern etwa 6-7 Tage nach der Inokulation detektiert werden (Herbers *et al.*, 1996a).

Zur Quantifizierung des Virustiters wurde Blattmaterial in PBS-Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20, 2% (w/v) PVP 25000 und 0,2% (w/v) BSA homogenisiert. Serielle Verdünnungen des Pflanzenextraktes (1:2 – 1:128) wurden mittels Doppeltem Antikörper Sandwich (DAS)-ELISA unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen PVY (BIOREBA, Reinach, Schweiz) analysiert. Der ELISA-Test wurde dabei nach dem Protokoll von BIOREBA durchgeführt und Extinktionen bei 405 nm mit dem ELISA-Lesegerät 340 ATTC (SLT, Crailsheim) bestimmt (vgl. auch Herbers *et al.*, 1996a).

## 2.18 Farbstoff-gekoppelte Mikroinjektionen

Mikroinjektionstechniken mit Farbstoffen unterschiedlichen Molekulargewichtes (MG) wurden zur Bestimmung des plasmodesmalen Ausschlussvermögens in MP17 transgenen Tabakpflanzen wie in Shalitin *et al.* (2002) beschrieben eingesetzt. Bei den Farbstoffen handelte es sich um Lucifer yellow CH (LYCH, MG von 457 Da) sowie Fluorescein Isothiocyanat-gekoppelte Dextrane (FITC-Dextran) mit 9,7 und 12,0 kDa MG. Injizierte Blätter (i.d.R. 4. bis 5. Blatt von oben, Nr. 1 als Blatt mit der Länge von 3 cm definiert) wurden mit der abaxialen Seite nach oben unter einem Fluoreszenzmikroskop (Modell BH-2, Olympus Optical Co., Tokio, Japan) auf einem Glasobjektträger mit Doppelklebeband fixiert. Die Epidermis wurde von einem 20-50 mm<sup>2</sup> großen Mesophyllbereich vorsichtig abgezogen und das freigelegte Gewebe sofort mit H<sub>2</sub>O überschichtet. Glas-Mikropipetten mit einem inneren Durchmesser von 0,5 mm wurden mit Hilfe eines Mikropipettenziehers (Modell Nr. P-87, Sutter Instrument Co., Novato, USA) aus 1 mm Borsilikat-Glaskapillaren (World Precision Instruments, Sarasota, USA) hergestellt. Die Druckinjektion der Farbstoffprobe in die Zielzelle erfolgte mit einer gekoppelten Apparatur aus Mikromanipulator (Modell 5242, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) und Mikroinjektor (Modell 5171, Eppendorf-Netheler-Hinz), und die Ausbreitung des Farbstoffs in die Nachbarzellen wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt.



## 2.19 Bestimmung von Chlorophyllfluoreszenz und Photosyntheseraten

Chlorophyllfluoreszenz wurde mit einem pulsmoduliertem PAM-2000 Fluoreszenzmessgerät (Walz, Effeltrich) nach dem experimentellen Protokoll von Schreiber *et al.* (1986) und unter Verwendung der Nomenklatur von van Kooten und Snell (1990) gemessen. Die Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) wurde in dunkeladaptierten (30 min) Pflanzen durch Applikation schwach pulsierenden Rotlichtes ( $< 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) erhalten und die maximale Fluoreszenz ( $F_m$ ) während eines Weißlichtblitzes ( $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) von 0,8 s bestimmt. Die maximale Quantenausbeute des Photosystems II wurde schließlich nach der Formel  $(F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m$  berechnet.

Gaswechsellmessungen an endständigen Blättern von Kartoffelfiedern wurden mit Hilfe des portablen Photosynthese-Systems LI-6400 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) durchgeführt, wobei die  $\text{CO}_2$ -Konzentration in der Messküvette auf 400 ppm und die Temperatur auf  $20^\circ\text{C}$  eingestellt wurde. Für die Bestimmung von Lichtsättigungskurven des  $\text{CO}_2$ -Gaswechsels wurde die photosynthetisch aktive Strahlung (PAR) zwischen 0 und 2000  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  variiert.

## 2.20 Fluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopische Analyse von GFP-Fusionsproteinen in transgenen Pflanzen erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Modell LSM 410 oder LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena) sowie einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, Carl Zeiss, Jena) mit Hilfe von geeigneten Filtersätzen (Carl Zeiss, Jena) in den aufgeführten Wellenlängenbereichen.

**Tab. 2-3:** Filtersätze mit Wellenlängenbereichen zur Anregung und Detektion von GFP und Chlorophyllfluoreszenz.

|             | Axiovert 135 |              | LSM 410 / 510 META |              |
|-------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|
|             | Anregung     | Emission     | Anregung           | Emission     |
| GFP         | 450 – 490 nm | 515 – 565 nm | 488 nm             | 510 – 525 nm |
| Chlorophyll | 450 – 490 nm | 515 – 700 nm | 488 nm             | 645 – 700 nm |

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Analysen zur Wirkungsweise des *Potato leafroll virus* Movement Proteins (PLRV-MP17) auf symplastische Transportprozesse in transgenen Pflanzen

Virale Movement Proteine (MPs) interagieren mit strukturellen Komponenten der Plasmodesmen (PDs) und ermöglichen durch Modifikation der plasmodesmalen Leitfähigkeit den Zell-zu-Zell Transport von Virusmaterial im infizierten Pflanzengewebe. Die stabile Expression von MP in transgenen Pflanzen führt darüber hinaus zu Änderungen des Kohlenhydratmetabolismus und der Photoassimilatverteilung, was in dem Konzept resultierte, dass MPs mit endogenen, regulatorischen Makromolekülen (Proteine, RNA) um die plasmodesmale Transportmaschinerie konkurrieren und somit in *sink/source*-Interaktionen eingreifen (Lucas und Wolf, 1999). MP exprimierende Pflanzen bieten somit ein wertvolles experimentelles System, um die Wirkungsweise von MP auf PD-vermittelte Transportprozesse sowie die Regulation der Photoassimilatverteilung zwischen *source* und *sink* zu analysieren und Komponenten des plasmodesmalen Transportweges zu identifizieren. Da MP transgene Pflanzen häufig eine erhöhte Resistenz gegenüber Virusinfektionen zeigten, lassen sich zudem Mechanismen der Pathogen- (Baulcombe, 1996; Lomonosoff 1995) oder Kohlenhydrat-vermittelten Resistenz (Herbers *et al.*, 1996) analysieren. Unter diesen Gesichtspunkten wurde in Ergänzung zu den früheren Studien an TMV-MP exprimierenden Pflanzen, von Herbers *et al.* (1997) sowie Hofius (1998) das PLRV-MP17 als Modellsystem etabliert und begonnen, den Einfluss des MP eines Phloem-limitierten Virus auf Kohlenhydratmetabolismus, *sink/source*-Beziehungen und Resistenzeigenschaften in transgenen Tabakpflanzen zu untersuchen. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten die vorhandenen transgenen Linien weiter zellbiologisch, biochemisch und virologisch analysiert werden und darüber hinaus ein induzierbares Expressionssystem in Tabakpflanzen sowie ein genetisches System in *Arabidopsis* etabliert werden, um den Wirkmechanismus von MP17 auf PDs und symplastische Transportprozesse aufzuklären.

### 3.1.1 Konstitutive Expression von MP17 und MP17:GFP in *Nicotiana tabacum*

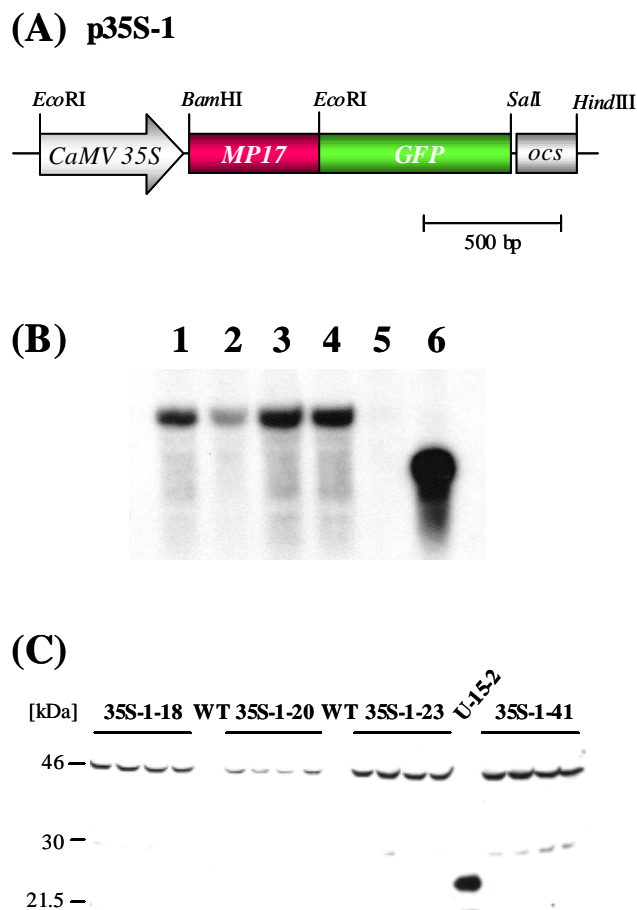
Die konstitutive und hohe Expression von MP17 in *Nicotiana tabacum* führte in früheren Studien (Herbers *et al.*, 1997, vgl. 1.4.2) zu einer starken Wachstumsretardierung transgener Linien und deutlichen phänotypischen Änderungen in *source*-Blättern, die von einer drastischen Akkumulation an löslichen Zuckern und Stärke begleitet waren. MP17 exprimierende Pflanzen zeigten zudem eine erhöhte, wenn auch limitierte Resistenz gegenüber der Infektion mit PVY. Um zu untersuchen, ob die MP17-vermittelten Änderungen des Kohlenhydratmetabolismus und der Virusresistenz auf die Modifikation spezifischer PDs oder eher auf pleiotrope Effekte bedingt durch das hohe MP17-Expressionsniveau zurückzuführen sind, wurden phänotypisch unveränderte Tabaklinien, die MP17 in translationaler Fusion mit GFP exprimierten (Hofius 1998; Abb. 4A), mit den phänotypischen Linien verglichen. In einem integrativen Ansatz, der subzelluläre Lokalisierungsstudien, Farbstoff-gekoppelte Mikroinjektionen, Kohlenhydratanalysen und Virusresistenz-Bestimmungen umfasste, sollten dabei die folgenden Fragen beantwortet werden.

- Mit welchen PDs interagiert MP17 in transgenen Pflanzen?
- Führt die Assoziation von MP17 mit PDs zu einer Veränderung der symplastischen Permeabilität?
- Gibt es eine Korrelation zwischen MP17-Proteinmenge, veränderter plasmodesmaler Leitfähigkeit, Kohlenhydratstatus und Virusresistenz?

#### 3.1.1.1 Verifizierung der MP17:GFP-Expression in transgenen Tabaklinien

Das binäre Konstrukt zur konstitutiven Expression von MP17 in C-terminaler Fusion mit einem optimierten GFP-Derivat (mGFP5, Siemering *et al.*, 1996) wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Hofius (1998, Abb. 4A) erstellt und in Tabakpflanzen transformiert. Es wurden 50 Kanamycin-resistente Transformanden (T0-Generation) über *Northern*-Analyse getestet und die T1-Generation von 4 Linien mit deutlicher Akkumulation *MP17:GFP*-spezifischer Transkripte für weitere Analysen eingesetzt (Abb. 4B). Diese Linien werden im Folgenden als 35S-1-18, 35S-1-20, 35S-1-23 und 35S-1-41 bezeichnet. Zur Verifizierung der Expression des MP17:GFP-Fusionsproteins wurden Blattextrakte der verschiedenen Linien über *Western Blot*-Analyse mit Hilfe des anti-MP17 Antiserums (Tacke *et al.*, 1993) untersucht. Ein spezifisches Proteinsignal ließ sich in einer Höhe von 44-45 kDa detektieren,

was in guter Übereinstimmung mit dem berechneten Wert für das Fusionsprotein von 17 kDa (MP17) und 27 kDa (GFP) ist. Allerdings wurde früher beobachtet, dass MP17 ohne Fusionspartner in transgenen Kartoffel- (Schmitz *et al.*, 1997) und Tabakpflanzen (Herbers *et al.*, 1997) in einer Höhe von etwa 24 kDa migriert, was auf mögliche post-translationale Modifizierungen, wie z.B. Phosphorylierung zurückgeführt wurde. In Abb. 4C sind die MP17:GFP-Mengen für jeweils 4 repräsentative Pflanzen der ausgewählten Tabaklinien gezeigt, wobei Linie 35S-1-41 die stärkste Expression und 35S-1-20 das niedrigste Niveau aufweist. Allerdings war die Expression in allen 4 Linien im Vergleich zu U-15-2 (Herbers *et al.*, 1997) deutlich vermindert, und entsprechend zeigten alle MP17:GFP transgenen Linien im Unterschied zu U-15-2 keine phänotypischen Veränderungen gegenüber den Kontrollpflanzen.



**Abb. 4:** Expressionsanalyse von MP17:GFP transgenen Linien.

**(A)** Schematische Darstellung der binären Expressionskassette p35S-1, die zur Transformation von Tabak eingesetzt wurde. GFP wurde am 3'-Ende von MP17 fusioniert und die gesamte kodierende Region (1209 bp) zwischen CaMV 35S-Promotor und *ocs*-Terminator des Bin19-Vektors in die *Bam*HI/*Sa*II Schnittstellen inseriert (Hofius, 1998).

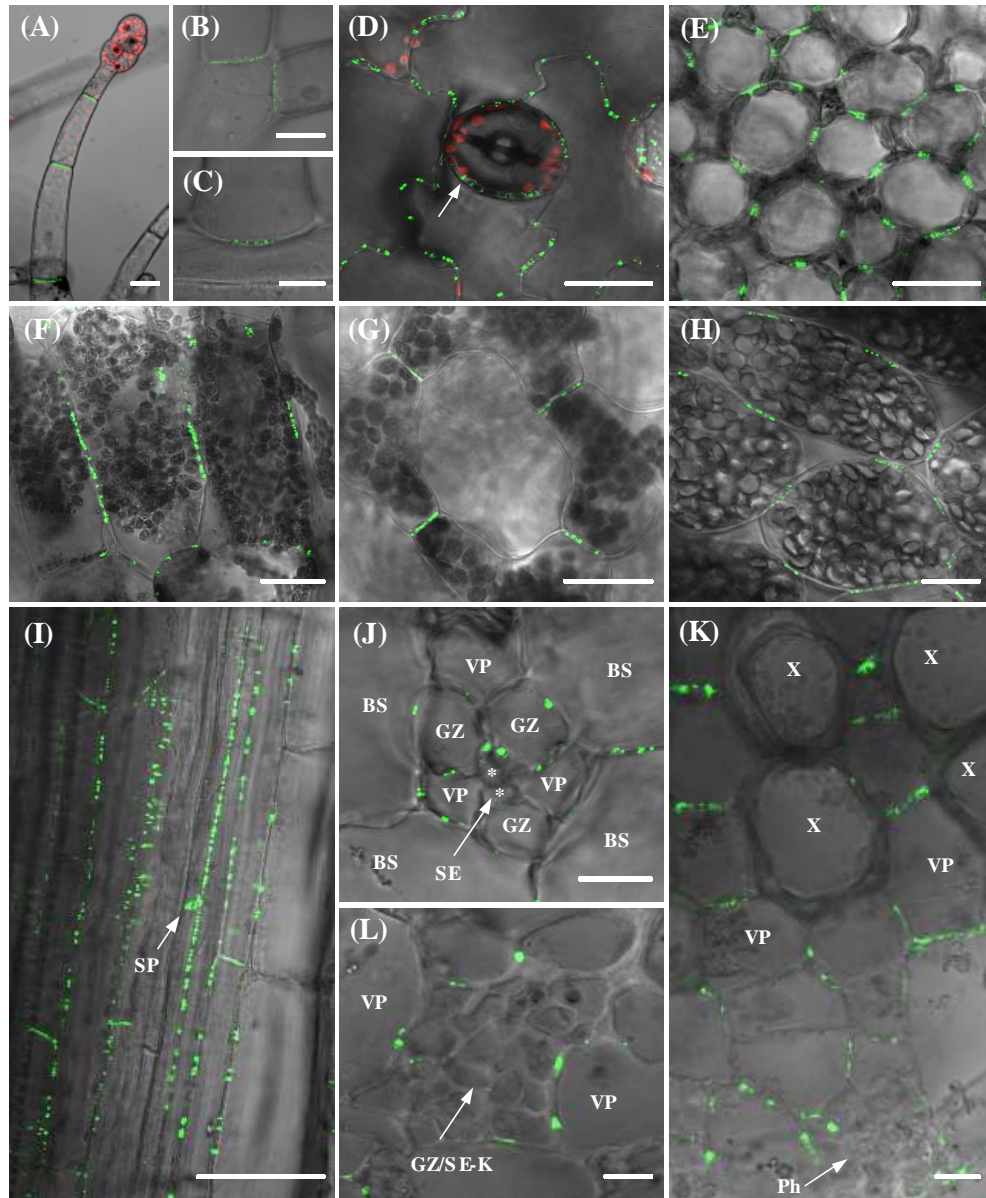
**(B)** Northern-Analyse MP17:GFP-spezifischer Transkripte. Gesamt-RNA wurde aus Wildtyp (Spur 5) und MP17:GFP transgenen Pflanzen der Linien 35S-1-18, 35S-1-20, 35S-1-23, sowie 35S-1-41 (Spur 1-4) isoliert. RNA der Linie U-15-2 diente als Positivkontrolle (Spur 6).

**(C)** Immunoblot-Analyse der MP17:GFP-Proteinakkumulation. Pflanzenextrakte von jeweils vier verschiedenen Pflanzen der MP17:GFP transgenen Linien 35S-1-18, 35S-1-20, 35S-1-23, 35S-1-41, der MP17 exprimierenden Linie U-15-2 sowie von Kontrollpflanzen (WT), wurden über *Western Blotting* unter Verwendung eines polyklonalen

anti-MP17 Antiserums (1:5000 Verdünnung) sowie eines sekundären HRP-konjugierten IgG Antikörpers (1:100000) analysiert. Identische Mengen an Gesamtprotein wurden auf jede Spur aufgetragen. Das MP17:GFP-Fusionsprotein migrierte bei etwa 45 kDa, während MP17 alleine bei 24 kDa zu detektieren war.

### 3.1.1.2 Subzelluläre Lokalisierung von MP17 und MP17:GFP

Die subzelluläre Lokalisierung von MP17 und MP17:GFP wurde in transgenen Tabaklinien über die Detektion von GFP mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) und der Immunolokalisation von MP17 und MP17:GFP mit Hilfe von Immunogold-Markierungen unter Verwendung des anti-MP17 Antikörpers durchgeführt.



**Abb 5:** Lokalisierung des MP17:GFP-Fusionsproteins in verschiedenen Geweben transgener Tabakpflanzen (35S-1-41)

(A), (B) und (C) Trichomzellen von *sink*-Blättern (2 cm). Grünfluoreszierende Punkte sind nur in den Zellwandbereichen angrenzender Zellen und nicht in den lateralen Zellwänden zu detektieren. Dies wird deutlich in der Übersicht eines Blatttrichoms (A), an den Kontaktzonen eines verzweigten Trichoms (B) sowie an dem Übergang einer Trichombasiszelle zur Epidermiszelle (C).

(Fortsetzung Abb. 5)

**(D)** Epidermis mit dem Stomataapparat eines *source*-Blattes. Grünfluoreszierende Punkte sind in den Zellwänden zwischen einzelnen Epidermiszellen und auch zwischen Epidermis und Schließzelle (Pfeil) erkennbar.

**(E), (F)** Längs- (E) und Querschnitt (F) durch das Palisadenparenchym eines *source*-Blattes verdeutlichen die Beschränkung der Fluoreszenz auf die Kontaktstellen angrenzender Zellen.

**(G)** Längsschnitt durch das Schwammparenchym eines *source*-Blattes mit fluoreszierenden Punkten im Zellwandbereich von vier benachbarten Parenchymzellen.

**(H)** Schwammparenchymzellen in unmittelbarer Nähe von Venen höherer Ordnung („minor veins“) mit GFP-Markierung an allen Zell-zu-Zell Verbindungen.

**(I)** Längsschnitt durch das Leitgewebe der Venenklasse II eines *source*-Blattes zeigt deutliche GFP-Fluoreszenz zwischen verschiedenen Phloemzellen und die Markierung einer Siebplatte (SP) zwischen zwei Siebelementen.

**(J)** Querschnitt durch die kleinste Venenklasse des „minor vein“ Phloems eines *source*-Blattes. Grüne Fluoreszenz markiert die Verbindungen zwischen zwei Bündelscheidenzellen (BS), zwischen BS und vaskulärem Parenchym (VP), BS und Geleitzelle (GZ), VP und GZ sowie zwischen GZ und Siebelementen (SE).

**(K)** Querschnitt durch das Leitgewebe der Venenklasse I (Mittelrippe) eines *source*-Blattes. GFP-vermittelte Fluoreszenz ist überwiegend im vaskulären Parenchym zwischen einzelnen Xylemgefäßen und zwischen Xylem- und Phloemgewebe (Ph) zu detektieren.

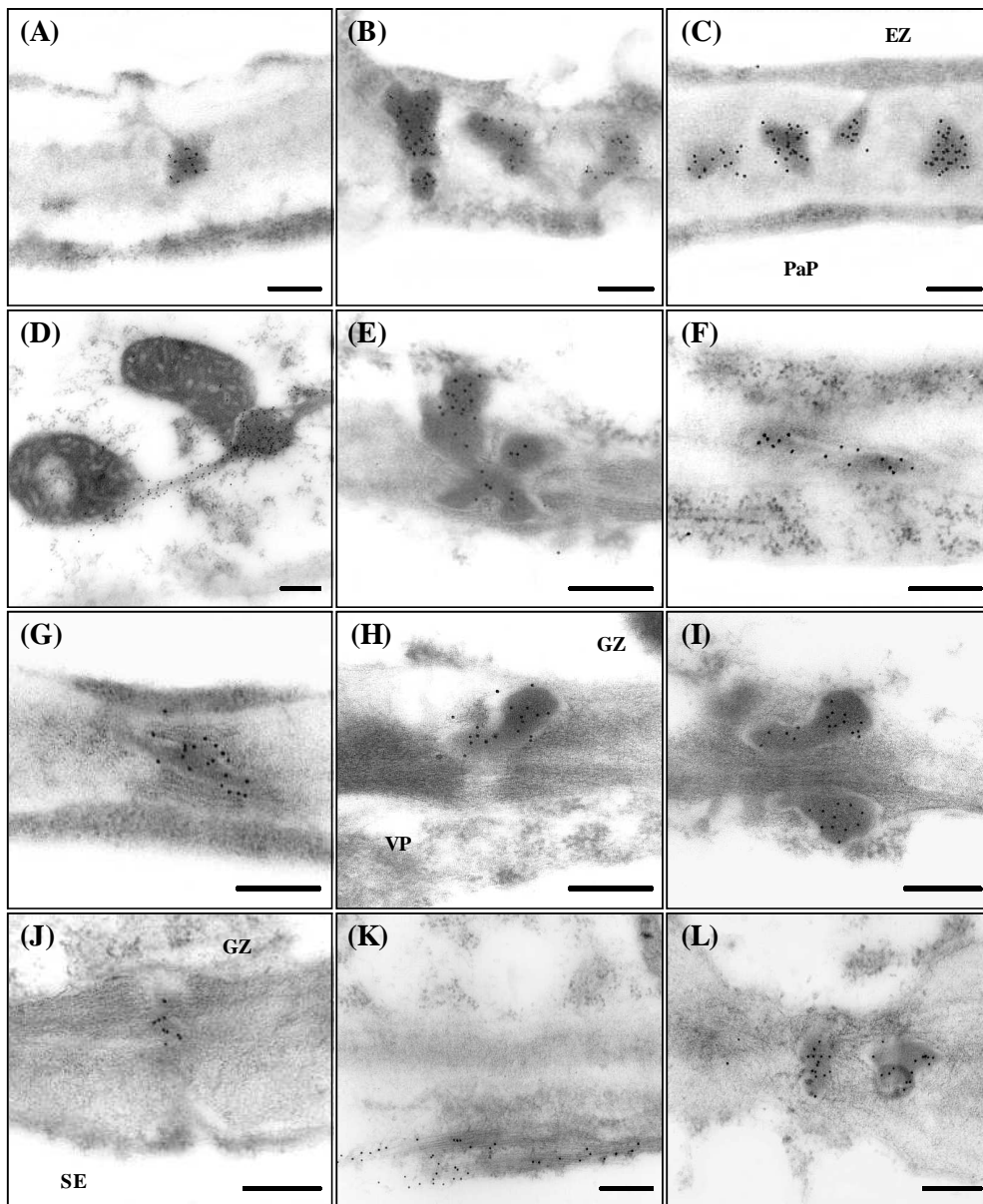
**(L)** Die Vergrößerung des Phloemgewebes der Venenklasse I (Mittelrippe) eines *source*-Blattes verdeutlicht die stärkste Fluoreszenz zwischen vaskulären Parenchymzellen. Die Markierung mit GFP ist dagegen kaum innerhalb der GZ/SE-Komplexe zu detektieren.

Maßstäbe geben jeweils 25 µm (A-G) und 10 µm (H-L) an.

GFP-Fluoreszenz ließ sich in allen 4 transgenen Linien detektieren, und die Tabaklinie mit der stärksten Expression (35S-1-41) wurde für eine detaillierte Analyse verschiedener Zelltypen und Gewebe ausgewählt. Im Mesophyll von *source*-Blättern war eine punktuelle Fluoreszenz im Zellwandbereich der Zell-zu-Zell Verbindungen in der Epidermis, dem Palisaden- sowie dem Schwammparenchym zu lokalisieren (Abb 5D-H). Interessanterweise war GFP-Fluoreszenz auch in der Zellwand zwischen Schließzelle und angrenzender Epidermiszelle zu finden (Abb. 5D), ein Bereich, für den halbseitige PDs auf Seiten der Epidermiszelle nachgewiesen wurden (Itaya *et al.*, 1998). Trichome zeigten fluoreszierende Punkte sowohl an der Kontaktstelle zwischen Epidermis und Trichombasiszelle als auch zwischen einzelnen Trichomzellen. Die Akkumulation von MP17:GFP war ebenfalls in Trichomen wachsender *sink*-Blätter (bis 2 cm) zu detektieren (Abb. 5A-C), während Zellen des Mesophyllgewebes keine Fluoreszenz aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Da in früheren Arbeiten für MP17 in transgenen Kartoffelpflanzen eine hohe Affinität zu PDs des Phloemgewebes nachgewiesen werden konnte, wurde das vaskuläre Gewebe verschiedener Venenklassen [Klassifizierung für *Nicotiana* ssp. nach Roberts *et al.* (1997)] in *source*-Blättern auf das Auftreten von GFP-Fluoreszenz analysiert. Abbildung 5 (I,J) zeigt das typische Fluoreszenzmuster zwischen vaskulären Parenchymzellen und innerhalb des GZ/SE-Komplexes von Klasse II und IV Venen („minor veins“). Außerdem war die Fluoreszenz in

Xylem- und Phloemgewebe von Klasse I-Venen zu detektieren, allerdings in GZ/SE-Komplexen kaum nachweisbar (Abb. 5K,L).



**Abb 6:** Immunogold-Markierung von MP17 (U-15-2) und MP17:GFP (35S-1-41) an Plasmodesmen verschiedener Zelltypen in *source*-Blättern transgener Tabakpflanzen. MP17 und MP17:GFP wurden mit polyklonalem anti-MP17 Antikörper und Gold (10 nm)-konjugiertem Protein A detektiert.

(A), (B) Markierung von PDs zwischen zwei Epidermiszellen von MP17:GFP (A) und MP17 (B) transgenen Pflanzen.

(C) PDs zwischen Epidermiszelle (EZ) und Palisadenparenchym (PaP) in einer MP17 exprimierenden Pflanze.

(D) Markierung von filamentösen, nicht-plasmodesmalen Strukturen innerhalb des Palisadenparenchyms einer phänotypischen, MP17 transgenen Pflanze.

(E), (F) Komplexe, verzweigte PDs im Schwammparenchym von MP17 (E) und MP17:GFP (F) transgenen Pflanzen.

(G) PDs zwischen vaskulären Parenchymzellen in MP17:GFP transgenen Pflanzen.

(H) Markierung der plasmodesmalen Verbindung zwischen einer Geleitzelle (GZ) und einer vaskulären Parenchymzelle (VP) in einer MP17 exprimierenden Pflanze.

(Fortsetzung Abb. 6)

(I) PD zwischen zwei Geleitzellen in einer MP17 transgenen Pflanze.

(J) Markierung eines PD zwischen GZ und Siebelement (SE) in einer MP17 akkumulierenden Pflanze.

(K) Markierung filamentöser, nicht-plasmodesmaler Strukturen innerhalb einer Siebröhre einer phänotypischen MP17 transgenen Pflanze.

(L) PD zwischen zwei Siebelementen in einer MP17 exprimierenden Pflanze.

Maßstab zeigt jeweils 0,2 µm an.

Da sich die punktuelle Fluoreszenz ausschließlich auf Zellwandbereiche verschiedener Zelltypen beschränkte, war eine Assoziation von MP17:GFP mit plasmodesmalen Strukturen naheliegend. Aus diesem Grund wurde die MP17-Lokalisation über Immunogold-Markierung in den Linien 35S-1-41 und U-15-2 überprüft. Eine Markierung von MP17:GFP mit anti-MP17 Antiserum konnte ausschließlich an plasmodesmalen Verbindungen zwischen verschiedenen Zelltypen im Mesophyll und vaskulären Gewebe detektiert werden (Abb. 6A,F,G). Die Markierung der PDs in phänotypischen MP17 transgenen Linien erschien allerdings stärker ausgeprägt als in MP17:GFP exprimierenden Pflanzen und war in *source*-Blättern an komplexen plasmodesmalen Strukturen des nicht-vaskulären und vaskulären Gewebes zu detektieren (Abb. 6B,C,E,H-J,L), während einfache PDs des *sink*-Gewebes nicht markiert waren. Bemerkenswert war, dass in der phänotypischen Linie im Gegensatz zu MP17:GFP transgenen Pflanzen auch filamentöse, nicht-plasmodesmale Strukturen in Mesophyllzellen und Siebelementen markiert waren, die an Komponenten des Cytoskeletts erinnerten (Abb. 6D,K).

### 3.1.1.3 Bestimmung der plasmodesmalen Permeabilität mittels Mikroinjektionen

Die ausschließliche Ausbreitung von Luteoviren im vaskulären Gewebe wurde in früheren Arbeiten mit der Phloem-limitierten Wirkung des Movement Proteins erklärt (Derrick und Barker, 1997). Allerdings lässt die Assoziation des MP17 mit PDs des nicht-vaskulären Gewebes in MP17 transgenen Kartoffeln (Schmitz *et al.*, 1997) und Tabakpflanzen (vgl. 3.1.1.2) einen eher generellen, nicht nur auf Phloemzellen beschränkten Einfluss des MP17 auf plasmodesmale Funktionen vermuten. Aus diesem Grund sollte mit Hilfe von Farbstoffgekoppelten Mikroinjektionen das plasmodesmale Ausschlussvermögen im Mesophyllgewebe MP17 und MP17:GFP exprimierender Pflanzen untersucht werden. Dazu wurden Lucifer yellow (457 Da) sowie FITC-markierte Dextrane mit unterschiedlichen Molekulargewichten (9,7 und 12,0 kDa) in Zellen des Schwammparenchyms von *source*-Blättern injiziert und die Ausbreitung der Farbstoffe in die Nachbarzellen mikroskopisch verfolgt. Für die Mikroinjektionsexperimente wurden Pflanzen der phänotypischen MP17 transgenen Linien



(U-15-2 und U-15-9) sowie die MP17:GFP exprimierenden Linien mit dem niedrigsten (35S-1-20) und höchsten Expressionsniveau (35S-1-41) eingesetzt.

Wie in Tabelle 3-1 zusammengefasst, zeigten Kontrollpflanzen nur eine symplastische Ausbreitung des 457 Da Farbstoffes, während die 9,7 und 12,0 kDa FITC-Dextrane nicht aus den injizierten Mesophyllzellen in die angrenzenden Zellen gelangten. Im Gegensatz dazu ergaben die Injektionen FITC-markierter Dextrane, dass die MP17- und MP17:GFP-Expression zur Erhöhung des plasmodesmalen Ausschlussvermögens bis zu 12 kDa führte.

**Tab. 3-1.** Ausbreitung fluoreszierender Proben über den symplastischen Transportweg innerhalb des Mesophyllgewebes der MP17:GFP (35S-1-20, 35S-1-41) oder MP17 exprimierenden Tabaklinien (U-15-2, U-15-9).

| Pflanzenlinie       | LYCH <sup>a</sup> | FITC-Dextran |         |
|---------------------|-------------------|--------------|---------|
|                     |                   | 9,7 kDa      | 12 kDa  |
| Kontrolle           | 4 (4)             | 1 (12)       | 2 (13)  |
| U-15-2              | 5 (5)             | 11 (13)      | 11 (13) |
| U-15-2 <sup>b</sup> | 6 (7)             | 11 (15)      | 12 (14) |
| U-15-9              | n.d.              | 5 (8)        | 10 (13) |
| 35S-1-20            | 6 (6)             | n.d.         | 20 (25) |
| 35S-1-41            | n.d.              | 7 (11)       | 12 (16) |

Daten repräsentieren Anzahl an Injektionen, die zu einer Ausbreitung des spezifischen Farbstoffes in die Nachbarzellen führten (Werte in Klammern geben die Gesamtzahl an Injektionen an).

<sup>a</sup>Lucifer yellow CH; <sup>b</sup>phänotypische *source*-Blätter der MP17 exprimierenden Linie U-15-2, n.d., nicht durchgeführt.

Die phänotypischen Änderungen in *source*-Blättern MP17 transgener Pflanzen wurden von Herbers *et al.* (1997) auf die massive Akkumulation von löslichen Zuckern und Stärke zurückgeführt. Um zu überprüfen, ob die Phänotypentwicklung mit den MP17-vermittelten Änderungen der plasmodesmalen Permeabilität im Mesophyll korrelierte, wurden auch ältere *source*-Blätter der Linie U-15-2 mit den typischen chlorotischen Interkostalfeldern auf symplastische Ausbreitung der injizierten Farbstoffe getestet. Interessanterweise war in diesen Blättern die plasmodesmale Leitfähigkeit in vergleichbarer Weise erhöht wie in den nicht betroffenen Blättern. Dies zeigt, dass offensichtlich keine direkte Abhängigkeit zwischen plasmodesmaler Lokalisation von MP17 im Mesophyll und der Kohlenhydratakkumulation sowie Phänotypentwicklung besteht.

### 3.1.1.4 Korrelation zwischen MP17-Proteingehalten und Kohlenhydratstatus

Da die MP17:GFP transgenen Linien keinen Phänotyp zeigten, sollte überprüft werden, ob dies auf nur geringfügige Änderungen im Kohlenhydratmetabolismus zurückgeführt werden kann. Folglich wurden die Gehalte an löslichen Zuckern und Stärke in ausgewachsenen *source*-Blättern der Fusionsprotein exprimierenden Linien bestimmt. Wie in Tabelle 3-2 dargestellt, war keine Akkumulation an Kohlenhydraten etwa 6 h nach Beginn der Lichtperiode gegenüber den Kontrollpflanzen nachweisbar. Vielmehr war eine generelle Verminderung des Kohlenhydratstatus in den vier transgenen Linien zu beobachten, die sich als statistisch signifikant für lösliche Zucker in den Linien 35S-1-18 und 35S-1-41 sowie für Stärke in allen 4 Linien erwies. Hingegen war die Verteilung zwischen löslichen Zuckern und Stärke leicht aber nicht statistisch signifikant verändert.

**Tab. 3-2:** Kohlenhydratgehalte in *source*-Blättern MP17:GFP transgener Linien.

| Linie     | Glucose<br>[mmol m <sup>-2</sup> ] | Fructose<br>[mmol m <sup>-2</sup> ] | Saccharose<br>[mmol m <sup>-2</sup> ] | Stärke<br>[mmol Hexosen m <sup>-2</sup> ] | Lösliche<br>Zucker/Stärke |
|-----------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------|
| Kontrolle | 2.28±0.35                          | 1.99±0.18                           | 2.38±0.11                             | 28.15±1.94                                | 0.25                      |
| 35S-1-18  | 1.38±0.25*                         | 1.26±0.22**                         | 1.88±0.17*                            | 14.95±2.17***                             | 0.34                      |
| 35S-1-20  | 1.91±0.13                          | 1.52±0.07*                          | 2.04±0.08                             | 20.67±2.38*                               | 0.29                      |
| 35S-1-23  | 1.24±0.16**                        | 1.29±0.14**                         | 1.81±0.19**                           | 16.43±2.78**                              | 0.30                      |
| 35S-1-41  | 2.12±0.18                          | 1.89±0.13                           | 2.13±0.16                             | 20.81±2.79*                               | 0.32                      |

Blattproben wurden 6 h nach Beginn der Lichtperiode geerntet. Die Pflanzen hatten 14 Blätter und Proben wurden von vollständig entwickelten *source*-Blättern genommen (Blatt Nr. 9, wobei Nr. 1 als *sink*-Blatt mit einer Länge von 1 cm definiert wurde). Die Daten wurden von sechs Pflanzen der transgenen Linien und von 10 Pflanzen der Kontrolle erhalten, wobei für jedes Einzelblatt 4 Proben gemessen und gemittelt wurden. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben und signifikante Unterschiede (\**P*<0,05; \*\**P*<0,01; \*\*\**P*<0,001) im Vergleich zu den Kontrollen wurden mit Hilfe des *Student's t*-Test ermittelt.

Da die Expression von MP17 und MP17:GFP gleichermaßen die plasmodesmale Leitfähigkeit in Mesophyllzellen erhöhte und damit nicht mit der Phänotypentwicklung korrelierte, wurde der Einfluss des MP17-Expressionsniveaus auf den Kohlenhydratmetabolismus untersucht. Zu diesem Zweck wurde die T3-Generation der heterozygoten Linie U-15-2, die infolge multipler Transgen-Insertionen eine große Variationsbreite phänotypisch betroffener Pflanzen umfasste (Abb. 7A), ausgewählt, um den Status an löslichen Zuckern und Stärke mit der MP17-Proteinmenge innerhalb eines *source*-

Blattes zu korrelieren. Vor der Probennahme wurden zunächst alle angezogenen T3-Pflanzen über *Northern*-Analyse getestet und nur solche selektiert, die *MP17*-spezifische Transkripte akkumulierten. So wurden schließlich in Blattproben von 23 ausgewählten Pflanzen, die unter den gleichen Bedingungen wie die *MP17*:GFP transgenen Linien angezogen wurden, Kohlenhydratgehalte und *MP17*-Proteingehalt bestimmt. Die Quantifizierung der *MP17*-Immunosignale erfolgte dabei über quantitative *Western*-Analyse unter Verwendung des polyklonalen anti-*MP17* Antikörpers. Zum Abgleich des Gesamtproteingehaltes der verschiedenen Extrakte wurde die zusätzliche Beprobung der *Western Blots* mit dem anti-Transketolase (anti-TK) Antiserum (Henkes *et al.*, 2001) durchgeführt und mögliche Unterschiede in der Signalstärke zwischen einzelnen *Blots* durch jeweils 4 unabhängige Positivkontrollen ausgeglichen.

Infolge der unterschiedlich starken Ausprägung der Phänotypen variierten die Kohlenhydratgehalte zwischen einzelnen Pflanzen erheblich. So lagen die Gehalte für Glucose zwischen 0,29 und 20,74 (mmol m<sup>-2</sup>), für Fructose zwischen 0,64 und 5,34 (mmol m<sup>-2</sup>), für Saccharose zwischen 1,23 und 5,85 (mmol m<sup>-2</sup>), sowie für Stärke zwischen 9,27 und 81,11 (mmol Hexosen m<sup>-2</sup>). Im Vergleich dazu wurden die Werte für die Kontrollen (*n*=10) mit 2,28 ± 0,35 mmol m<sup>-2</sup> (Glucose), 1,99 ± 0,18 mmol m<sup>-2</sup> (Fructose), 2,38 ± 0,11 mmol m<sup>-2</sup> (Saccharose), und 28,25 ± 1,94 mmol Hexosen m<sup>-2</sup> (Stärke) bestimmt (vgl. Tab. 3-2). Die Daten zeigten, dass neben der bereits früher beobachteten drastischen Akkumulation von löslichen Zuckern und Stärke (Herbers *et al.*, 1997) in *source*-Blättern einer Reihe von Pflanzen eine signifikante Reduktion in den Kohlenhydratgehalten gegenüber den Wildtyp-Pflanzen zu beobachten war.

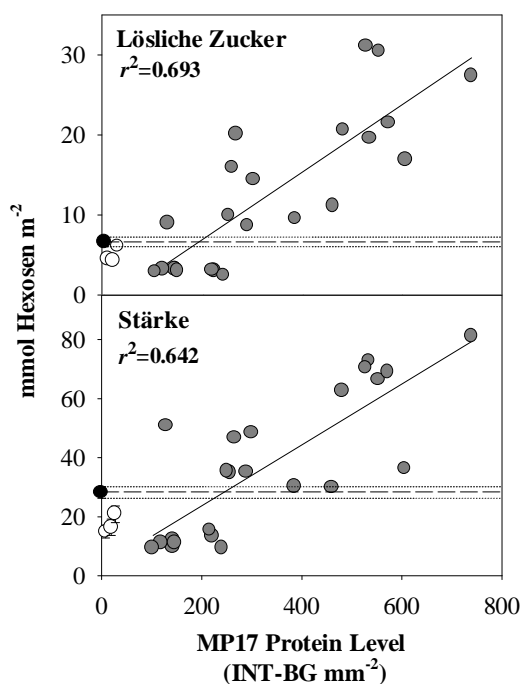
In Übereinstimmung mit den starken Unterschieden in der Phänotypausprägung erwiesen sich auch die quantifizierten *MP17*-Proteinmengen als sehr variabel und lagen zwischen 102,70 und 738,69 (INT-BG mm<sup>-2</sup>) relativer Signalstärke. Wurden die *MP17*-Gehalte gegen die entsprechenden Kohlenhydratkonzentrationen aufgetragen, so zeigte sich eine strikte lineare Korrelation. Die errechneten Korrelationskoeffizienten waren dabei am höchsten für Glucose ( $r^2=0,725$ ) gefolgt von Stärke ( $r^2=0,642$ ) und Saccharose ( $r^2=0,613$ ), während die Korrelation von *MP17* mit dem Fructosegehalt nur relativ gering ausgeprägt war ( $r^2=0,479$ ). Allerdings zeigten die Gesamtgehalte an löslichen Zuckern eine signifikante Abhängigkeit ( $r^2=0,693$ ) von der steigenden *MP17*-Proteinmenge (Abb. 7B). Das Expressionsniveau von *MP17*:GFP der Linien 35S-1-18, 35S-1-23 und 35S-1-41 wurde ebenfalls in jeweils 5 Pflanzen über quantitative *Western*-Analyse bestimmt. Es zeigte sich, dass *MP17*:GFP zu

einem deutlich geringeren Grad akkumulierte als MP17 in nicht-phänotypischen Linien (Abb. 7B).

(A)



(B)



Signale wurden quantifiziert und gegen die Gehalte an löslichen Kohlenhydraten (Summe aus Glucose, Fructose und Saccharose) sowie Stärke aufgetragen. Die Signalstärke ist mit  $\text{INT-BG mm}^{-2}$  angegeben, was für die Intensität des Chemilumineszenz-Signals abzüglich des Hintergrundwertes pro  $\text{mm}^2$  steht. Die lineare Regression ist als durchgezogene Linie dargestellt und der Korrelationskoeffizient  $r^2$  aufgeführt. Außerdem wurde der MP17:GFP-Proteingehalt in 5 Pflanzen der Linien 35S-1-18, 35S-1-20 und 35S-1-41 ermittelt und die Mittelwerte gegen die entsprechenden Kohlenhydratgehalte aufgetragen (leere Kreise mit Standardfehler). Die Gehalte an löslichen Zuckern und Stärke der Wildtyp-Kontrolle sind als Mittelwerte (schwarzer Kreis; gestrichelte Linie)  $\pm$  Standardfehler (gepunktete Linie) von 10 Pflanzen angezeigt (vgl. Tabelle 3-2).

### 3.1.1.5 Resistenzeigenschaften gegenüber der Infektion mit PVY

Die Expression der N-terminal um 24 Aminosäuren verlängerten Version des MP17 in transgenen Kartoffeln führte zu einer Breitspektrumresistenz gegen einige nicht-verwandte

**Abb. 7:** Phänotypische Variabilität MP17 transgener Pflanzen der Linie U-15-2 und Korrelation zwischen den quantifizierten MP17-Proteingehalten und der Akkumulation von Kohlenhydraten in *source*-Blättern.

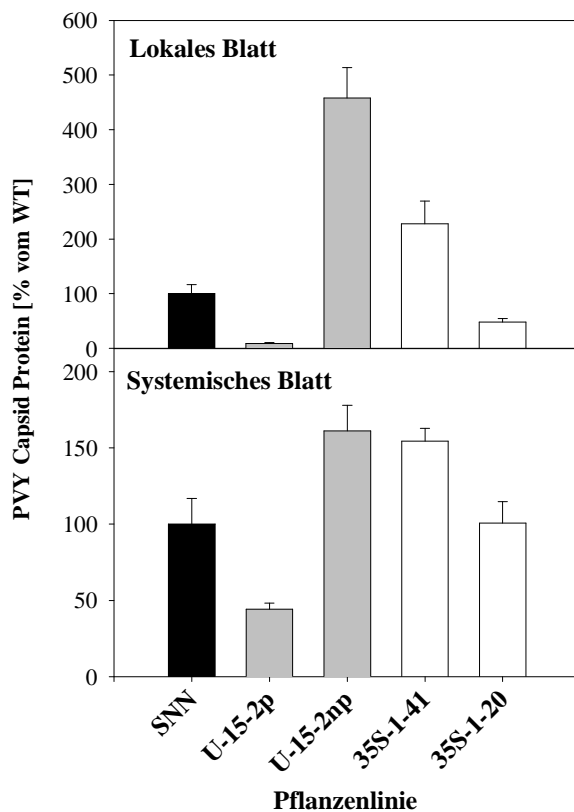
(A) MP17 exprimierende Pflanzen der heterozygoten Linie U-15-2 (T3-Generation) wurden für sieben Wochen unter Gewächshausbedingungen angezogen. In Abhängigkeit von der MP17-Expression konnte eine hohe Variation in der Ausprägung des Phänotyps beobachtet werden. Beispielhaft sind einige Pflanzen der Linie U-15-2 zusammen mit einer Wildtyp (WT)-Kontrolle desselben Alters gezeigt.

(B) Positive Korrelation zwischen MP17-Proteinmenge und Kohlenhydratakkumulation. Blattproben wurden 6 Stunden nach Beginn der Lichtperiode von 23 Pflanzen der Linie U-15-2 geerntet. Die Pflanzen hatten 14 Blätter (nicht-phänotypische Pflanzen) und Proben wurden von ausgewachsenen *source*-Blättern (Nr. 9, wobei Nr. 1 als jüngstes *sink*-Blatt mit einer Länge von 1 cm definiert wurde) genommen. Kohlenhydratgehalte wurden in 4 unabhängigen Proben bestimmt und gemittelt. Die MP17-Proteinexpression in den entsprechenden Blättern wurde über *Western*-Analyse unter Verwendung des polyklonalen anti-MP17 Antiserums sowie eines Chemilumineszenz Kits detektiert. Die

Viren (Tacke *et al.*, 1996). Hingegen konnte in entsprechenden transgenen Tabakpflanzen nur eine limitierte Resistenz gegenüber der Infektion mit PVY festgestellt werden, die sich vor allem während der frühen Infektionsphase manifestierte (Herbers *et al.*, 1997). Es sollte daher untersucht werden, ob der Schutz gegenüber PVY in den MP17 exprimierenden Linien auf eine Kohlenhydrat-vermittelte Resistenzantwort (Herbers *et al.*, 1996a) oder eher auf Pathogen-vermittelte Mechanismen zurückzuführen ist (Tacke *et al.*, 1996). Eine erhöhte Virusresistenz gegenüber PVY wurde bereits früher für andere Zucker-akkumulierende Pflanzen postuliert (Herbers *et al.*, 1996a), während eine Pathogen-vermittelte Resistenz mit dem Eingriff der MP-Expression in intra- und interzelluläre Transportfunktionen erklärt wurde (Tacke *et al.*, 1996; Kotlizky *et al.*, 2001).

Für die Infektionsexperimente wurde zunächst die Nachkommenschaft einer nicht-phänotypischen sowie einer phänotypischen Pflanze der Linie U-15-2 generiert, um einheitliche Populationen zu erhalten, die in Kohlenhydratstatus und Phänotypentwicklung deutlich voneinander abwichen und daher als U-15-2p (phänotypisch) und U-15-2np (nicht-phänotypisch) bezeichnet wurden. Außerdem wurden die Linien 35S-1-20 und 35S-1-41 eingesetzt, für die zuvor eine MP17:GFP-vermittelte Modifikation der plasmodesmalen Leitfähigkeit, aber keine Kohlenhydratakkumulation und Phänotypausprägung nachgewiesen wurde (vgl. 3.1.1.3, 3.1.1.4). Die Expression von MP17 und MP17:GFP wurde in allen eingesetzten transgenen Pflanzen vor der PVY-Infektion über *Western Blot*-Analyse mit Hilfe des anti-MP17 Antiserums verifiziert.

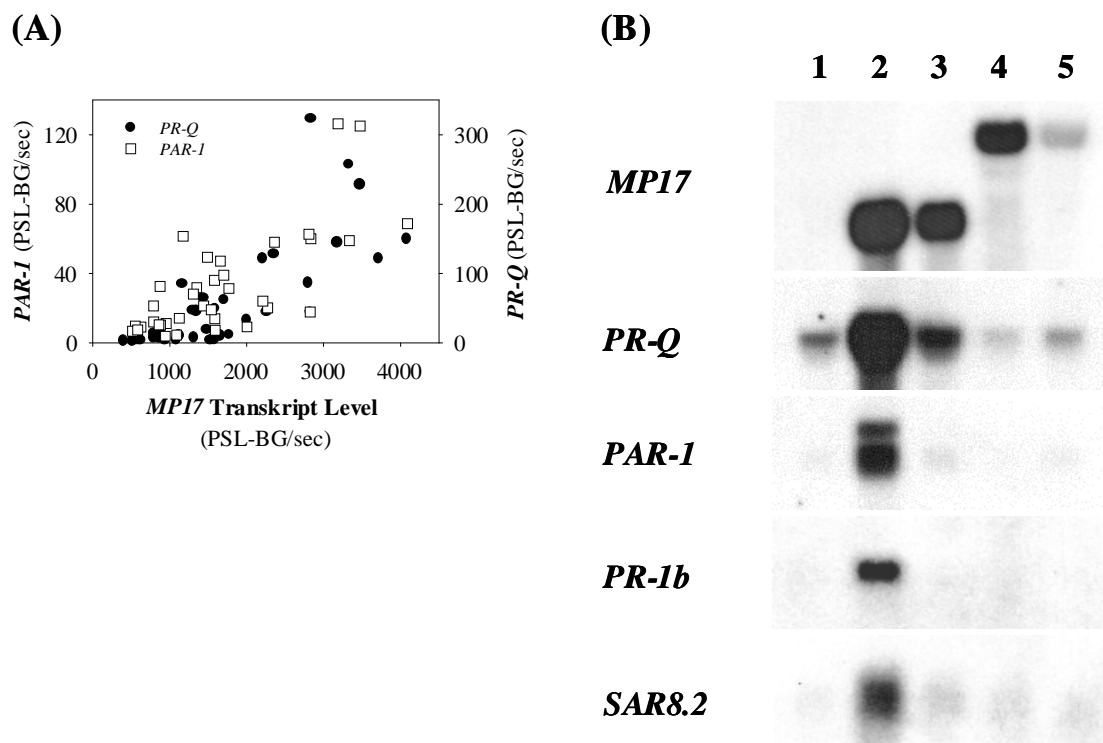
Zur Infektion wurden untere *source*-Blätter der transgenen Linien U-15-2p ( $n=51$ ), U-15-2np ( $n=32$ ), 35S-1-20 ( $n=38$ ), 35S-1-41 ( $n=50$ ) sowie Wildtyp-Pflanzen (SNN) mit PVY-Virusextrakt inokuliert, und die Multiplikation und systemische Ausbreitung nach 6 Tagen analysiert. Wie in Abb. 8 dargestellt, waren die Gehalte an PVY Capsid Protein in lokalen Blättern der Population U-15-2p sehr stark reduziert, während überraschenderweise der Titer in den Linien U-15-2np und 35S-1-41 um den Faktor 4,6 bzw. 2,3 gegenüber den Kontrollpflanzen erhöht war. In systemischen Blättern waren das virale Capsid Protein um 66% in der Linie U-15-2p vermindert, hingegen signifikant um 61% und 54% in U-15-2np bzw. 35S-1-41 erhöht. Die Linie 35S-1-20 mit dem geringsten MP17-Expressionsniveau zeigte allerdings sowohl in lokalen als auch systemischen Blättern ein vergleichbares Infektionsniveau wie die Kontrollen.



**Abb. 8:** PVY-Infektion MP17 und MP17:GFP transgener Linien.

PVY CP-Gehalte wurden 6 Tage nach Infektion in lokalen (inokulierten) und systemischen Blättern sowohl in phänotypischen (U-15-2p,  $n=50$ ) und nicht-phänotypischen (U-15-2np;  $n=32$ ) Populationen der MP17 transgenen Linie U-15-2 (vgl. Text) als auch in den MP17:GFP exprimierender Linien 35S-1-41 ( $n=50$ ), 35S-1-20 ( $n=38$ ) sowie Kontroll-Pflanzen (SNN,  $n=50$ ) bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler und sind in Prozent des WT-Gehaltes angegeben. Die Pflanzen waren 6 Wochen alt und hatten 8-10 Blätter entwickelt.

Um zu überprüfen, ob diese deutlichen Unterschiede im Resistenzniveau mit der Expression Abwehr-relevanter Genen korrelierten, wurde die Akkumulation PR-Protein spezifischer Transkripte in Abhängigkeit vom MP17-Expressionsniveau über *Northern Blot*-Analyse untersucht. So wurde die Expression der Kohlenhydrat- und PVY-induzierbaren Gene *PAR-1* und *PR-Q* (Herbers und Sonnwald 1998; Herbers *et al.*, 2000, Herbers *et al.*, 1996b) in den phänotypisch unterschiedlich stark betroffenen Pflanzen der Linie U-15-2 bestimmt und mit der entsprechenden MP17-Transkriptmenge verglichen. Wie aus Abb. 9A hervorgeht, akkumulierten *PR-Q* und *PAR-1* spezifische Transkripte in transgenen Pflanzen in Abhängigkeit vom steigenden MP17-Expressionsniveau. Die Expression von PR-Genen wurde daraufhin in den transgenen Linien untersucht, die für die PVY-Infektionsexperimente eingesetzt wurden. Zusätzlich wurden die Transkripte von *PR-1b* und *SAR8.2* analysiert, die ähnlich wie *PR-Q* und *PAR-1* in Zucker-akkumulierenden Tabakpflanzen induziert waren (Herbers *et al.*, 1995; Herbers *et al.*, 1996a). Es konnte gezeigt werden, dass PR-Protein Transkripte nur in den phänotypischen Pflanzen der Linien U-15-2p akkumulierten, während in den übrigen Linien die Transkripte auf ähnlichem Niveau wie in Kontrollen blieben (Abb. 9B).



**Abb. 9:** Die Akkumulation von PR-Protein spezifischen Transkripten korreliert mit dem *MP17*-Expressionsniveau und beschränkt sich auf phänotypische Pflanzen der Linie U-15-2p.

**(A)** *MP17*-Expression in Anhängigkeit von *PR-Q* und *PAR-1* Transkriptmengen in Pflanzen der heterozygoten Linie U-15-2. Gesamt-RNA wurde aus *source*-Blättern von verschiedenen Pflanzen im 12-14 Blattstadium isoliert und die *Northern Blots* mit *MP17*, *PR-Q* und *PAR-1* cDNA-Fragmenten hybridisiert. Die Transkriptsignale wurden mit einem Phospho-Imager quantifiziert und *MP17* Transkriptmengen gegen *PR-Q* und *PAR-1* aufgetragen. Die Signalstärke ist in PSL-BG/sec angegeben, was der Strahlungs-dosis des Signals abzüglich des Hintergrundes pro Sekunde entspricht.

**(B)** PR-Genexpression in *MP17* und *MP17:GFP* transgenen Linien, die für die PVY-Infektion eingesetzt wurden. RNA wurde aus *source*-Blattmaterial von Wildtyp- (Spur 1), U-15-2p (Spur 2), U-15-2np (Spur 3), 35S-1-41 (Spur 4) sowie 35S-1-20 (Spur 5) Pflanzen isoliert. 25 µg RNA wurden pro Spur geladen und mit *PR-Q*, *PAR-1*, *PR-1b* und *SAR8.2* cDNA-Sonden beprobt. Die *MP17*- und *MP17:GFP*-Expression wurde zusätzlich durch Hybridisierung mit einem *MP17* cDNA-Fragment bestimmt.

### 3.1.2 Induzierbare Expression von MP17 und MP17:GFP in *Nicotiana tabacum*

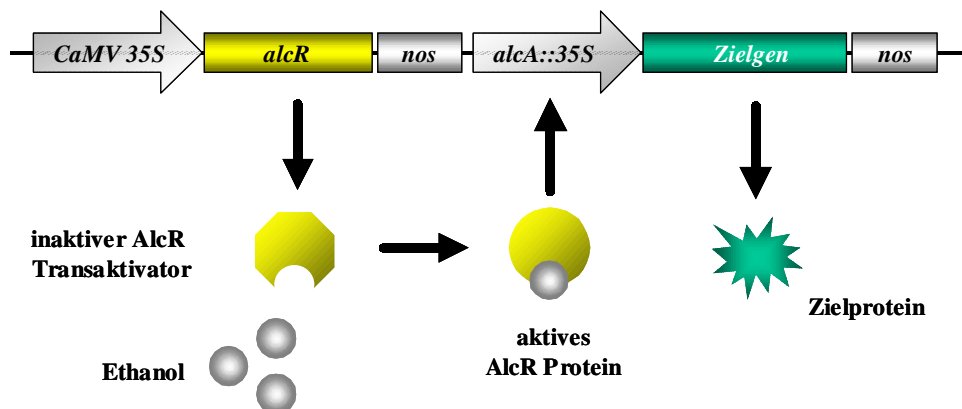
Die zellbiologische Analyse der konstitutiv MP17 und MP17:GFP exprimierenden Tabakpflanzen zeigte, dass MP17 eine generelle Affinität zu PDs des vaskulären und nicht-vaskulären Gewebes in *source*-Blättern hat. Die Lokalisation von MP17 an PDs des Mesophyllgewebes führte darüber hinaus zu einer signifikanten Erhöhung der plasmodesmalen Leitfähigkeit, die sich unabhängig von der MP17-Proteindosis und phänotypischen Veränderungen erwies. Hingegen konnten Kohlenhydratstatus, Phänotypentwicklung sowie Resistenzmechanismen gegenüber der PVY-Infektion mit dem MP17-Expressionsniveau korreliert werden. Verminderte Kohlenhydratgehalte im Mesophyll sowie eine Erhöhung der Suszeptibilität gegenüber PVY bei niedriger MP17-Menge scheinen dabei die direkte Folge der erhöhten plasmodesmalen Permeabilität zu sein, während mit steigender MP17-Expression diese primäre Wirkung von eher indirekten metabolischen Effekten überlagert wird (Hofius *et al.*, 2001; diese Arbeit). Dies resultiert letztendlich in einem „Exportblock“ und einer gesteigerten, vermutlich Kohlenhydrat-vermittelten Resistenz gegenüber PVY, wobei die veränderte plasmodesmale Leitfähigkeit als Folge der direkten Wirkung des MP17 auf die PD-Funktion im Mesophyll erhalten bleibt.

Um zwischen den direkten Effekten des MP17 und der metabolischen Adaptation der transgenen Pflanzen bei hohem Expressionsniveau unterscheiden zu können, sollte ein induzierbares System zur Anwendung kommen, so dass die Prozesse mit höherer zeitlicher Auflösung untersucht werden können. Die induzierbare Expression von MP17 würde zudem eher eine natürliche Infektionssituation simulieren, bei der Virusproteine auf einen intakten Wirtsmetabolismus einwirken und nicht während der ganzen Entwicklung anwesend sind.

Eine Reihe chemisch regulierbarer Genexpressionssysteme sind für den Einsatz in Pflanzen entwickelt worden (zusammengefasst in Gatz, 1997; Gatz und Lenk, 1998; Zuo und Chua, 2000). Dazu gehört ein Ethanol-induzierbarer Genschalter, der auf dem *alc*-Regulon aus *Aspergillus nidulans* beruht (Salter *et al.*, 1998). In *A. nidulans* kodiert das *alcA*-Gen für die Alkoholdehydrogenase I (ADHI), dessen Expression durch den spezifischen AlcR-Transkriptionsfaktor reguliert wird. Das AlcR-Protein wird durch Ethanolmoleküle direkt aktiviert, was die Bindung von AlcR an die Promotorregion des *alcA*-Gens erlaubt und dadurch die Genexpression induziert. Im pflanzlichen Expressionsvektor wird das Transgen hinter einen chimären Promotor kloniert, der aus der AlcR-Bindungsregion des *alcA*-Promotors und einem minimalen CaMV 35S-Promotor besteht (*alcA*:CaMV 35S). Das *alcR*-



Gen wird vom gleichen Expressionsvektor unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors konstitutiv exprimiert und die Transkription des Transgens durch Applikation von Ethanol über Wurzelbewässerung oder als Ethanoldampf induziert (Abb. 10). Die Eignung des Systems für die Modulation von *sink/source*-Beziehungen wurde zuvor in der Arbeitsgruppe durch die induzierbare Expression einer Hefe-Invertase in transgenen Tabakpflanzen gezeigt (Caddick *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde in neueren Arbeiten das System für die regulierte Genexpression in Kartoffelknollen, Raps (Sweetman *et al.*, 2002) und *Arabidopsis* (Roslan *et al.*, 2001) charakterisiert.

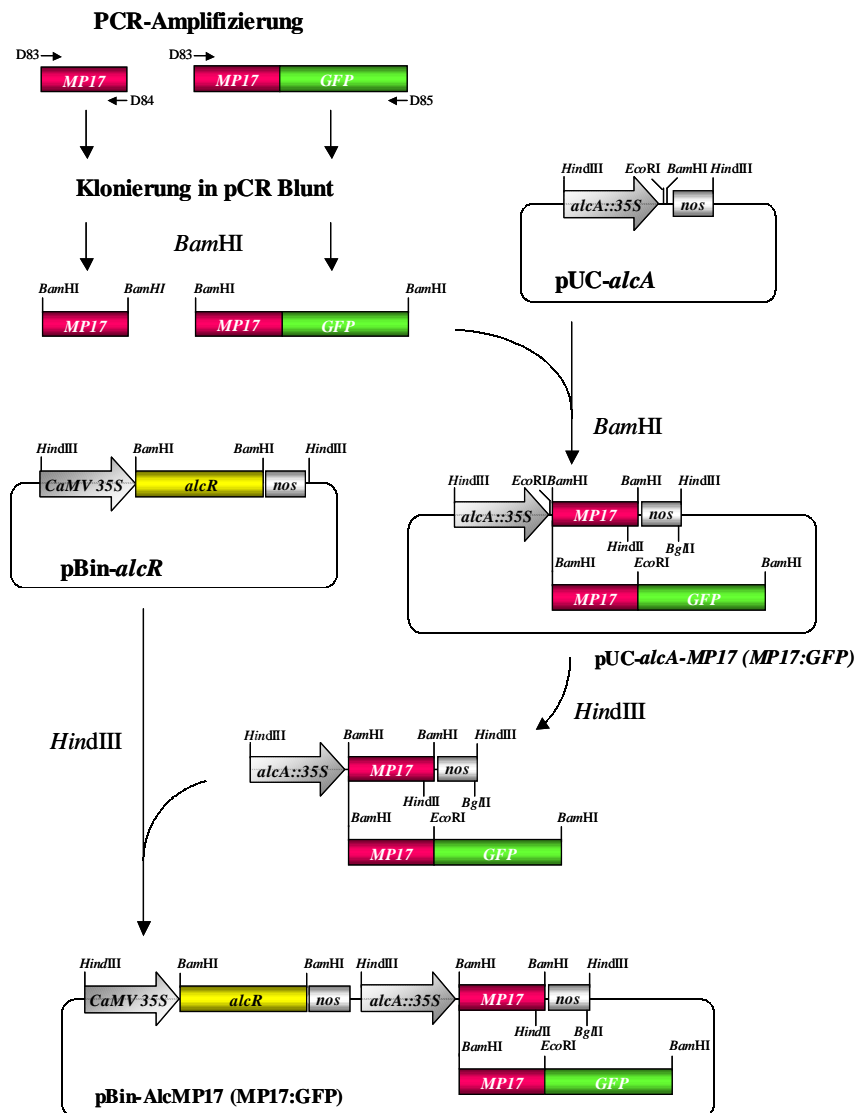


**Abb. 10:** Schematische Darstellung des Ethanol-induzierbaren Expressionssystems, das auf dem AlcR-Regulon aus dem Ascomyceten *Aspergillus nidulans* beruht. Dabei sind die Zielgene unter Kontrolle eines minimalen 35S-Promotors, der mit der Transaktivator-Erkennungssequenz *alcA* fusioniert ist. Der Transaktivator AlcR selbst wird konstitutiv durch den CaMV 35S Promotor exprimiert, aber braucht die Bindung von Ethanol, um die Expression des Zielgens zu aktivieren.

### 3.1.2.1 Konstrukte zur Ethanol-induzierbaren Expression von MP17 und MP17:GFP

Zur induzierbaren Expression von MP17 und MP17:GFP in Tabakpflanzen wurden binäre Konstrukte mit dem chimären Ethanol-induzierbaren *alcA*-Promotor erstellt (Abb. 11). Dazu wurde *MP17* und *MP17:GFP* mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide D83/D84 (*MP17*) und D83/D85 (*MP17:GFP*) amplifiziert, so dass an den 5'- und 3'-Enden *Bam*HI-Restriktionsschnittstellen eingeführt wurden und darüber hinaus ein optimaler Translationsstart mit dem Konsensus aaA CA ATG GC erfüllt war (Joshi *et al.*, 1997). Als Matrize diente dabei das binäre Plasmid p35S-1 mit der *MP17:GFP*-Fusion unter Kontrolle des 35S-Promotors (vgl. 3.1.1.1). Die PCR-Fragmente wurden in den pCR-Blunt Vektor kloniert, über *Bam*HI-Restriktionsverdau isoliert und in die *Bam*HI-Schnittstelle des pUC-*alcA*-Plasmids integriert. Die Orientierung wurde über einen *Eco*RI/*Hind*II Doppelverdau (*MP17*, interne *Hind*II-Schnittstelle bei 435 bp) bzw. *Eco*RI-Verdau (*MP17:GFP*, *MP17* und

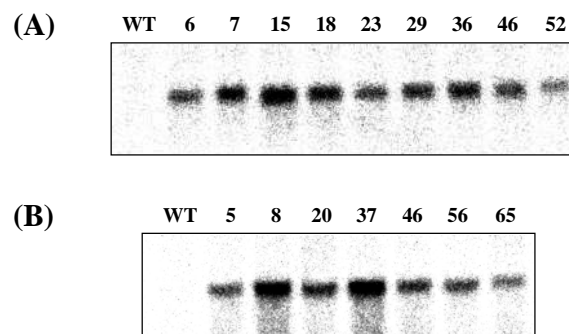
*GFP* über *EcoRI* fusioniert) überprüft und die positiven Plasmide über Sequenzanalyse verifiziert. Die *alcA-MP17-nos* bzw. *alcA-MP17:GFP-nos* Kassetten wurden über einen *HindIII*-Verdau isoliert und in den *HindIII* geöffneten Vektor pBin-*alcR* ligiert. Die als pBin-AlcMP17 und pBin-AlcMP17:GFP bezeichneten Plasmide wurden schließlich über *Agrobacterien*-vermittelten Gentransfer in Tabakpflanzen transformiert und Kanamycin-resistente Transformanten regeneriert.



**Abb. 11:** Klonierung der binären Konstrukte pBin-AlcMP17 und pBin-AlcMP17:GFP zur Ethanol-induzierbaren Expression von MP17 und MP17:GFP in transgenen Pflanzen. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR-Blunt subkloniert, über einen *Bam*HI-Verdau isoliert und in das Plasmid pUC-*alcA* ligiert. Die richtige Orientierung wurde über einen *Eco*RI/*Hind*II-Doppelverdau (pUC-*alcA-MP17*) und *Eco*RI-Verdau (pUC-*alcA-MP17:GFP*) verifiziert. Über *Hind*III wurden die *alcA-MP17-nos* und *alcA-MP17:GFP-nos* Kassetten isoliert und in den binären Vektor pBin-*alcR* integriert.

### 3.1.2.2 Primärcharakterisierung AlcMP17 und AlcMP17:GFP transgener Linien

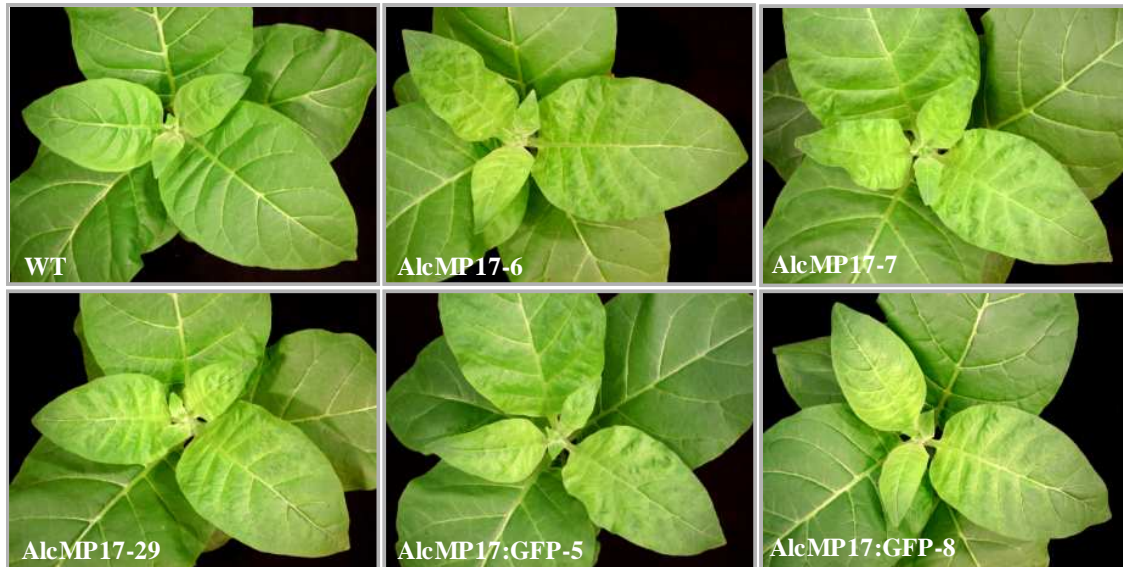
Die regenerierten Primärtransformanden wurden ins Gewächshaus transferiert und im 6-Blattstadium zunächst 50 ml Ethanol [1% (v/v)] und nach 72 h weitere 100 ml Ethanol über die Wurzeln appliziert. Zwei Tage nach der zweiten Induktion konnten phänotypische Veränderungen in Form von Aufhellungen um die Venen höherer Ordnung (Klasse III) in basalen Bereichen wachsender Blätter beobachtet werden. Da dies aber nur bei 2 Primärtransformanden je Transformation auftrat, wurde 9 h nach einer erneuten Ethanol-Applikation Blattmaterial von jeweils 52 Pflanzen geerntet, Gesamt-RNA isoliert und die Akkumulation von MP17 und MP17:GFP spezifischen Transkripten über *Northern*-Analyse bestimmt. In Abbildung 12 sind die identifizierten MP17 und MP17:GFP exprimierenden Linien zusammengefasst.



**Abb. 12:** Ethanol-induzierbare Akkumulation von *MP17*- und *MP17:GFP*-spezifischen Transkripten in AlcMP17 (A) bzw. AlcMP17:GFP (B) transgenen Primärtransformanden. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte aus Blattmaterial, das 9 h nach Ethanolapplikation [1% (v/v)] geerntet wurde. 30 µg Gesamt-RNA wurden aufgetragen und die *Northern Blots* mit einer *MP17* cDNA-Sonde hybridisiert. Die Ziffern bezeichnen die ausgewählten transgenen Linien im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (WT).

Da kinetische Analysen mit den transgenen Linien eine grosse Zahl an homogenem Pflanzenmaterial erfordert, wurde von ausgewählten Linien das Segregationsmuster der T1-Generation über die Kanamycinresistenz der Keimlinge bestimmt. Darüber hinaus wurden zur Verifizierung phänotypischer Veränderungen Kanamycin-resistente Pflanzen ins Gewächshaus transferiert und im 6-Blattstadium mit 50 ml Ethanol [1% (v/v)] induziert. Bereits nach 30 Stunden konnte der in der T0-Generation beobachtete Phänotyp in mehreren Linien der beiden Konstrukte detektiert werden, der sich bis etwa 72 Stunden nach Induktion weiter verstärkte. Eine deutliche Ausprägung des Phänotyps zeigten dabei die AlcMP17 transgenen Linien 6, 7, 15, und 29 sowie die AlcMP17:GFP-Linien 5 und 8 (Abb. 13). Da die

Segregation der Linien AlcMP17-6, -7, und -29 einem Verhältnis von etwa 3:1 folgte und somit Einzelinsertionen nahe legte, wurden diese für die Gewinnung des T2-Saatgutes ausgewählt. Die Aufspaltung bei den Linien AlcMP17:GFP-5 und -8 deutete zwar auf Mehrfachinsertionen hin, doch wurden diese für weitere Analysen herangezogen, da die 3:1 segregierende Linie 56 nur relativ schwache phänotypische Änderungen im Vergleich zu den anderen Linien zeigte.



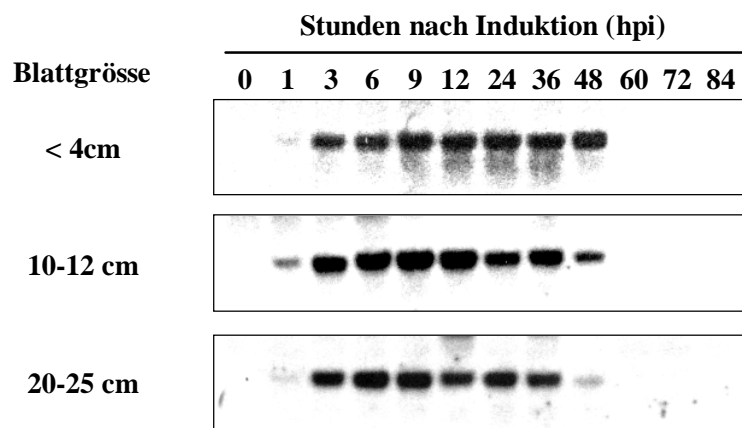
**Abb 13:** Phänotypische Änderungen in AlcMP17 und AlcMP17:GFP transgenen Linien 3 Tage nach Ethanolapplikation im Vergleich zur Wildtyp (WT)-Kontrolle. Dargestellt sind die transgenen Linien, die für weitere Analysen ausgewählt wurden.

Über die Segregationsanalyse des T2-Saatgutes konnte schließlich für alle ausgewählten Linien mindestens eine zu 100% Kanamycin-resistente Nachkommenschaft unter den phänotypisch veränderten Pflanzen selektiert werden. Die Analyse des Phänotyps nach Ethanolinduktion ergab für alle AlcMP17-Linien sowie AlcMP17:GFP-5 einen uniformen Phänotyp, während Pflanzen der Linie AlcMP17:GFP-8 eine hohe phänotypische Variabilität zeigten und daher nicht für die weiteren kinetischen Analysen herangezogen wurden.

### 3.1.2.3 MP17-Expressionskinetik und Phänotypentwicklung nach Ethanol-Induktion

Für eine detaillierte Induktionskinetik wurde die Linie AlcMP17-29 ausgewählt und die *MP17*-Expression über *Northern*-Analyse in unterschiedlichen Blattstufen verfolgt. Kanamycin-resistente Pflanzen der T2-Generation wurden im 6-Blattstadium (in 2,5 l-Töpfen) im Gewächshaus 1 h nach Beginn der Lichtphase (7:00 Uhr) mit 100 ml Ethanol [1% (v/v)] induziert. Blattproben wurden vor (T0) und 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, sowie 84

Stunden nach der Induktion von jeweils 5 Pflanzen pro Zeitpunkt genommen, homogenisiert und Gesamt-RNA aus den vereinigten Proben isoliert. Dabei wurden mit *sink*- (<4 cm), *sink/source*- (II, 10-12 cm), sowie älteren *source*-Blättern (III, 20-25 cm) drei Blattstufen ausgewählt. Abb. 14 zeigt, dass MP17 spezifische Transkripte bereits 1 h nach Ethanolapplikation akkumulierten und diese bis zu 48 Stunden nach Induktion detektierbar waren, wobei die Induktionskinetik in allen Blattstufen einen vergleichbaren Verlauf zu nehmen schien.

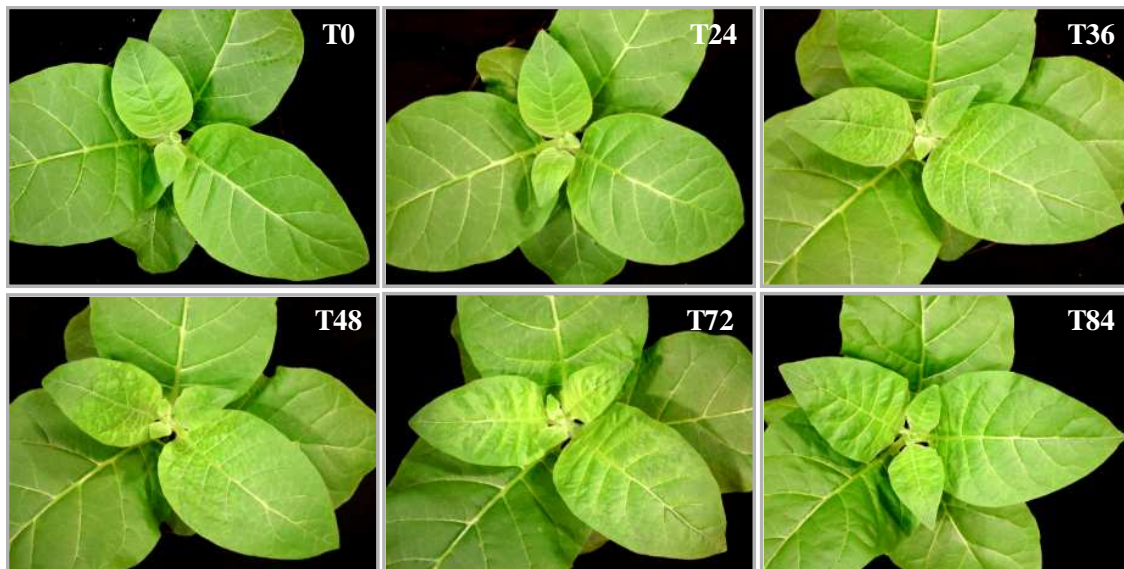


**Abb. 14:** Northern-Analyse der Expressionkinetik von *MP17* in AlcMP17 transgenen Tabakpflanzen der Linie 29 nach Induktion mit 100 ml Ethanol [1% (v/v)]. Blattproben wurden vor (T0) und 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, sowie 84 Stunden nach der Induktion von jeweils 5 Pflanzen pro Zeitpunkt genommen und Gesamt-RNA isoliert. 30 µg RNA wurden pro Spur geladen und die RNA-Blots mit einem *MP17* cDNA-Fragment hybridisiert. Dargestellt ist die *MP17* Expression in der Blattlamina von *sink*-Blättern (< 4 cm) sowie in *sink/source* Übergangs- (10-12 cm) und älteren *source*-Blättern (20-25 cm).

Parallel zu der Akkumulation von MP17-Transkripten wurde über *Western*-Analyse unter Verwendung des anti-MP17 Antiserums versucht, das MP17-Protein in Pflanzenextrakten zu detektieren. Überraschenderweise ließ sich jedoch zu keinem Zeitpunkt ein MP17-spezifisches Signal in den drei Blattstufen nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Neben der MP17-Expression wurde die Entwicklung des Phänotyp in der Linie AlcMP17-29 verfolgt und über die Visualisierung der Stärkeverteilung mittels Jodfärbung ein möglicher Zusammenhang zwischen den spezifischen phänotypischen Änderungen (vgl. 3.1.2.2) und der MP17-vermittelten Beeinflussung des Kohlenhydratstatus untersucht. Wie bereits vorher beobachtet, traten erste phänotypische Änderungen in Form von chlorotischen Aufhellungen um die Venenklasse III und vereinzelt um Klasse IV etwa 30-36 h nach Ethanolapplikation auf, wobei dies auf die im Wachstum befindlichen Blattbereiche beschränkt blieb (Abb. 15). Die Entwicklung des Phänotyps schien direkt mit dem *sink/source*-Gradienten zu korrelieren,

was an die Ausprägung von systemischen Symptomen nach Virusinfektion erinnerte. 48 Stunden nach Induktion war dieser Venen-assoziierte Phänotyp deutlich ausgeprägt und nach weiteren 24 Stunden (72 hpi) hatten sich die Chlorosen um die Klasse III-Venen soweit ausgedehnt, dass sie in einem scheinbar kontinuierlichen Bereich die Venenklasse II flankierten, wobei der basipetale Gradient innerhalb der Blätter erhalten blieb. Danach konnte keine Vergrößerung der chlorotischen Bereiche mehr detektiert werden, vielmehr schien sich in den betroffenen Blättern der Phänotyp zu revertieren und „auszuwachsen“. Im Gegensatz zu der transgenen Linie 29 zeigten die Wildtyp-Kontrollen zu keinem Zeitpunkt nach der Ethanolapplikation phänotypische Auffälligkeiten, wodurch sich unspezifische Ethanol-Effekte in den transgenen Linien ausschließen ließen (Daten nicht gezeigt).

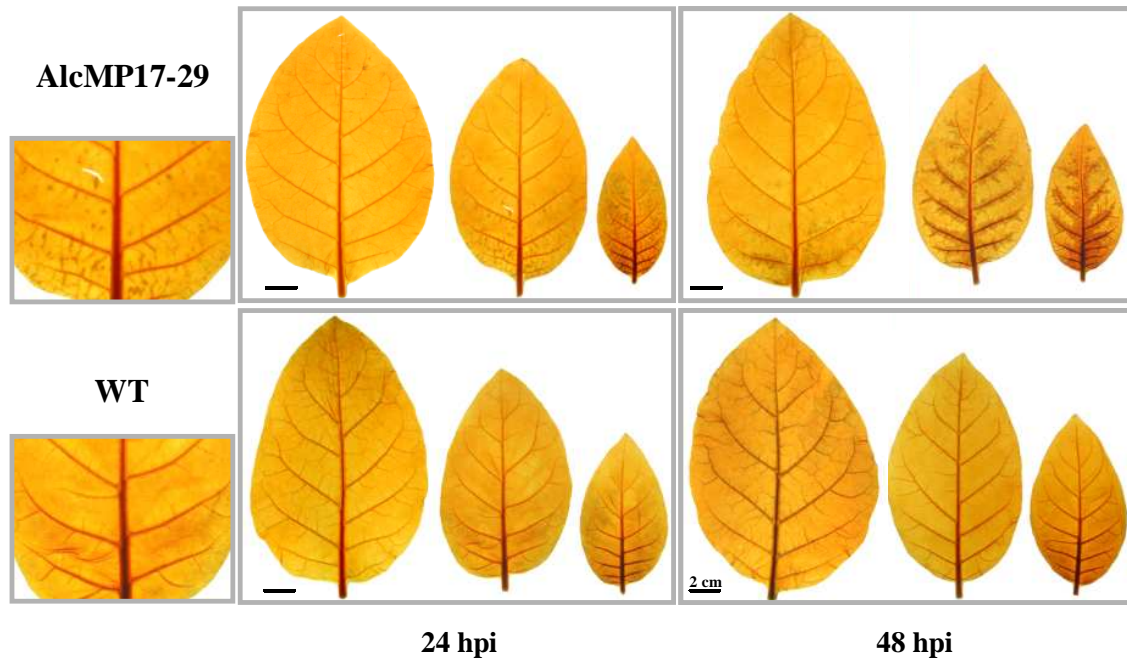


**Abb. 15:** Entwicklung des spezifischen Phänotyps in der transgenen Linie AlcMP17-29 nach Ethanol-induzierter Expression von MP17. Dargestellt sind transgene Pflanzen vor (T0), sowie 24, 36, 48, 72 und 84 Stunden nach Applikation von 100 ml 1% (v/v) Ethanol über die Wurzeln.

Färbungen der Blätter von AlcMP17-29 und WT-Pflanzen mit Jodlösung (Lugol'sches Reagenz) zum Ende der Dunkelphase belegten eine spezifische Akkumulation von Stärke um die Venen der Klasse III und teilweise der Klasse IV in wachsenden Blattbereichen und war demnach nicht in vollständig expandierten *source*-Bättern zu detektieren (Abb. 16). Bemerkenswerter Weise war der venöse Stärkephänotyp bereits 24 Stunden nach Induktion zu beobachten, folglich zu einem Zeitpunkt, wo noch keine Chlorosen um die betroffenen Bereiche auftraten. Nach weiteren 24 Stunden (48 hpi) hatte sich der Bereich der Stärkeakkumulation zwischen den Venen der Klasse III soweit ausgebreitet, dass die Venenklasse II vollständig mit akkumulierender Stärke umgeben schien, also die Bereiche umfasste, die nach 72 h Chlorosen zeigten (vgl. Abb. 15). Somit schien die

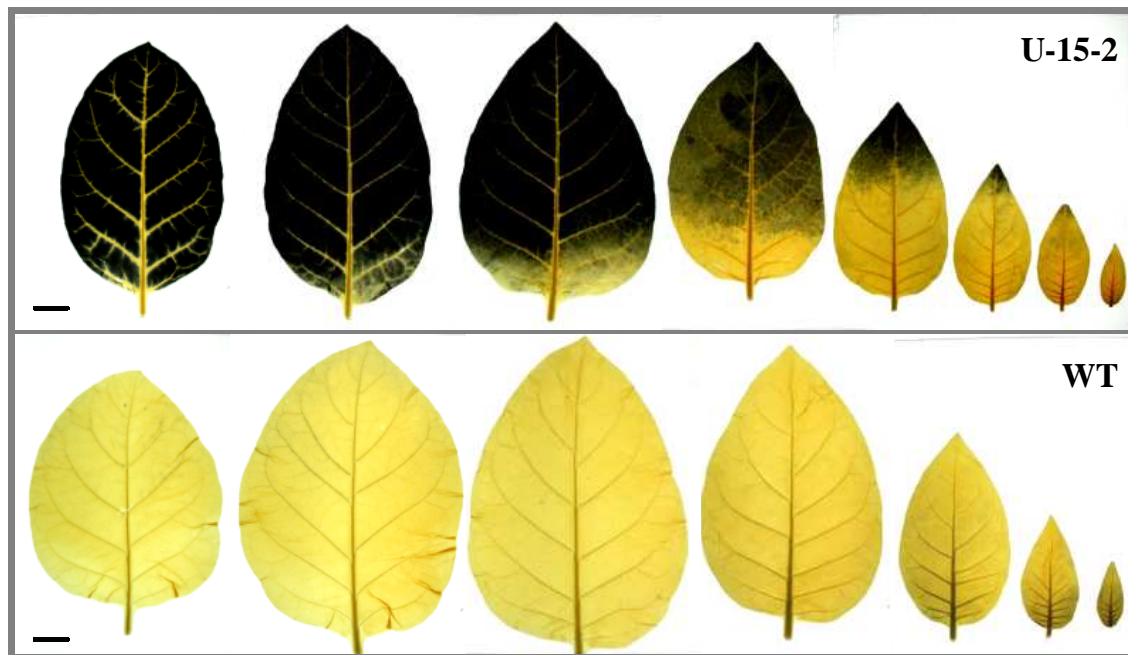


Stärkeakkumulation der Entwicklung des Chlorosephänotyps um mindestens 12 h vorauszuweichen, was auf einen direkten Zusammenhang zwischen Kohlenhydratakkumulation und der Entwicklung von Chlorosen schließen lässt.



**Abb. 16:** Färbung von Ethanol-entfärbten Blättern verschiedener Blattstadien mit Lugol'scher-Lösung (Iod/Kaliumiodid) auf Vorhandensein von Stärke gegen Ende der Dunkelperiode (7:00 Uhr) 24 und 48 Stunden nach Ethanol-Induktion (hpi) der transgenen Linie AlcMP17-29 sowie den Wildtyp-Kontrollen (WT). Die zusätzliche linke Abbildung zeigt einen Ausschnitt des basalen Bereiches eines älteren Blattstadiums 24 Stunden nach Induktion, wo bereits eine spezifische Akkumulation um die Blattadern höherer Ordnung, v.a. Klasse III Venen zu detektieren ist.

Bemerkenswert sind die deutlichen Unterschiede des induzierbaren Phänotyps zu den phänotypischen Änderungen bei konstitutiver Expression von MP17 (Abb. 17). Die Entwicklung chlorotischer Interkostalfelder infolge massiver Stärkeakkumulation beschränkte sich bei der Expression von MP17 unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors ausschließlich auf *source*-Blattbereiche und zeigte daher in *sink/source*-Übergangsblättern immer einen akropetalen Gradienten. Zudem blieb die Stärkeakkumulation in konstitutiv MP17 transgenen Linien auf die nicht-venösen Bereiche beschränkt. Somit schienen induzierbarer und konstitutiver Phänotyp ein „inverses“ Muster auszuprägen.



**Abb. 17:** *Source*-spezifische Akkumulation von Stärke in Blättern der konstitutiv MP17 exprimierenden Linie U-15-2 im Vergleich zur Wildtyp (WT)-Kontrolle. Dargestellt sind Blätter zunehmendes Alters (von rechts nach links), die zunächst mit Ethanol entfärbt wurden. Die anschließende Färbung mit Lugol'scher Lösung zeigt die zunehmende, in akropetaler (*source-sink*) Richtung verlaufende Akkumulation von Stärke in der MP17 transgenen Linie am Ende der Dunkelphase, während die Kontrollpflanzen stärkefrei sind. Der Maßstab entspricht 2 cm.

#### 3.1.2.4 Änderungen des Kohlenhydratstatus nach Ethanol-Induktion von MP17

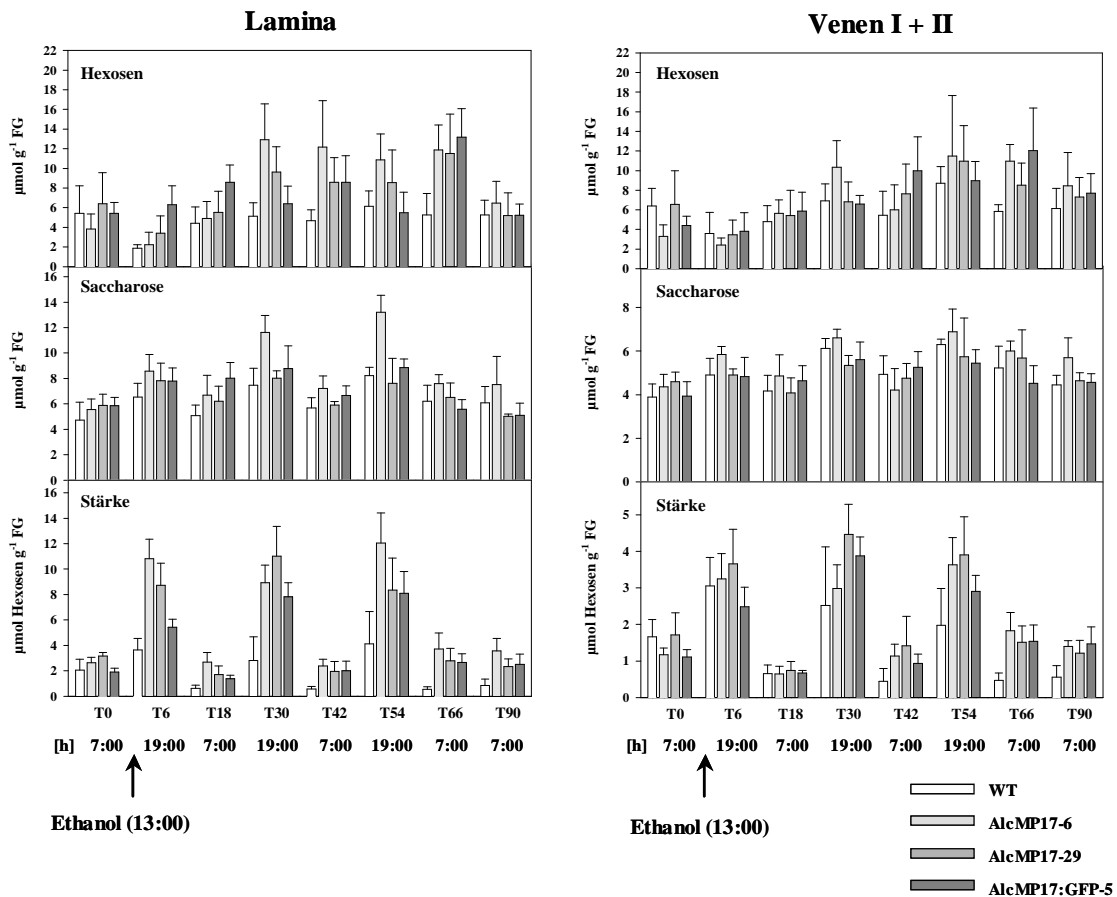
Die Akkumulation von Stärke zum Ende der Dunkelphase nach induzierter Expression von MP17 legt einen Eingriff des MP17 in den Kohlenhydratmetabolismus bzw. Assimilattransport spezifisch in wachsenden Blattbereichen nahe, der letztendlich in der Ausprägung des Venen-assoziierten Phänotyps resultiert. Aus diesem Grund sollten die kinetischen Änderungen des Kohlenhydratstatus nach Ethanol-Induktion in mehreren transgenen Linien im Vergleich zu den WT-Kontrollen quantitativ bestimmt werden. Die Kanamycin-resistente T2-Nachkommenschaft der transgenen Linien AlcMP17-6 und AlcMP17-29 sowie AlcMP17:GFP-5 wurde im Gewächshaus 7 h nach Beginn der Lichtphase (13:00 Uhr) mit jeweils 100 ml Ethanol [1% (v/v)] induziert und Proben der Lamina sowie von Venenbereichen der Klasse I und II von Blättern der Blattstufe II (10-12 cm, vgl. 3.1.2.3, Abb. 14) morgens (7:00 Uhr) und abends (19:00 Uhr) genommen. Das ausgewählte Blattstadium (*sink/source*-Übergang) zeigte zuvor eine relativ homogene Ausprägung des Phänotyps mit dem geringsten Gradienten in der Stärkeakkumulation zwischen Blattbasis und



-spitze, was „Verdünnungseffekte“ durch Vermischen von unterschiedlich stark betroffenen Blattbereichen bei der Probennahme minimierte. Zur Bestimmung des Kohlenhydratstatus vor der MP17-Induktion wurde der morgendliche Zeitpunkt (7:00 Uhr) 6 Stunden vor der Ethanol-Applikation ausgewählt und als T0 bezeichnet.

Wie in Abb. 18 dargestellt, zeigte sich in der Lamina bereits nach 6 Stunden (T6) ein deutlicher Anstieg der Stärkegehalte in den transgenen Linien im Vergleich zu den Kontrollen, wobei dies für die Linien AlcMP17-6 und -29 stärker ausgeprägt war als für AlcMP17:GFP-5. Die Stärkeakkumulation gegen Ende der Lichtphase war auch zu den Zeitpunkten T30 und T54 in den transgenen Linien zu beobachten, und AlcMP17:GFP-5 erreichte dabei ein ähnliches Niveau wie die transgenen Linien ohne GFP-Fusion. Nach Ende der Dunkelphasen zeigten alle MP17-induzierten Linien zu den Zeitpunkten T18, T42, T66 und T90 erhöhte Gehalte an Stärke in der Blattlamina im Vergleich zum Wildtyp, während vor der Ethanol-Applikation zum Zeitpunkt T0 keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen waren. Die Stärkegehalte in den Venen der transgenen Linien blieben bis zum Zeitpunkt T18 trotz der deutlichen Veränderungen in der Blattlamina unbeeinflusst, erst beim Zeitpunkt T30 war eine tendenzielle Erhöhung festzustellen, die aber aufgrund der starken Variabilität in den Kontrollen nicht signifikant war. Ähnliches galt für T42 und T54, während sich die Unterschiede zu den späteren Zeitpunkten T66 und auch T90 als signifikant erwiesen.

Im Gegensatz zu den Stärkegehalten waren die löslichen Zucker durch die induzierte MP17-Expression innerhalb der transgenen Linien weniger einheitlich beeinflusst. Tendenziell ließ sich in der Blattlamina ab 6 Stunden nach Induktion eine Erhöhung der löslichen Zucker feststellen, die aber für die einzelnen Linien unterschiedlich stark ausgeprägt und im wesentlichen auf eine Erhöhung der Hexosegehalte zurückzuführen war. Nur im Fall der Linie AlcMP17-6 beruhten die zum Zeitpunkt T30 und T54 signifikant gegenüber den Werten der beiden anderen transgenen Linien erhöhten löslichen Zucker (als Summe nicht gezeigt) auf einer Zunahme des Saccharosegehaltes, der sich ansonsten relativ unverändert von der MP17-Induktion zeigte. Eine signifikante Erhöhung der löslichen Zucker infolge der erhöhten Hexosegehalte ließ sich in der Blattlamina definitiv für alle Linien zu den Zeitpunkten T42 und T66 im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen, während in den Venen nur zum Zeitpunkt T66 ein signifikanter Unterschied in den Hexosegehalten auftrat, was mit den deutlich erhöhten Stärkegehalten korrelierte.

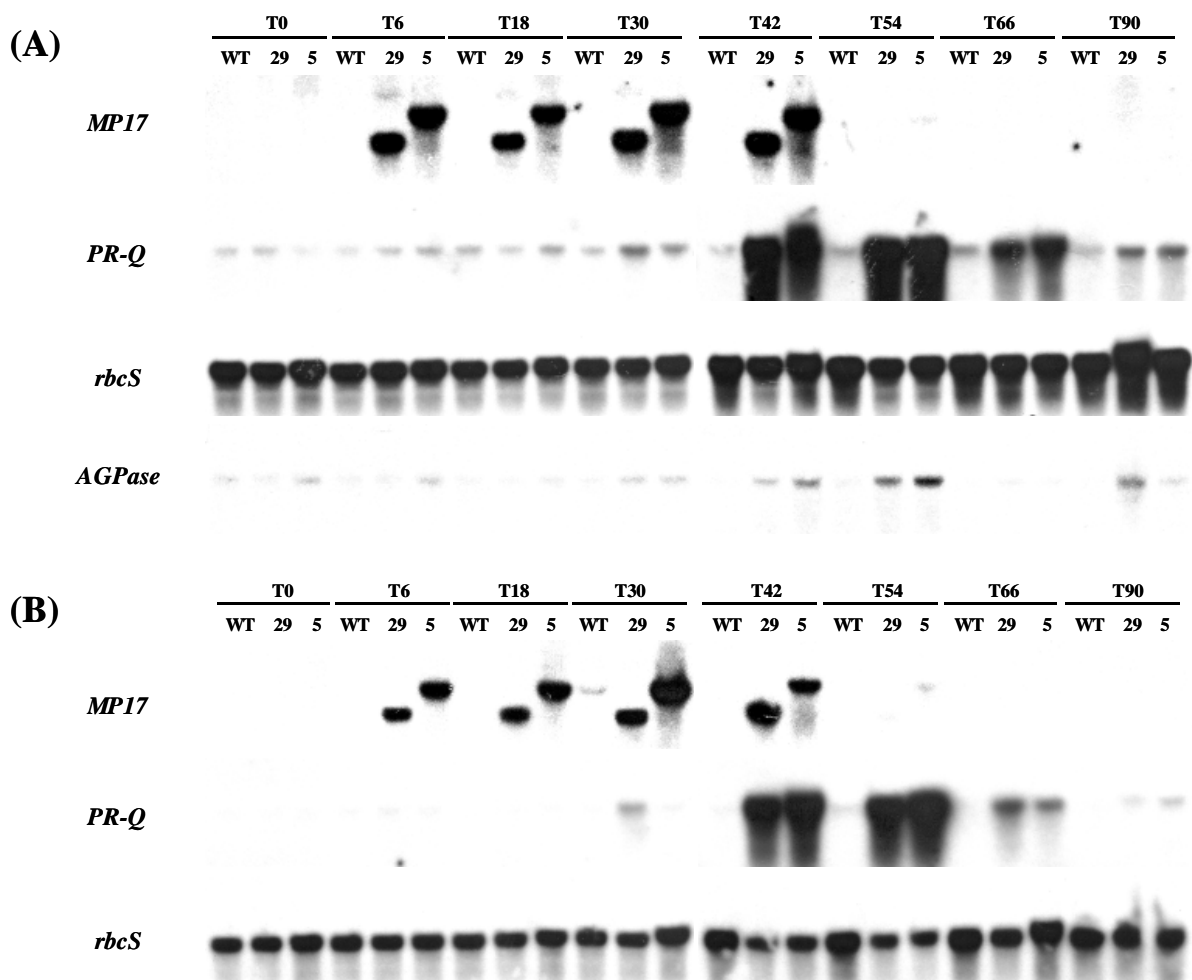


**Abb. 18:** Kohlenhydratgehalte in Lamina und Venenbereichen (Klasse I + II) 10-12 cm großer Blätter (Blattstufe II) von AlcMP17 und AlcMP17:GFP transgenen Linien im Vergleich zu den Kontrollen (WT) vor (T0) und 6, 18, 42, 54, 66, und 90 Stunden nach Ethanolapplikation (13:00). Die Probennahme erfolgte entweder morgens (7:00 Uhr) oder abends (19:00 Uhr) wie angezeigt. Die Werte sind als Mittelwerte ( $n=5$ )  $\pm$  Standardabweichung dargestellt und die einzelne Linien sind farblich hervorgehoben.

### 3.1.2.5 Änderungen der Genexpression nach Ethanol-Induktion von MP17

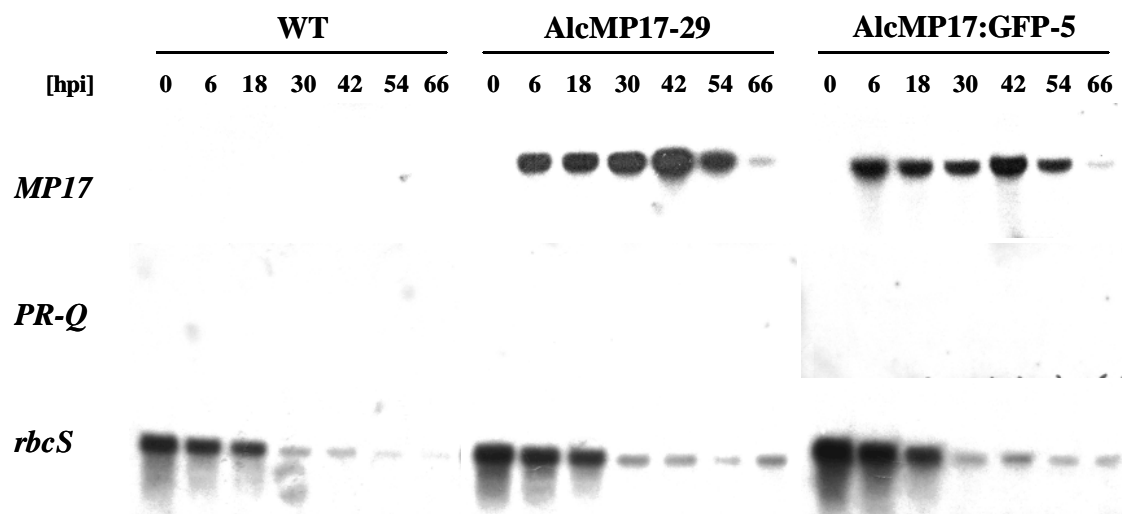
Die spezifische Akkumulation von Stärke bereits 6 Stunden nach Ethanolapplikation gefolgt von einem beginnenden chlorotischen Phänotyp etwa 30-36 Stunden nach Induktion legten die Vermutung nahe, dass sich auch Kohlenhydrat-vermittelte Änderungen der Genexpression manifestiert haben könnten, wie es zuvor bei konstitutiv MP17-exprimierenden Pflanzen (Herbers *et al.*, 1997; Hofius *et al.*, 2001, diese Arbeit) und anderen Zucker-akkumulierenden transgenen Pflanzen beobachtet wurde (Herbers *et al.*, 1996a). Aus diesem Grund wurde aus dem in 3.1.2.4 für die Bestimmung des Kohlenhydratstatus eingesetzten Pflanzenmaterial der Linien AlcMP17-29, AlcMP17:GFP-5 sowie der WT-Kontrollen Gesamt-RNA isoliert und die Expression der Kohlenhydrat-responsiven Gene *PR-Q*, *rbcS* sowie *AGPase* über *Northern*-Analyse untersucht und zudem die Ethanol-induzierte Expression des *MP17*-

Transgens bestimmt. Wie in Abb. 19 dargestellt, waren MP17- und MP17:GFP-spezifische Transkripte von 6 Stunden bis 42 Stunden nach Ethanolinduktion zu detektieren. Die Zucker-induzierbaren *PR-Q* Transkripte zeigten 30 h nach Ethanolapplikation eine verstärkte Akkumulation gegenüber der WT-Kontrolle, ab 42 Stunden nach Induktion waren sie sowohl in Lamina als auch Venen drastisch erhöht. Die Expression *rbcS*-spezifischer Transkripte reagierte weniger sensitiv auf die Ethanol-induzierte Expression von MP17 und zeigte sich am deutlichsten zu den Zeitpunkten T42 und T54 in den Venen und in geringerem Maße in der Lamina gegenüber den Kontrollen reduziert. Parallel zur Induktion von *PR-Q* in der Lamina zeigten sich auch die Transkripte der AGPase zwischen T30 und T54 signifikant gegenüber den Kontrollpflanzen erhöht.



**Abb. 19:** Northern-Analyse der Expression Kohlenhydrat-responsiver Gene nach Ethanol-Induktion der transgenen Linien AlcMP17-29 und AlcMP17:GFP-5 sowie Kontrollpflanzen (WT). Gesamt-RNA wurde aus dem identischen Probenmaterial gewonnen, das zuvor für die Bestimmung der Kohlenhydratgehalte in Lamina und Venen eingesetzt wurde (vgl. Abb. 18). 30 µg RNA wurden gelelektrophoretisch getrennt und die Northern Blots mit den cDNA-Sonden *rbcS*, *PR-Q*, *AGPase* sowie einer *MP17*-spezifischen Sonde hybridisiert. Dargestellt ist die Transkriptakkumulation in (A) Lamina und (B) Venen (Klasse I + II) der 10-12 cm großen Blätter (Blattstufe II) zu den angezeigten Zeitpunkten (T0 bis T90) nach Ethanolapplikation.

Um zu überprüfen, ob die raschen MP17-induzierten Änderungen in der Expression Abwehr-relevanter und photosynthetischer Gene auf Kohlenhydrat-vermittelte Signale oder eher auf eine direkte Perzeption des MP17-Proteins zurückgeführt werden konnten, wurden in einem weiteren Experiment transgene Pflanzen der Linien AlcMP17-29 und AlcMP17:GFP-5 nach Ethanol-Induktion in Dunkelheit transferiert und Blattproben vor (0) und 6, 18, 30, 42, 54 sowie 66 Stunden nach Induktion im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen genommen. Gesamt-RNA wurde aus dem Pflanzenmaterial isoliert und die *Northern Blots* mit *MP17*-, *PR-Q*- und *rbcS*-spezifischen cDNA-Sonden hybridisiert. Dabei konnte weder die Induktion von *PR-Q* noch eine Änderung der *rbcS*-Expression im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden, wobei *rbcS*-Transkripte nach Transfer der Pflanzen in Dunkelheit in allen Linien vergleichbar abnahmen. Hingegen konnte in den untersuchten Linien die Induktion von *MP17* und *MP17:GFP* 6 Stunden nach Ethanol-Applikation belegt werden, und die Transkripte waren bis 66 Stunden nach Ethanol-Induktion nachweisbar, also deutlich länger als in den Pflanzen, die einen normalen Licht/Dunkel-Rhythmus aufwiesen (s. 3.1.2.3, Abb. 14; 3.1.2.5, Abb. 19).



**Abb. 20:** *Northern*-Analyse der Genexpression von *MP17*, *rbcS* und *PR-Q* in den Linien AlcMP17-29 AlcMP17:GFP-5 sowie WT-Kontrollen nach Ethanol-Applikation und Transfer der Pflanzen in Dunkelheit. Die Probenahme erfolgte vor (0) und 6, 18, 30, 42, 54 sowie 66 Stunden nach Ethanol-Induktion (hpi). Gesamt-RNA wurde aus dem Blattmaterial isoliert und *Northern*-Blots mit 30 µg RNA nach gelelektrophoretischer Trennung mit den angezeigten cDNA-Sonden hybridisiert.

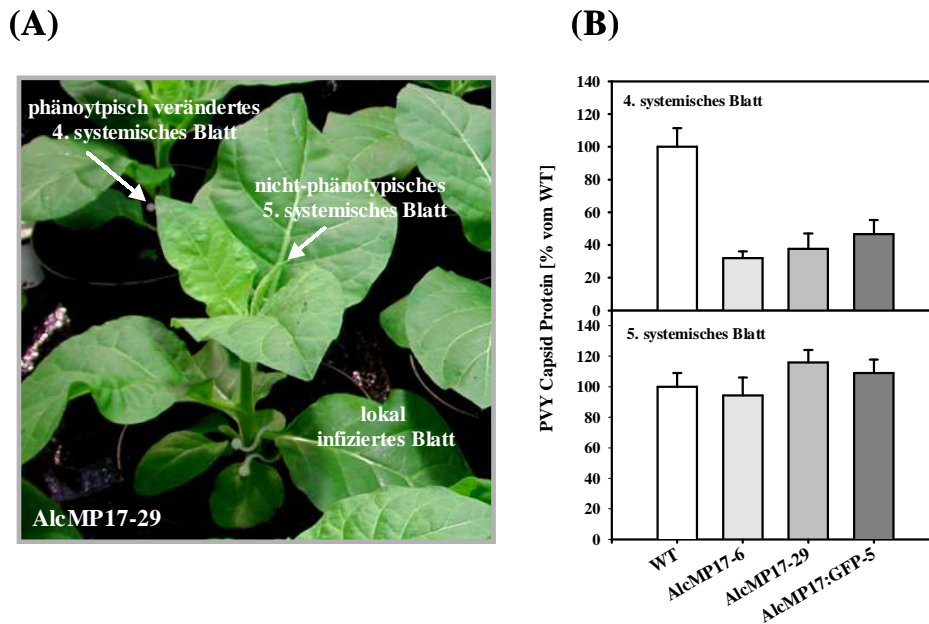
Übereinstimmend mit der fehlenden Transkriptinduktion von *PR-Q* konnten auch keine phänotypischen Änderungen in den Ethanol-induzierten transgenen Linien unter Dunkelbehandlung detektiert werden, was einen direkten Zusammenhang zwischen dem Kohlenhydrat-vermittelten Phänotyp und der Änderungen in der Genexpression nahe legt.

### 3.1.2.6 Resistenzeigenschaften gegenüber der Infektion mit PVY

In konstitutiv MP17 exprimierenden Tabaklinien konnte zuvor eine eingeschränkte Resistenz gegenüber dem nicht-verwandten PVY Potyvirus (Herbers *et al.*, 1997) nachgewiesen werden. Dabei waren die erhöhten Resistenzeigenschaften von der MP17-Dosis abhängig und traten nur in transgenen Pflanzen auf, die Kohlenhydratakkumulation und Wuchsretardierung zeigten (Hofius *et al.*, 2001; diese Arbeit). Zudem korrelierte die MP17-induzierte Resistenz mit der Expression von PR-Protein spezifischen Transkripten, was allerdings nicht als direkte Ursache für die erhöhte Resistenz, sondern vielmehr als Indikator für eine unspezifische Kohlenhydrat-vermittelte Abwehrreaktion gelten kann. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob der durch Ethanol-induzierte MP17-Expression hervorgerufene Phänotyp ebenfalls zu veränderten Resistenzeigenschaften gegenüber PVY führt. Darüber hinaus könnte die Suszeptibilität systemischer Blätter gegenüber der Besiedelung mit PVY Hinweise darauf geben, ob der Venen-assoziierte Stärkephänotyp in wachsenden Blattbereichen auf eine spezifische, MP17-vermittelte Beeinflussung des Photoassimilatimportes zurückgeführt werden kann, da die systemische Ausbreitung von Viren dem Assimilatstrom in der Pflanze folgt und somit als „Marker“ für importierende Gewebe dienen kann.

In einem Infektionsexperiment wurden die Linien AlcMP17-6, AlcMP17-29 und AlcMP17:GFP-5 sowie Wildtyp-Kontrollen zunächst mit Ethanol induziert und nach Ausprägung des Phänotyps - 48 Stunden nach Ethanolinduktion - mit PVY infiziert. Eine phänotypisch veränderte Pflanze der Linie AlcMP17-29 zum Zeitpunkt der Infektion ist beispielhaft in Abbildung 21 dargestellt und das lokal infizierte Blatt angezeigt. Nach weiteren 6 Tagen wurden Proben für die Bestimmung des Virustiters im 4. systemischen Blatt, das zum Zeitpunkt der Infektion das jüngste Blatt mit phänotypischen Veränderungen darstellte, sowie dem 5. systemischen Blatt genommen, das sich vornehmlich erst nach Ethanol-Induktion entwickelte und daher keinen Phänotyp ausprägte (Abb 21A).

Die ELISA-Bestimmung der Virustiter ergab, dass im 4. systemischen Blatt eine signifikante Reduktion des PVY Levels um jeweils 68%, 62% und 53% für die Linien AlcMP17-6, AlcMP17-29 und AlcMP17:GFP-5 gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen war (Abb. 21B), während im 5. systemischen Blatt die PVY-Gehalte ein vergleichbaren Niveau wie in den Kontrollen erreichten. Somit haben offensichtlich die phänotypischen Änderungen als Folge der transienten MP17-Induktion einen limitierten lokalen Einfluss auf den Import und/oder die Multiplikation des Virus in den transgenen Linien.

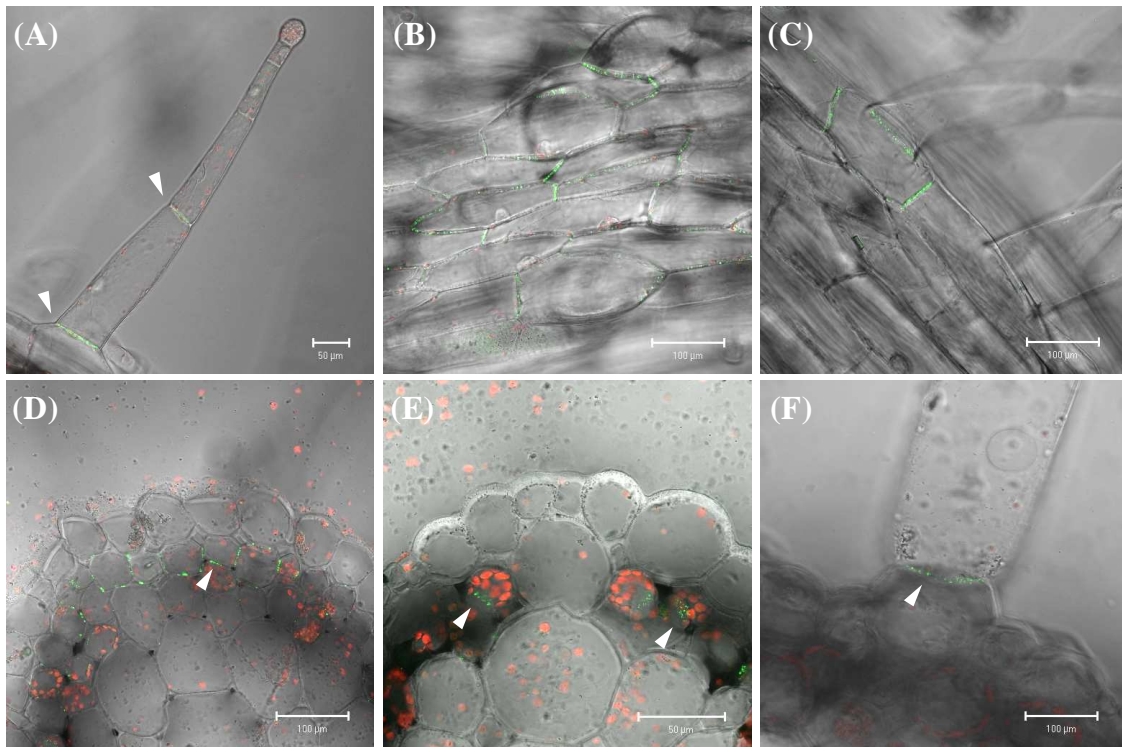


**Abb. 21:** PVY-Infektion von AlcMP17 und AlcMP17:GFP transgenen Linien. **(A)** Phänotyp 48 Stunden nach Ethanolapplikation in AlcMP17-29 zum Zeitpunkt der PVY-Infektion des lokalen Blattes und Markierung des 4. und 5. systemischen Blattes, von denen nach weiteren 6 Tagen Proben für die ELISA Virustiter-Bestimmung genommen wurde. **(B)** PVY-Virustiter in 4. und 5. systemischem Blatt 6 Tage nach Infektion der Linien AlcMP17-6, AlcMP17-29, AlcMP17:GFP-5 sowie Wildtyp-Kontrollen (WT). Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ( $n=20$ )  $\pm$  Standardfehler und sind in Prozent des WT-Gehaltes angegeben. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Ethanol-Induktion 6 Wochen alt und hatten 8-9 Blätter.

### 3.1.2.7 Subzelluläre Lokalisierung von MP17 nach Ethanol-Induktion

Trotz deutlicher und gleichmäßiger Akkumulation von *MP17* und *MP17:GFP*-spezifischen Transkripten nach Ethanolinduktion (Abb. 14, Abb. 19) in unterschiedlichen Blattaltersstufen, konnte in keinem der Induktionsexperimenten ein MP17-Proteinsignal über *Western*-Analyse detektiert werden. Denkbar ist, dass im Unterschied zu konstitutiv exprimierenden Pflanzen, in denen sich eine generelle Akkumulation des MP17 an den PDs des vaskulären und nicht-vaskulären Gewebes in *source*-Blättern nachweisen lässt (3.1.1.2, Abb. 5), die Affinität des Ethanol-induzierten MP17 zu plasmodesmalen Komponenten eine höhere Zellspezifität sowie eine stärkere Abhängigkeit vom physiologischen Status und Entwicklungszustand der PDs aufweist. Das MP17-Protein trifft nach Induktion in einem relativ kleinen Zeitfenster auf eine intakte Pflanze und ist nicht, wie bei konstitutiver Expression, über die gesamte Entwicklung anwesend. Es ist zudem anzunehmen, dass nicht-plasmodesmal lokalisiertes MP17 rasch degradiert wird, denn in *sink*-Blättern MP17:GFP transgener Pflanzen, wo eine Assoziation des MP17 ausschliesslich mit PDs der Trichome detektierbar war (3.1.1.2, Abb. 5), konnten keine Signale des MP17:GFP im Cytosol mikroskopisch lokalisiert werden. Um zu

überprüfen, ob die Lokalisation von MP17 nach Ethanol-Induktion mit dem Venen-assoziierten Phänotyp korreliert und eine hohe Zellspezifität für die fehlende Detektion in der *Western*-Analyse als Erklärung dienen kann, wurden transgene Pflanzen der Linie AlcMP17:GFP-8 mit Ethanol induziert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. AlcMP17:GFP-8 wurde zuvor in den kinetischen Analysen aufgrund der fehlenden Homogenität in der Phänotypausprägung infolge multipler Transgeninsertionen nicht berücksichtigt, doch erschien die Linie aufgrund des hohen Expressionsniveaus im Vergleich zu anderen AlcMP17:GFP transgenen Linien (3.1.2.2, Abb. 12) am besten für subzelluläre Lokalisierungsstudien geeignet. Die mikroskopischen Analysen wurden 48-72 Stunden nach Ethanolinduktion zu einem Zeitpunkt durchgeführt, wo der Phänotyp deutlich ausgeprägt war.



**Abb. 22:** Lokalisierung von MP17:GFP in Epidermisbereichen verschiedener Venenklassen der Linie AlcMP17:GFP-8, 48-72 Stunden nach Ethanolapplikation. **(A)** Trichom im phänotypischen Venenbereich der Klasse II eines *sink/source*-Übergangsblattes (3. Blatt von oben, Blatt Nr. 1 Blatt entspricht *sink*-Blatt mit 1 cm Länge) 3 Tage nach Ethanolapplikation. Pfeile markieren GFP-Fluoreszenz in Zellwandbereichen der basalen Trichomzelle. **(B)** Epidermisbereich der Venenklasse II im basalen Bereich des Blattes wie in (A). **(C)** Epidermisbereich der Venenklasse III des Blattes wie in (A) und (B). GFP-Fluoreszenz ist auf einzelne Epidermiszelle mit Trichomansatz beschränkt. **(D)** Querschnitt durch Klasse II-Vene im basalen Bereich eines 14 cm großen, phänotypischen Blattes 48 h nach Ethanolapplikation. GFP-Fluoreszenz ist überwiegend auf den Parenchymbereich unter der Epidermis beschränkt (Pfeil). **(E)** Querschnitt durch Klasse II-Vene im terminalen Bereich des Blattes wie (D) zeigt ebenfalls eine limitierte Lokalisierung in einzelnen Parenchymzellen. **(F)** Trichom über Mittelrippe (Venenklasse I) im mittleren Bereich eines 8,5 cm großen phänotypischen Blattes mit GFP-Fluoreszenz im Zellwandbereich der Trichom/Epidermis-Grenzschicht. Maßstab in (A) und (E) zeigt 50  $\mu\text{m}$ , in (B), (C), (D) und (F) jeweils 100  $\mu\text{m}$  an.

In Abb. 22 sind beispielhaft einige LSM-Aufnahmen gezeigt, die die plasmodesmale Lokalisation des MP17:GFP-Fusionsproteins belegen. Dabei zeigt sich, dass MP17:GFP vor allem in Zellen der Epidermis (einschließlich der Trichome) sowie der darunterliegenden Zellschicht von phänotypischen Venenbereichen (vornehmlich Klasse II und III) zu detektieren ist.

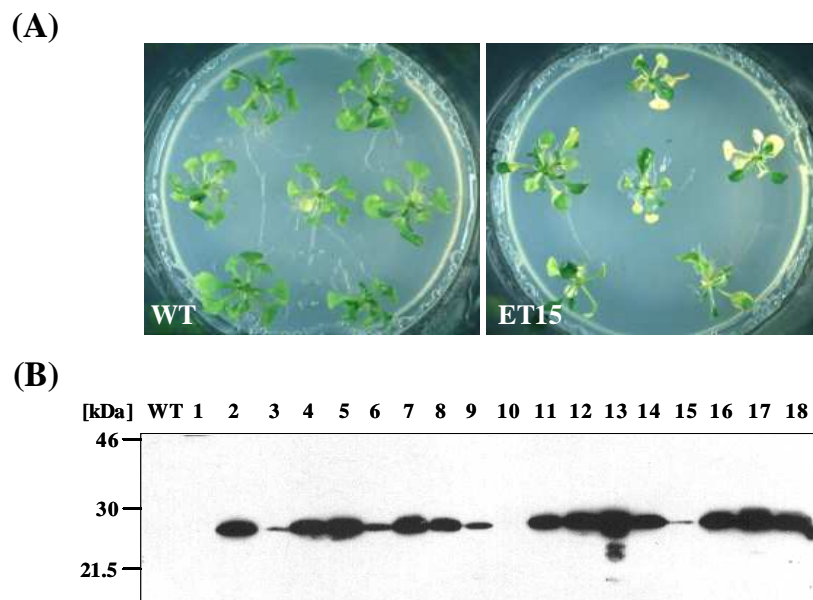
### **3.1.3 Etablierung eines genetischen Systems zur Identifizierung von *Arabidopsis*-Mutanten mit potentiellen Defekten in pflanzlichen MP17-Rezeptoren**

Die konstitutive und induzierbare Expression von MP17 in transgenen Pflanzen zeigte, dass virale Movement Proteine sehr spezifisch auf PDs, Assimilattransport und *sink/source*-Beziehungen einwirken können, was vermutlich auf primäre und sekundäre Effekte zurückzuführen ist. Letztendlich lassen sich aber die zugrundeliegenden Mechanismen der MP/Pflanze-Wechselwirkung nur über die Identifizierung des/der pflanzlichen Interaktionspartner(s) aufklären. Dabei legt die spezifische Assoziation des MP17 mit PDs Protein/Protein-Wechselwirkungen mit plasmodesmalen Proteinkomponenten nahe. Von Kragler *et al.* (1998) wurde ein universaler Rezeptor für die Translokation durch PDs postuliert, der gleichermaßen für endogene Proteine und virale MPs als Bindungspartner dient. Trotz zahlreicher beschriebener Arbeiten zur Isolierung von MP-Rezeptoren wurde bisher kein PD-spezifischer MP-Interaktionspartner über biochemische Methoden wie „Filter-Binding-Assay“ oder genetische Ansätze in Hefe (Zwei-Hybrid System) identifiziert. Vielmehr wurden Interaktoren gefunden, die eine Beteiligung am intrazellulären Transport des MPs in die Zellperipherie wahrscheinlich machen, wie die Interaktion des TMV-MP mit der Pektinmethylesterase (Dorokhov *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000) oder die Assoziation des TSWV-MP mit DnaJ-ähnlichen und Myosin/Kinesin-ähnlichen Proteinen (Soellick *et al.*, 2000; von Barga *et al.*, 2001). Im Falle des MP17 führte weder das Hefe Zwei-Hybrid System (eigene Arbeiten, Daten nicht gezeigt) noch ein biochemischer Ansatz (Paap, 2002) zur abschließenden Identifizierung eines Bindungspartners, so dass ein alternativer genetischer Ansatz zur Isolierung von Mutanten mit putativen Defekten im MP17-Bindungspartner entwickelt werden sollte. Obwohl sich Tabak als wertvolles und geeignetes Modellsystem zum Studium der physiologischen Effekte der MP17 Expression erwiesen hat, ist es als genetisches System denkbar ungeeignet. Es wurde daher überprüft, ob sich das System auf *Arabidopsis* übertragen lässt.



### 3.1.3.1 Phänotyp und Kohlenhydratstatus in MP17 transgenen *Arabidopsis* C24

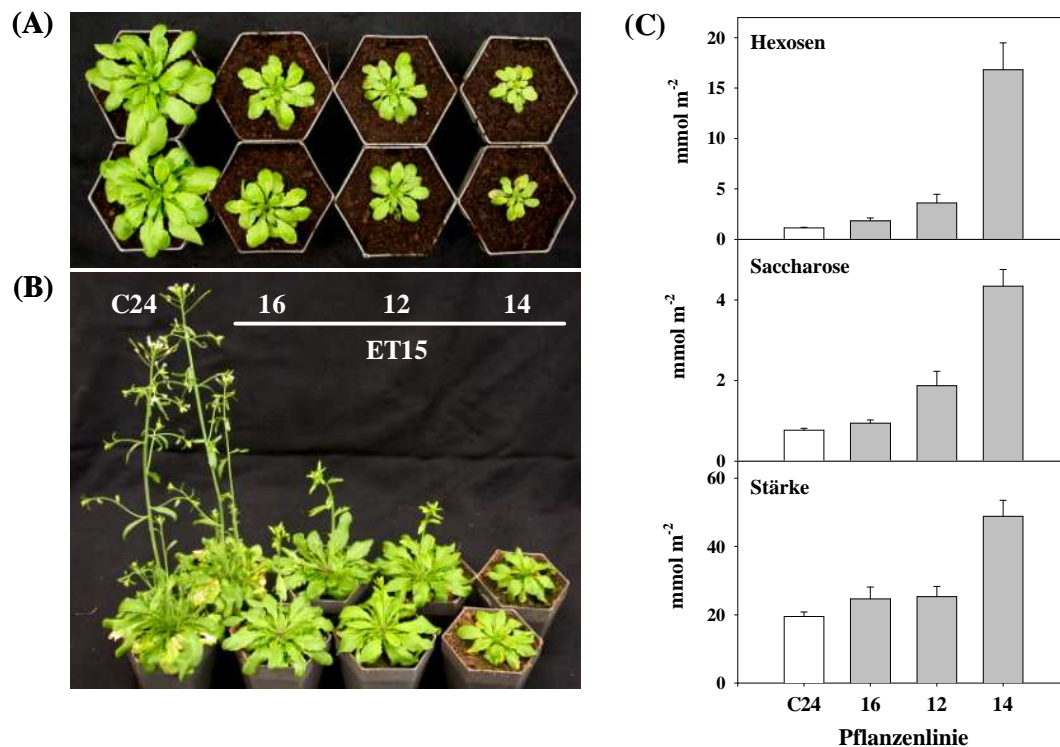
*Arabidopsis*-Pflanzen des C24-Ökotyps wurden mit dem Plasmid pET15 (vgl. 1.4.2) transformiert, das zuvor in Tabakpflanzen zu einer hohen Expression des N-terminal um 24 Aminosäuren verlängerten MP17-Proteins und infolgedessen zu den beschriebenen phänotypischen Änderungen führte (Herbers *et al.*, 1997; diese Arbeit). Das Saatgut der über Vakuuminfiltration transformierten Pflanzen wurde auf Kanamycin selektiert, wobei die meisten resistenten Pflanzen einen auffälligen Phänotyp zeigten, der durch ein Ausbleichen der unteren Blätter charakterisiert war (Abb 23A). 18 resistente Pflanzen wurden über *Western*-Analyse auf MP17-Expression getestet. In Extrakten von 16 Pflanzen ließ sich ein spezifisches MP17-Signal in der erwarteten Laufhöhe von 24-25 kDa (Abb. 23B) nachweisen.



**Abb. 23:** Identifizierung MP17 exprimierender *Arabidopsis*-Linien nach Transformation des Plasmids pET15 in den C24-Ökotyp. (A) Phänotypische Änderungen transgener Pflanzen (ET15) in Gewebekultur im Vergleich zur Kontrolle (WT). (B) MP17-Expression in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (T1). Auf einem 15%igen SDS-Gel wurde Gesamtprotein aufgetragen, gelelektrophoretisch getrennt und anschließend eine *Western*-Analyse mit dem MP17-Antikörper durchgeführt. WT, Kontrolle; 1-18, Kanamycin-resistente Transformanden.

Nach Transfer ins Gewächshaus zeigten die phänotypischen Pflanzen eine deutliche Wuchsretardierung und einen chlorotischen Phänotyp in den *source*-Blättern, was an die phänotypischen Änderungen der MP17 transgenen Tabakpflanzen erinnerte. Für weitere Analysen wurde von den Linien ET15-12, ET15-14 und ET15-16 Saatgut gewonnen und die Linien über mehrere Generationen vermehrt, so dass Pflanzenmaterial mit einheitlichem Phänotyp erhalten wurde. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Wuchsretardierung mit

Änderungen im Kohlenhydratstatus korrelierte, wurden transgene Pflanzen der T6-Generation unter Kurztagbedingungen angezogen und 8 Wochen nach der Aussaat auf Akkumulation von löslichen Zuckern und Stärke analysiert. In Abb. 24A ist der Phänotyp zum Zeitpunkt der Ernte dargestellt. Alle drei Linien zeigen einen deutlich verminderten Wuchs gegenüber den Kontrollen (C24), wobei ET15-14 den stärksten Effekt aufwies. Acht Tage nach Transfer der Pflanzen in Langtagbedingungen zeigten sich ebenfalls deutliche Unterschiede in der Blütenentwicklung zwischen den transgenen Pflanzen und den Kontrollen (Abb. 24B). Während der Wildtyp bereits einen ausgeprägten Blütenstand mit geöffneten Blüten und jungen Schoten aufwies, war bei den transgenen Linien ET15-16 und -12 der Blütenstand gerade erst hervorgetreten und bei der am stärksten betroffenen Linie noch nicht sichtbar, was auf eine generelle Entwicklungsverzögerung in den transgenen Linien schließen lässt.



**Abb. 24:** Phänotyp MP17 transgener *Arabidopsis*-Linien des Ökotyps C24 nach 8 Wochen unter Kurztagbedingungen (A) und nach weiteren 8 Tagen unter Langtagbedingungen (B) im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (C24). (C) Kohlenhydratgehalte in transgenen Linien nach 8 Wochen unter Kurztagbedingungen. Proben wurden 8 Stunden nach Beginn der Lichtphase von jeweils zwei *source*-Blättern pro Pflanze genommen und lösliche Zucker und Stärke bestimmt. Daten sind als Mittelwerte ( $n=6$ )  $\pm$  Standardfehler angegeben.

Die Kohlenhydratgehalte in den transgenen Linien unter Kurztagbedingungen (Abb. 24C) zeigten in Übereinstimmung mit der Ausprägung des Phänotyps eine drastische Akkumulation von löslichen Zuckern und Stärke in der Linie ET15-14. In den weniger betroffenen Linien ET15-12 und ET15-16 konnte ebenfalls eine generelle Erhöhung an

Hexosen, Saccharose und Stärke beobachtet werden, doch erwiesen sich die Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp nur für die Gehalte an Hexosen (ET15-12 und -16) und Saccharose (ET15-12) als statistisch signifikant. Es fiel auf, dass die Hexosegehalte offensichtlich am empfindlichsten auf die Expression des MP17 reagierten und um die Faktoren 1,6 (ET15-16), 3,2 (ET15-12) bzw. 14,8 (ET15-14) gegenüber den Kontrollen erhöht waren. Demgegenüber waren die Gehalte an Saccharose und Stärke maximal um den Faktor 5,7 bzw. 2,5 in der Linie ET15-14 verändert.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Expression von MP17 in *Arabidopsis thaliana* zu phänotypischen Änderungen führte, die übereinstimmend mit MP17 transgenen Tabaklinien (vgl. 3.1.1.4, Abb. 7) durch Wuchsretardierung, Entwicklungsverzögerung und deutlicher Akkumulation von Kohlenhydraten in *source*-Blättern charakterisiert sind. Dies lässt einen vergleichbaren Wirkmechanismus des MP17-Proteins auf plasmodesmale Funktion und Assimilattransport sowie konservierte endogene Interaktionspartner von MP17 bei verschiedenen Pflanzenspezies vermuten und unterstreicht die Übertragbarkeit des experimentellen Ansatzes auf das genetisch analysierbare *Arabidopsis*-System.

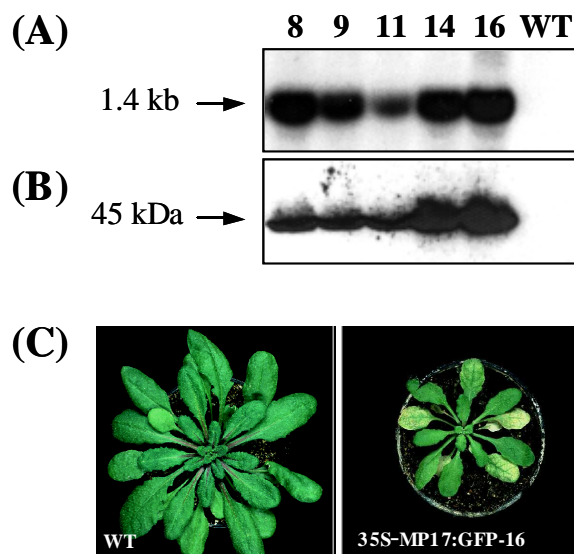
### 3.1.3.2 Phänotyp und Kohlenhydratstatus in MP17:GFP transgenen *Arabidopsis Col-0*

Die Transformation des Konstruktes ET15 vermittelte ein hohes MP17-Expressionsniveau in transgenen Tabak- und *Arabidopsis*-Pflanzen, was sich als Voraussetzung für die Entwicklung des pleiotropen Phänotyps erwies. Hingegen führte die konstitutive Expression der *MP17:GFP* Reporterfusion in Tabak als Folge eines relativ niedrigen Proteingehaltes weder zur Kohlenhydratakkumulation noch zu einem retardierten Wachstum in Tabakpflanzen. Allerdings erwies sich dabei die Fähigkeit von MP17 zur plasmodesmalen Assoziation und Modifikation unabhängig vom Expressionslevel.

Um zu untersuchen, ob die Expression von MP17:GFP zur visualisierbaren „Markierung“ der PDs in *Arabidopsis* führte und ein ähnlich hohes Expressionsniveau erreicht werden muss, um über die plasmodesmale Assoziation hinaus MP17-vermittelte Änderungen des Assimilattransportes zu induzieren, wurde das binäre Konstrukt p35S-1 in *Arabidopsis* transformiert. Dabei wurde der Ökotyp Col-0 ausgewählt, um gegebenenfalls die transgenen Linien als genetisches Material für die Generierung von Mutanten nach Samenmutagenese einzusetzen.

Nach *Agrobacterien*-vermittelter Transformation von Col-0 Wildtyp-Pflanzen über Vakuumfiltration wurde das gewonnene Saatgut auf Kanamycin selektiert und resistente

Pflanzen über *Western*-Analyse auf Expression des Fusionsproteins durchmustert. Von 16 Transformanten zeigten 7 Pflanzen ein spezifisches Signal in der Laufhöhe von etwa 45 kDa, was der zu erwartenden Größe des Fusionsproteins entsprach und mit dem Signal im parallel aufgetragenen Extrakt aus der MP17:GFP exprimierenden Tabaklinie 35S-1-41 übereinstimmte (Daten nicht gezeigt). In Abb. 25 ist die Expressionsanalyse von 5 ausgewählten transgenen *Arabidopsis*-Linien dargestellt. Von diesen Linien zeigte 35S-MP17:GFP-16 den höchsten Proteingehalt und zudem phänotypische Veränderungen, die sich unter Langtagbedingungen wie in den ET15-Linien darstellten (Abb. 25C). Fluoreszenzmikroskopische Analysen belegten, dass sich in allen Linien das MP17:GFP-Fusionsprotein als punktuelle Fluoreszenz im Zellwandbereich der Epidermis lokalisieren ließ (vgl. 3.1.3.3), was eine plasmodesmale Assoziation des MP17-Proteins wie in Tabakpflanzen nahe legte.



**Abb. 25:** Expressionsanalyse von MP17:GFP in transgenen *Arabidopsis*-Linien des Ökotyps Col-0 und phänotypische Änderungen unter Langtagbedingungen.

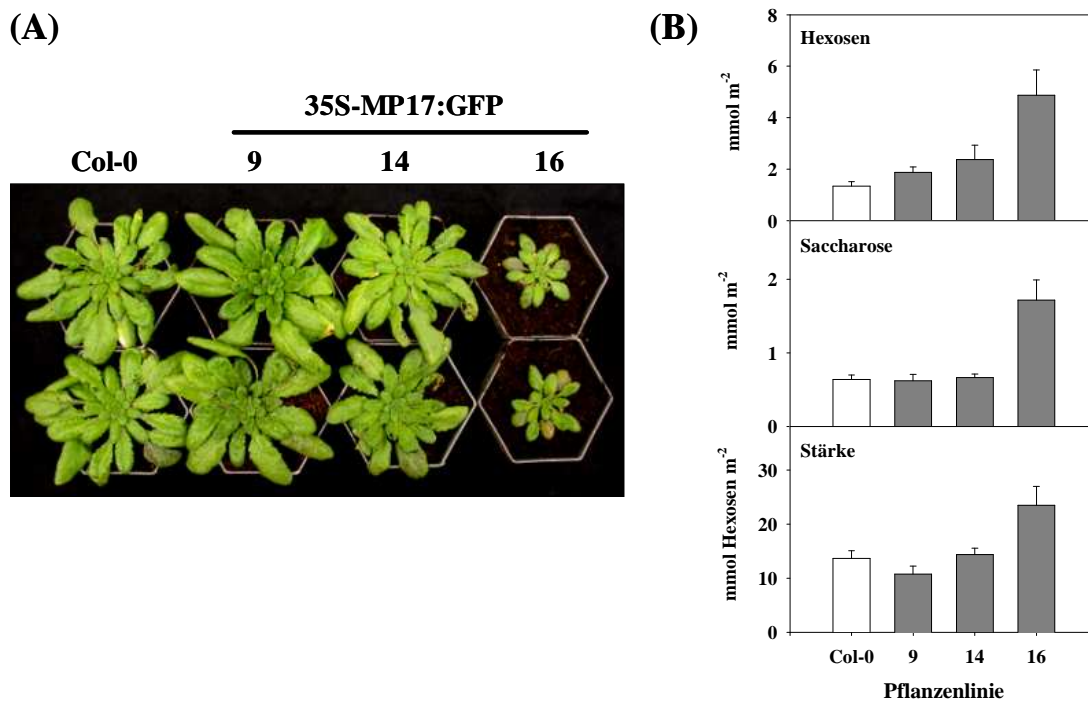
(A) *Northern*-Analyse von MP17:GFP spezifischen Transkripten. Gesamt-RNA wurde von Kontrollpflanzen (WT) und MP17:GFP transgenen Linien isoliert und 30 µg RNA pro Spur aufgetragen. Der *Northern-Blot* wurde mit einer MP17 spezifischen cDNA Sonde hybridisiert.

(B) *Western*-Analyse der MP17:GFP Protein-Akkumulation in verschiedenen transgenen Linien und einer Wildtyp-Kontrolle mittels eines polyklonalen anti-MP17 Antiserums (1:5000 Verdünnung).

(C) Wuchsretardierung und chlorotische Aufhellungen in *source*-Blättern der transgenen Linie 35S-MP17:GFP im Vergleich zu einer untransformierten Kontrolle (WT).

Von den transgenen Linien 35S-MP17:GFP-9, -14 und -16 wurde Saatgut gewonnen und über mehrere Generationen vermehrt, so dass homozygotes Pflanzenmaterial für die Kohlenhydrat-Analyse erhalten wurde. Die Pflanzen der transgenen Linien wurden für 8 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und vor der Probennahme die Expression des Fusionsproteins in den nicht-phänotypischen Linien 35S-MP17:GFP-9 und -14 über die mikroskopische Detektion der GFP-Fluoreszenz verifiziert. Die Probennahme zur

Kohlenhydratbestimmung erfolgte parallel zu den MP17 exprimierenden Linien ET15 (vgl. 3.1.3.1). Die Analysen ergaben, dass die phänotypische Linie 35S-MP17:GFP-16 signifikante Mengen lösliche Zucker und Stärke in den *source*-Blättern gegenüber den Kontrollen akkumulierte (Abb. 26). Die nicht-phänotypischen Linien zeigten nur eine tendenzielle Erhöhung in den Hexosegehalten, die sich aber statistisch nicht absichern ließ, während der Saccharosegehalt unverändert blieb. Interessanterweise war der Stärkegehalt in der Linie 35S-MP17:GFP-9 sogar leicht vermindert, eine Beobachtung, die zuvor bei MP17:GFP transgenen Tabaklinien bei niedrigem Expressionsniveau gemacht wurde. Allerdings erwies sich diese Veränderung gegenüber den Kontrollen als nicht signifikant.



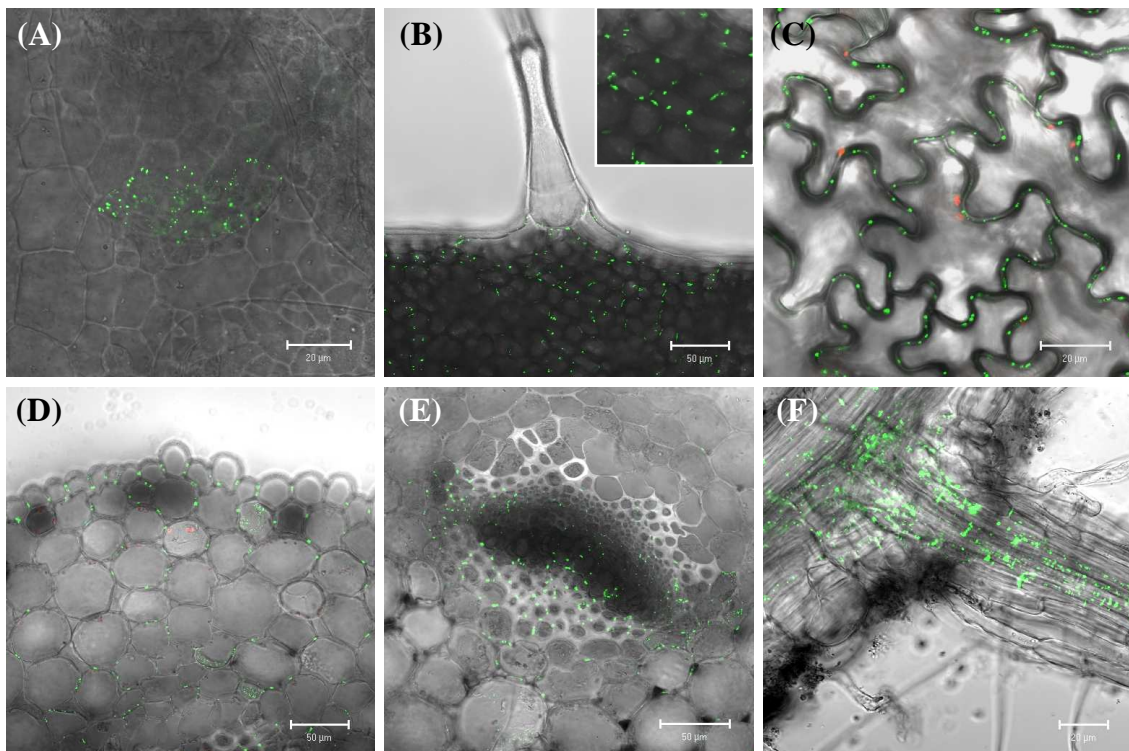
**Abb. 26:** Phänotyp MP17:GFP transgener *Arabidopsis*-Linien des Ökotyps Columbia (Col-0) nach 8 Wochen unter Kurztagbedingungen **(A)** im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Col-0). **(B)** Kohlenhydratgehalte in transgenen Linien nach 8 Wochen unter Kurztagbedingungen. Proben wurden 8 Stunden nach Beginn der Lichtphase von jeweils zwei *source*-Blättern pro Pflanze genommen und lösliche Zucker und Stärke bestimmt. Daten sind als Mittelwerte ( $n=6$ )  $\pm$  Standardfehler angegeben.

### 3.1.3.3 Subzelluläre Lokalisierung von MP17:GFP

Da die Primärcharakterisierung der MP17:GFP transgenen *Arabidopsis*-Linien eine Zellwand-assoziierte Lokalisation des Fusionsproteins ergab und die Interaktion des MP17 mit plasmodesmalen Strukturen auch in *Arabidopsis* wahrscheinlich machte, sollte die



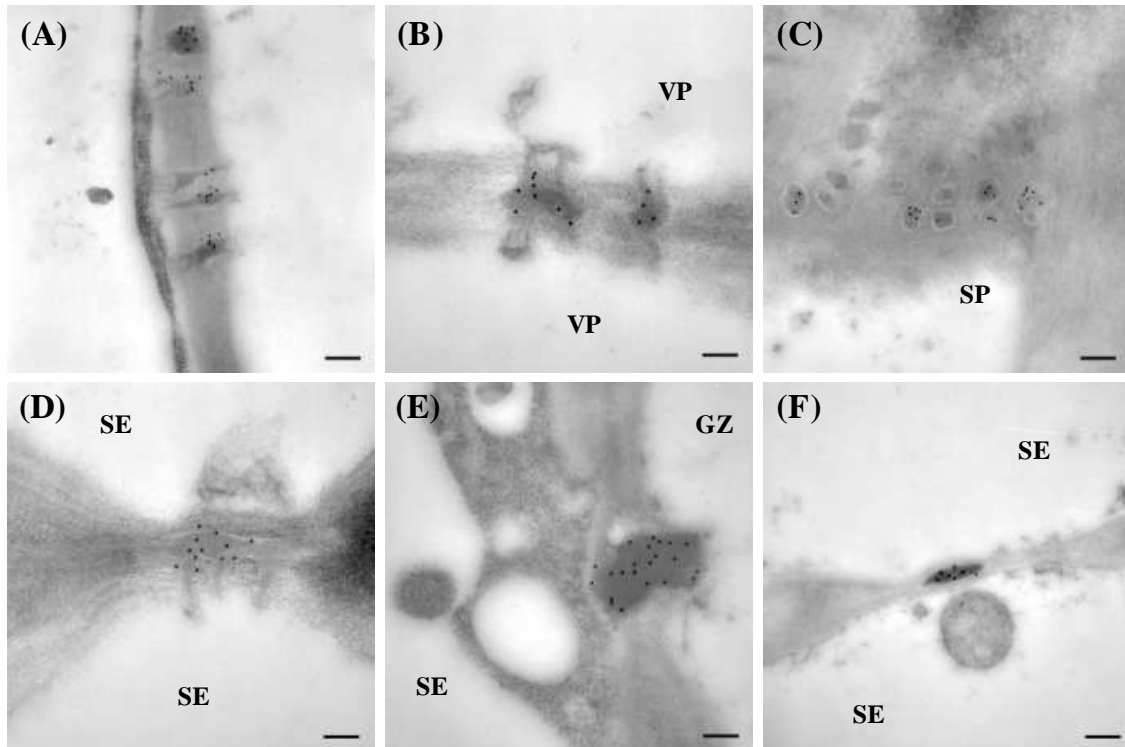
phänotypische Linie 35S-MP17:GFP-16 detaillierter auf die plasmodesmale Präferenz von MP17 in *Arabidopsis* untersucht werden. Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten, dass vergleichbar zu MP17:GFP exprimierenden Tabakpflanzen das Fusionsprotein mit Zell-zu-Zell Verbindungen des vaskulären und nicht-vaskulären Gewebes in *source*-Blättern assoziiert vorlag. Wie in Abb. 27 dargestellt, ist eine deutliche Fluoreszenz in der Epidermis, dem Mesophyll, sowie in den vaskulären Bündeln der Petiolen zu detektieren (Abb. 27B-D). Darüber hinaus zeigten die Wurzeln im Bereich des Zentralzylinders eine auffällig starke Fluoreszenz, die zuvor in Tabak nicht gefunden wurde (Abb. 27F). Hingegen war in *sink*-Blättern nur eine Assoziation mit Zellwänden der Trichomzellen am Übergang zur Epidermis zu beobachten, nicht aber mit den Zell-zu-Zell Kontakten zwischen den Epidermiszellen (Abb. 27A).



**Abb. 27:** GFP-Fluoreszenz in verschiedenen Geweben der *Arabidopsis*-Linie 35S-MP17:GFP-16. (A) Punktueller Dekorierung der Trichombasiszelle am Zell-zu-Zell Kontakt mit Epidermis eines *sink*-Blattes (<0,3 cm), allerdings ohne Markierung der Zellwandbereiche zwischen den *sink*-Epidermiszellen. (B) Aufsicht auf Epidermis mit Trichom in einem *source*-Blatt, Fokusebene auf darunter liegendem Palisadenparenchym eingestellt (s. auch vergrößerter Ausschnitt). (C) Punktueller Dekorierung der Zellwandbereiche der Epidermis in einem *source*-Blatt, (D) im Parenchym und (E) im Leitbündel einer querschnittenen Petiole, sowie (F) im Zentralzylinder einer Hauptwurzel mit Seitenwurzelsatz. Maßstab gibt in (A), (C), (F) 20  $\mu\text{m}$ , in (B), (D) und (E) 50  $\mu\text{m}$  an.

Um zu verifizieren, ob die punktuelle Fluoreszenz auf eine plasmodesmale Lokalisation wie in Tabak zurückgeführt werden konnte, wurden mit dem anti-MP17 Antiserum

Immunogold-Markierungen durchgeführt. Dabei bestätigte sich, dass MP17:GFP ausschließlich an PDs verschiedener Zelltypen des vaskulären und nicht-vaskulären Gewebes lokalisiert war (Abb. 28).



**Abb. 28:** Immunogold-Markierung von MP17:GFP an Plasmodesmen (PDs) verschiedener Zelltypen der transgenen Linie 35S-MP17:GFP-16 mit polyklonalem anti-MP17 Antikörper und Gold (10nm)-konjugiertem Protein A. (A) Markierung von PDs zwischen zwei Parenchymzellen im Mesophyllgewebe. (B) PDs zwischen vaskulären Parenchymzellen im Leitgewebe eines *source*-Blattes (VP). (C) Markierung einer Siebplatte (SP). (D) Markierung eines PD zwischen zwei Siebelementen (SE). (E) PD-Markierung zwischen Geleitzelle und SE im Zentralzylinder der Wurzel. (F) Lokalisierung von MP17:GFP an PD zwischen zwei SE im Zentralzylinder der Wurzel. Maßstab gibt in (A), (B), (D), (E) 0,15  $\mu\text{m}$ , in (C) und (F), 0,25  $\mu\text{m}$  an. [Bilder von Dr. Twan Rutten nach der Methode in Hofius *et al.*, (2001)].

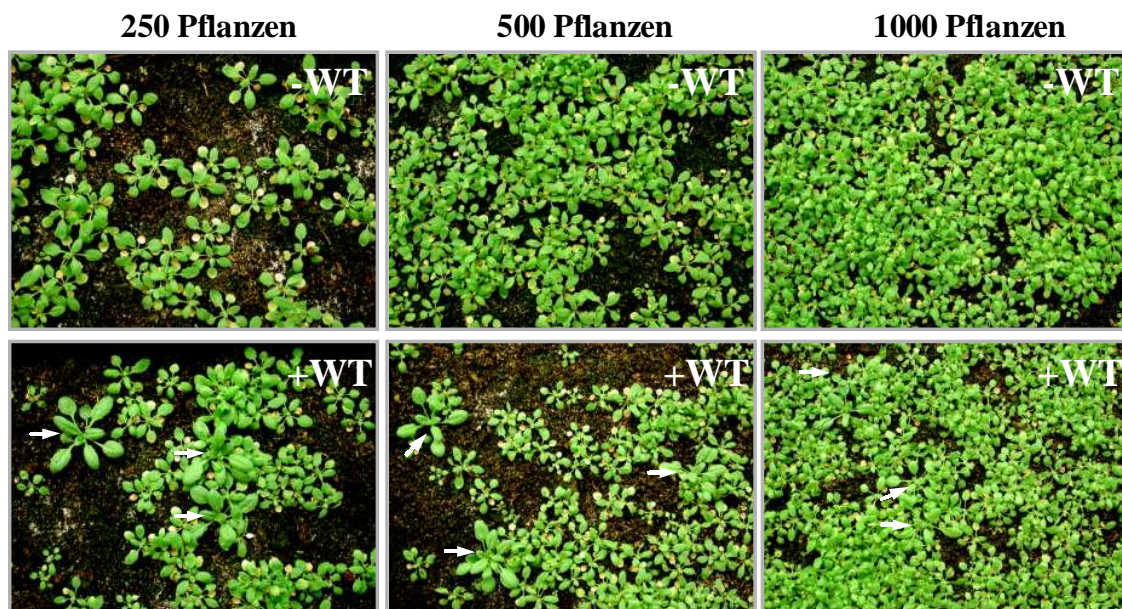
### 3.1.3.4 Strategie zur Isolierung von MP17-Suppressormutanten und Optimierung des Testsystems

Die plasmodesmale Markierung durch MP17 (3.1.3.3) sowie der beobachtete Einfluss der MP17-Expression auf Pflanzenentwicklung und Assimilatverteilung (3.1.3.1, 3.1.3.2) lässt konservierte MP17-Interaktionspartner zwischen *Arabidopsis* und *Solanaceen* vermuten. Die transgenen *Arabidopsis*-Linien bieten somit ein genetisches System zur Identifizierung von Mutanten mit veränderten plasmodesmalen Bindungs- und Transporteigenschaften und damit zur Isolierung putativer MP17-Rezeptoren. Voraussetzung dazu ist die Samenmutagenese

einer homozygoten MP17 transgenen Linie und ein geeignetes, effizientes Testverfahren zur Durchmusterung einer großen Mutantenpopulation.

Unter der Annahme, dass Mutanten mit einem Nullallel einer plasmodesmalen Proteinkomponente eine starke Wuchsretardierung oder gar Letalität aufweisen, muss eine Strategie gewählt werden, die die Isolierung von Mutanten mit Änderungen („change of function“) und nicht dem Verlust („loss of function“) der Funktionalität des kodierten Proteins anstrebt. Veränderte Bindungseigenschaften des plasmodesmalen MP17-Rezeptors könnten somit entweder über die Aufhebung der plasmodesmalen Assoziation oder die Reversion des MP17-vermittelten Exportblocks und somit der Wuchsretardierung identifiziert werden. Solche sogenannten MP17-Suppressormutanten müssten sich im Wachstum ähnlich wie die nicht-transgenen Kontrollpflanzen verhalten und daher relativ einfach aus einer großen Population phänotypischer Pflanzen zu isolieren sein.

Aus diesem Grund wurden in einem Vorversuch Samen von WT-Pflanzen (Col-0) mit dem Saatgut der phänotypischen MP17:GFP transgenen Linie 35S-MP17:GFP-16 vermischt und in Pflanzschalen ausgesät. Um die optimale Aussaatdichte zu bestimmen wurden dabei ~250 Samen (5 mg), ~500 Samen (10 mg) und ~1000 Samen (20 mg) der transgenen Linie mit jeweils 10 WT-Samen versetzt und parallel mit den entsprechenden Kontrollen ohne WT-Saatgut unter Langtagbedingungen angezogen.



**Abb. 29:** Überprüfung der optimalen Saatdichte der MP17:GFP exprimierender *Arabidopsis*-Linie 35S-MP17:GFP-16 zur Isolierung von MP17-Suppressormutanten. 250, 500 oder 1000 Samen wurden entweder ohne (-WT) oder mit jeweils 10 Wildtyp-Samen (+WT) ausgesät. Nicht-phänotypische WT-Pflanzen sind mit Pfeilen markiert und bei einer Dichte von 250 und 500 Samen deutlich, bei 1000 Samen hingegen schwieriger zu erkennen.



Es ließen sich bei allen vorgenommenen Saaddichten zwischen 5-8 WT-Pflanzen unter den Transgenen wiederfinden, allerdings bei 1000 Pflanzen nur mit größeren Schwierigkeiten (Abb. 29). Aus diesem Grund erschien die Dichte von 500 Samen pro Schale als optimales Testsystem zur Identifizierung von MP17-Suppressormutanten.

### **3.1.3.5 EMS-Mutagenese einer MP17:GFP transgenen *Arabidopsis*-Linie**

Da sowohl die T-DNA oder Transposon-vermittelte Insertionsmutagenese als auch der Einsatz ionisierender Strahlung darauf abzielen, „loss of function“ Mutationen und tatsächliche Nullallele zu erzeugen, war die chemische Samenmutagenese mittels Ethylmethansulfonat (EMS) die Methode der Wahl zur Erzeugung einer Mutantenpopulation basierend auf einer phänotypischen MP17 transgenen Linie. Chemisch mutagene Substanzen wie EMS zeigen hohe Mutationsraten und begünstigen den Einzelbasenaustausch gegenüber größeren genetischen Veränderungen und resultieren daher häufig in dem Austausch einer einzelnen Aminosäure des kodierten Proteins. Für die Samenmutagenese wurde die phänotypische und homozygote Linie 35S-MP17:GFP-16 im Col-0 Hintergrund ausgewählt. Über die GFP-Fluoreszenz lassen sich die generierten MP17-Suppressormutanten einfach auf Änderungen der plasmodesmalen Lokalisation von MP17:GFP untersuchen, was erste Hinweise auf eine mögliche Mutation des PD-assoziierten MP17-Bindungspartners gäbe.

Die Samenmutagenese wurde von der Firma LEHLE SEEDS (Round Rock, TX, USA) durchgeführt und dabei 1,44 g homozygotes Saatgut der Linie 35S-MP17:GFP-16 (T4) mit 0,21 % (v/v) EMS mutagenisiert. Anschließend wurde eine abgeschätzte M1-Population von 34848 Pflanzen in 24 Parentalgruppen (1453±58 Pflanzen pro Gruppe) angezogen und das M2-Saatgut von LEHLE SEEDS erhalten.

### **3.1.3.6 Identifizierung und Primärcharakterisierung von MP17-Suppressormutanten**

Die Durchmusterung der M2-Nachkommenschaft auf MP17-Suppressormutanten erfolgte in Pflanzschalen unter Langtagbedingungen im Gewächshaus. Basierend auf den in 3.1.4.1. beschriebenen Vorversuchen wurden parallel die 24 Parentalgruppen (PG) mit jeweils einer Saaddichte von 500 Samen pro Schale sukzessive auf Revertanten durchmustert. Dabei zeigte sich, dass bereits die Keimblätter ein charakteristischer Indikator für phänotypische Änderungen sind. So konnte man bei allen nicht-mutierten MP17:GFP exprimierenden Pflanzen ein Ausbleichen der Keimblätter beobachten, was häufig mit einer Akkumulation

von Anthocyanen bis hin zum Absterben in späteren Entwicklungsstadien verbunden war. Mutanten mit frühzeitig identifizierten grünen Keimblättern zeigten in der Regel im späteren Stadium ein deutlich verbessertes Wachstum gegenüber den transgenen Kontrollen und keine phänotypischen Veränderungen der Rosettenblätter.

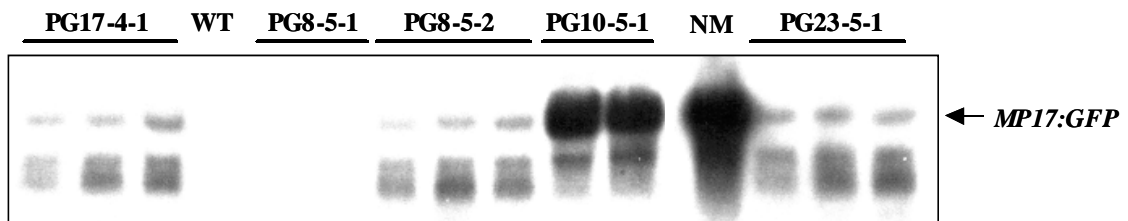
Insgesamt wurden in 7 Anzuchten abgeschätzte 84000 Samen auf Revertanten durchmustert. Dabei wurden 31 putative MP17-Suppressormutanten identifiziert, die alle ein gegenüber der nicht-mutierten Kontrolllinie deutlich verbessertes, Wildtyp-ähnliches Wachstum zeigten. Die Primärcharakterisierung erfolgte über Fluoreszenz- und *Western*-Analysen, um eine erste Einteilung der Mutanten vorzunehmen. Dabei konnten bei den meisten Mutanten weder GFP-Fluoreszenz noch MP17-Proteinexpression detektiert werden (Klasse I). Bei vier Mutanten blieb allerdings trotz fehlender GFP-Fluoreszenz im Zellwandbereich (Abb. 31) weiterhin das Fusionsprotein mittels MP17-Antikörper detektierbar (Klasse II; Abb. 32). Schließlich ließen sich zwei Mutanten in einer dritten Klasse zusammenfassen, die eine vergleichbare GFP-Lokalisation (Abb. 31) und auch ein Proteinsignal wie die nicht-mutierte Kontrolle (Daten nicht gezeigt) aufwiesen (Klasse III).

**Tab. 3-3.** Einordnung ausgewählter MP17-Suppressormutanten in verschiedene Klassen (I-III) gemäß der GFP-Fluoreszenz nach Fluoreszenzmikroskopie, der MP17:GFP-Proteinexpression nach *Western*-Analyse sowie der *MP17:GFP*-Transkriptakkumulation nach *Northern*-Analyse. (n.b., nicht bestimmt)

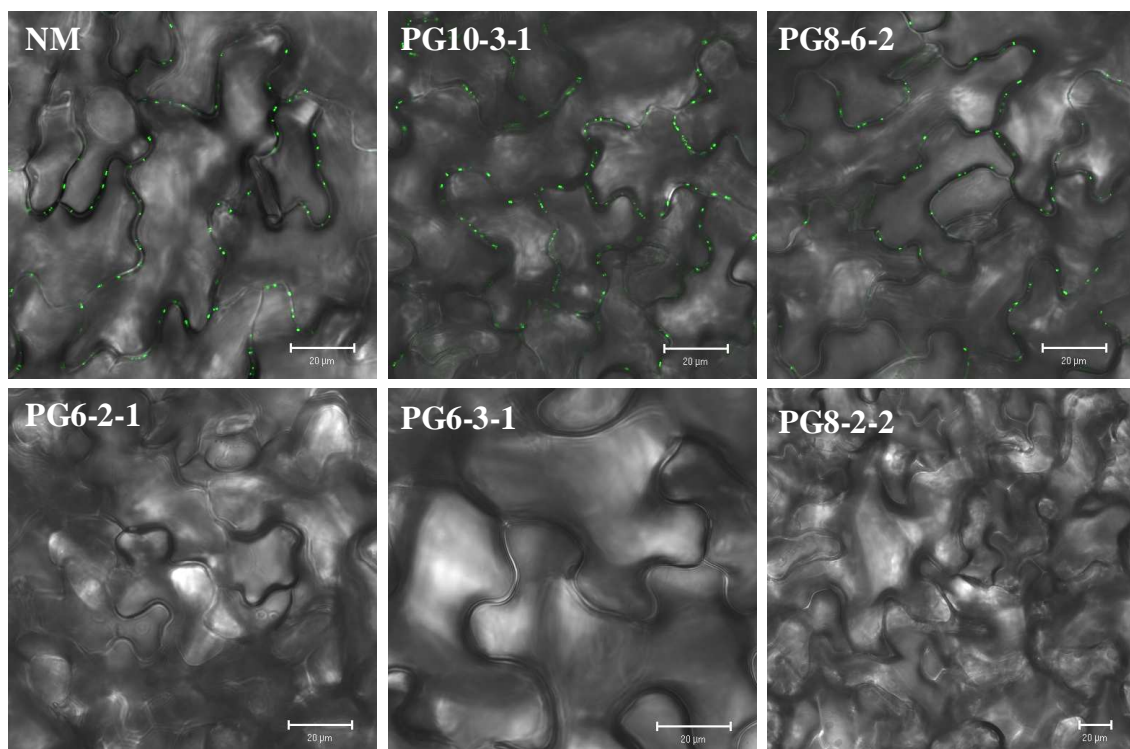
| Mutante  | Klasse | GFP-Fluoreszenz | MP17:GFP-Protein | MP17:GFP-Transkript |
|----------|--------|-----------------|------------------|---------------------|
| PG10-5-1 | I      | –               | –                | +                   |
| PG23-2-1 | I      | –               | –                | +                   |
| PG17-4-2 | II     | –               | +                | n.b.                |
| PG6-3-1  | II     | –               | +                | n.b.                |
| PG6-2-1  | II     | –               | +                | n.b.                |
| PG8-2-2  | II     | –               | +                | n.b.                |
| PG10-3-1 | III    | +               | +                | n.b.                |
| PG8-6-2  | III    | +               | +                | n.b.                |

Um zu klären, ob die große Anzahl von Suppressormutanten, die weder ein MP17 *Western*-Signal noch GFP-Fluoreszenz zeigten, im wesentlichen auf „Knockout“-Mutationen im Transgen (Promotor) beruhten, wurde in 17 Mutanten die Akkumulation von *MP17:GFP* spezifischen Transkripten über *Northern*-Analyse getestet. Dabei zeigten nur zwei Mutanten (PG10-5-1, PG23-2-1) ein spezifisches Signal von vergleichbarer Intensität wie die nicht-

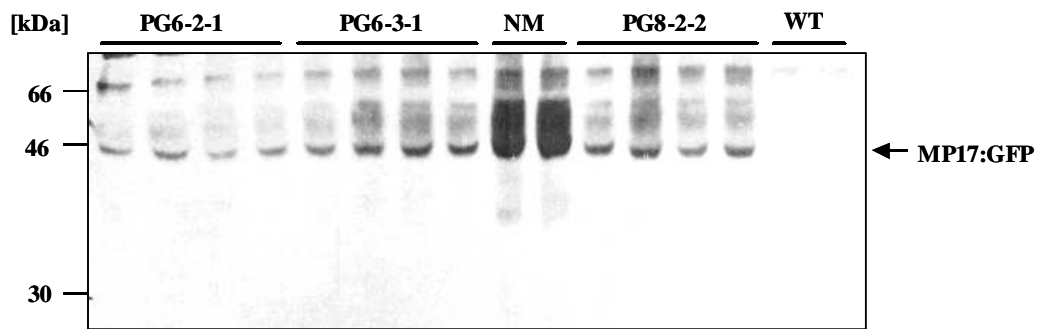
mutierte Kontrolle, während bei einigen (6) kein Transkript detektierbar war. Interessanterweise konnte bei den übrigen Mutanten ein Hybridisierungssignal identifiziert werden, dass als „Schmier“ mit den ribosomalen Banden assoziiert schien und Transkriptinstabilität vermuten ließ (Abb. 30).



**Abb. 30:** Northern-Analyse ausgewählter MP17-Suppressormutanten (Klasse I) im Vergleich zur nicht-transformierten Kontrolle (WT) und zur nicht-mutagenisierten transgenen Linie 35S-MP17:GFP-16 (NM). Gesamt-RNA wurde aus Blattmaterial isoliert und 30 µg pro Spur aufgetragen. Der Northern Blot wurde mit einer MP17-spezifischen cDNA-Sonde hybridisiert. Signale in Pflanzen der Suppressormutanten PG17-4-1, PG8-5-2 und PG23-5-1 lassen Transkriptinstabilität vermuten.

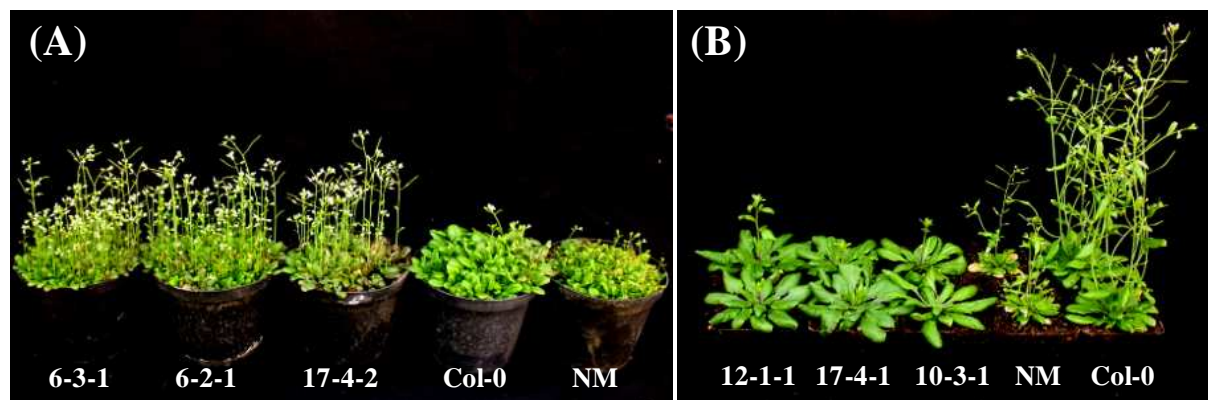


**Abb. 31:** GFP-Fluoreszenz in der Epidermis von *source*-Blättern verschiedener MP17-Suppressormutanten im Vergleich zur nicht-mutierten MP17:GFP transgenen Kontrolle (NM). PG10-3-1 und PG8-6-2 zeigen vergleichbare Fluoreszenz wie die Kontrollen, während PG6-2-1, PG6-3-1 sowie PG8-2-2 keine Signale aufweisen. Maßstab gibt 20 µm an.



**Abb. 32:** Immunoblot-Analyse der MP17:GFP-Proteinexpression in MP17-Suppressormutanten PG6-2-1, PG6-3-1 und PG8-2-2 (Klasse II) im Vergleich zur nicht-mutierten MP17:GFP transgenen Linie (NM) und einer nicht-exprimierenden Kontrolle (Col-0). Pflanzenextrakte von jeweils 4 verschiedenen M3-Pflanzen der MP17-Suppressormutanten und jeweils 2 Pflanzen der Kontrollen wurden über *Western Blotting* unter Verwendung eines polyklonalen anti-MP17 Antiserums (1:5000 Verdünnung) sowie eines sekundären HRP-konjugierten IgG Antikörpers (1:100000) analysiert. Identische Mengen an Gesamtprotein wurden auf jede Spur aufgetragen. Das MP17:GFP-Fusionsprotein migrierte bei etwa 45 kDa (Pfeil).

Neben den beschriebenen Charakteristika einer veränderten MP17-Proteinexpression oder GFP-Fluoreszenz zeigten einige MP17-Suppressormutanten entwicklungsphänotypische Auffälligkeiten gegenüber den nicht-mutagenisierten und/oder der nicht-transgenen Kontrollen. So konnten Änderungen in der Blattmorphologie und Verschiebungen der Blüteninduktion (früh- und spätblühende Mutanten, Abb. 33) beobachtet werden, was einen ersten Hinweis auf mögliche Veränderungen in plasmodesmalen Transporteigenschaften für Assimilate und Makromoleküle mit Signalfunktion (Protein, RNA) gab.



**Abb. 33:** Früh- (A) und spätblühende (B) MP17-Suppressormutanten im Vergleich zu der nicht-transgenen WT-Kontrolle (Col-0) und der nicht-mutierten transgenen Linie 35S-MP17:GFP-16 (NM).

### **3.2 Analysen zur Interaktion des potyviralen Capsid Proteins mit pflanzlichen Wirtsfaktoren während der Infektion mit *Potato virus Y***

Potyviren verfügen im Unterschied zu den meisten anderen Virusgruppen nicht über ein spezifisches Movement Protein des Zell-zu-Zell Transportes, sondern Transportfunktionen werden von verschiedenen Proteinen mit anderen Aufgaben im Infektionszyklus übernommen. Dazu zählt das multifunktionale Capsid Protein, das eine essentielle Rolle sowohl beim Zell-zu-Zell als auch beim Langstreckentransport spielt (Dolja *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1995). Daneben ist das CP an der Blattlausübertragung (konserviertes DAG-Motiv im N-Terminus), der Enkapsidierung der viralen RNA (Assemblierung) sowie an der Regulation der Genomamplifikation beteiligt (zusammengefasst in Revers *et al.*, 1999; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Die spezifische Funktion des CP beim Zell-zu-Zell Transport leitet sich daraus ab, dass zum einen für die Ausbildung des Transportkomplexes ein Assemblierungs-kompetentes CP erforderlich ist (Dolja *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1995) und zum anderen die Interaktion des CPs mit PDs sowie der CP-vermittelte Zell-zu-Zell Transfer viraler RNA durch Erweiterung des plasmodesmalen Ausschlussvermögens gezeigt werden konnte (Rojas *et al.*, 1997). Allerdings gibt es bisher zu Art und Zusammensetzung des potyviralen Transportkomplexes keine direkten Beweise und auch die am intra- und interzellulären Transport beteiligten Wirtsfaktoren sind weitestgehend unbekannt (Revers *et al.*, 1999). Da das CP offensichtlich eine entscheidende Funktion sowohl bei der Ausbildung und Assemblierung des Transportkomplexes als auch beim plasmodesmalen Transfer der potyviralen Genome ausübt, würde die Identifizierung von CP-interagierenden Wirtspoteinen wichtige Hinweise über Komponenten des zellulären Virustransport von Potyviren und somit auch über endogene Transportmechanismen geben. Aus diesem Grund wurde das bereits zur Charakterisierung der MP17-vermittelten Resistenzeigenschaften eingesetzte, kompatible Potyvirus/Pflanze-System aus *Potato virus Y* (PVY) und *Nicotiana tabacum* (Herbers *et al.*, 1997; vgl. 3.1.1.5) ausgewählt, um CP-bindende Wirtsfaktoren zu identifizieren und ihre Rolle während der Infektion *in planta* zu untersuchen.

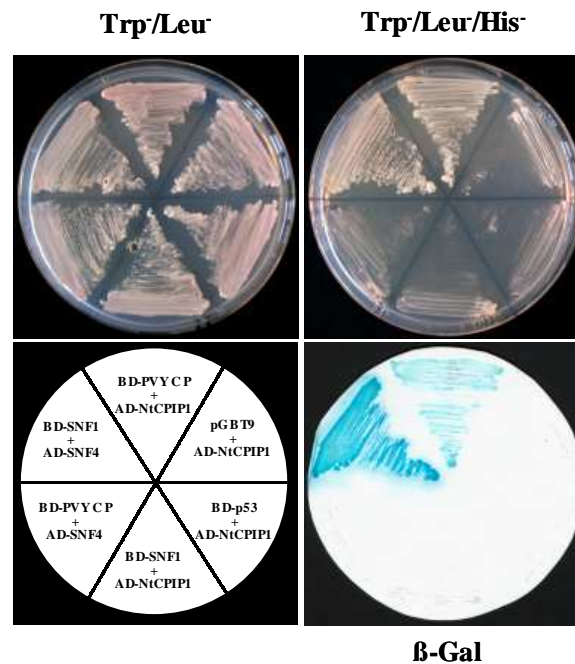
#### **3.2.1 Identifizierung eines PVY CP interagierenden Proteins aus Tabak (NtCPIP1) und Charakterisierung der Interaktion im Hefe Zwei-Hybrid System**

Zur Isolierung von PVY CP-interagierenden Tabakproteinen wurde das Hefe Zwei-Hybrid System (Fields und Song, 1989; zusammengefasst in Causier und Davies 2002) ausgewählt,

das zuvor bereits für die Charakterisierung der Interaktion verschiedener potyviralere Proteine (Hong *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997; Merits *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2001) sowie zur Identifizierung von pflanzlichen Interaktoren potyviralere Determinanten des Langstreckentransportes, VPg (Wittmann *et al.*, 1997) und HC-Pro (Anandalakshmi *et al.*, 2000), erfolgreich eingesetzt wurde. Darüber hinaus sind mit diesem experimentellen Ansatz für einige MPs pflanzliche Bindungspartner isoliert worden, wie beispielsweise für das TSWV-MP (Soellick *et al.*, 2000; van Bargaen *et al.*, 2001), CaMV-MP (Huang *et al.*, 2001); *Tomato mosaic virus* (ToMV)-MP (Matsushita *et al.*, 2001), *Cucumber mosaic virus* (CMV)-MP (Ham *et al.*, 1999) und *Tomato bushy stunt virus* (TBSV)-MP (Desvoyes *et al.*, 2002). Allerdings scheint der Erfolg des Systems sehr stark von den biochemischen Eigenschaften des MPs und/oder des putativen Interaktionspartners abzuhängen, sicherlich ein Grund dafür, dass bisher mit diesem Ansatz keine hydrophoben, membranständigen oder PD-assoziierten Rezeptoren identifiziert werden konnten.

### 3.2.1.1 Isolierung von NtCPIP1 und Verifizierung der Interaktion mit PVY CP

Zur Isolierung von PVY CP-interagierenden Proteinen mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid Systems wurde zunächst die kodierende cDNA über RT-PCR aus PVY<sup>N</sup> (N-Stamm)-infiziertem Blattmaterial (Feldisolat der Bundesanstalt für Kulturpflanzen Aschersleben; vgl. Herbers *et al.*, 1996a) amplifiziert. Dazu wurden spezifische PCR-Primer (D44 und D45, s. Anhang) von einer veröffentlichten PVY<sup>N</sup>-Sequenz (GenBank Accession-Nr. D00441, Basen 8573-9573) abgeleitet und mit *EcoRI*- (D44) sowie *SalI*-Schnittstellen (D45) versehen. Die RT-PCR erfolgte in einem gekoppelten Reverse-Transkription/cDNA-Amplifikations-Assay nach Standardprotokoll (Biomaster) und die Identität der amplifizierten cDNA wurde nach Subklonierung in den pGEM/T Vektor mittels Sequenzanalyse verifiziert (Sequenz I.4 im Anhang). Das *EcoRI/SalI*-Fragment wurde anschließend in offenem Leserahmen mit der GAL4-Bindungsdomäne in den Vektor pGBT9 (Clontech) kloniert und dieses als „Bait“-Plasmid (BD-PVY CP) zur Durchmusterung einer mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) fusionierten cDNA-Bank aus *Nicotiana tabacum source*-Blattmaterial eingesetzt. Aus etwa  $8 \times 10^7$  durchmusterten Hefe-Transformanten wurden 4 positive Kolonien identifiziert, die sowohl *HIS3*- als auch *lacZ*-Reportergergen Aktivität zeigten. Die entsprechenden AD/cDNA-Plasmide wurden aus den Hefezellen isoliert und die Spezifität der Interaktion über verschiedene Kotransformationen mit dem „Bait“-Plasmid bzw. unabhängigen Kontrollplasmiden (pBD-p53, pBD-SNF1, pAD-SNF4, pGBT9-Vektor) überprüft (Abb. 34).



**Abb. 34:** Spezifische Interaktion zwischen PVY CP und NtCPIP1 im Hefe Zwei-Hybrid System. Y190-Hefezellen wurden mit den angezeigten „Bait“- (BD-Fusionen oder leerer Vektor pGBT9) und „Prey“-Konstrukten (AD-Fusionen) transformiert (Abbildung links unten) und auf SD Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>-Medium als Nachweis für die Anwesenheit beider Plasmide angezogen (links oben). Nach Überimpfen auf SD Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Medium zeigten nur die Hefen mit BD-PVY CP und AD-NtCPIP1 bzw. mit BD-SNF1 und AD-SNF4 (Positivkontrolle) Wachstum, da durch spezifische Protein/Protein-Wechselwirkungen das *HIS3*-Reporter gen aktiviert wurde. Entsprechend wurde auch Aktivität des *lacZ*-Reporter gens (visualisiert durch  $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay,  $\beta$ -Gal) nur durch die Positivkontrolle und die spezifische Interaktion von PVY CP mit NtCPIP1 und nicht durch Kombinationen mit anderen Kontrollplasmiden induziert (rechts unten).

Die Sequenzanalyse zeigte, dass die 4 isolierten cDNAs für ein identisches Protein kodierten, das als „capsid protein interacting protein“, NtCPIP1, bezeichnet wurde. Dabei kodierte der längste mit GAL4-AD fusionierte ORF für 270 Aminosäuren, und der Vollängen cDNA-Klon wurde über die Durchmusterung einer Phagen cDNA-Bank aus *Nicotiana tabacum* (Herbers *et al.*, 1995) isoliert. Die aus dem cDNA-Klon abgeleitete NtCPIP1-Proteinsequenz bestand aus 306 Aminosäuren, wobei am N-terminalen Ende eine J-Domäne (Position 1-68) identifiziert werden konnte, die eine charakteristische Signatur für die Familie der DnaJ-Proteine darstellt. Datenbank-Vergleiche zeigten größte Homologie (max. 63,4% auf Proteinebene) zu verschiedenen DnaJ-ähnlichen Proteinen von *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-Nrn. AAD39315, AAD32885, AAF07844, AAD25656 und AAM67147). Darüber hinaus war eine hohe Identität zu einem DnaJ-ähnlichen Protein aus *Nicotiana tabacum* (NtDnaJ\_M541, 59,2%) sowie dessen Orthologen AtA39 (59,8%) aus *Arabidopsis thaliana* und Le19/8 (59,5%) aus *Lycopersicon esculentum* nachweisbar, die als pflanzliche

Interaktionspartner des TSWV-MP (NSm) identifiziert wurden (Soellick *et al.*, 2000; von Bargaen *et al.*, 2001).

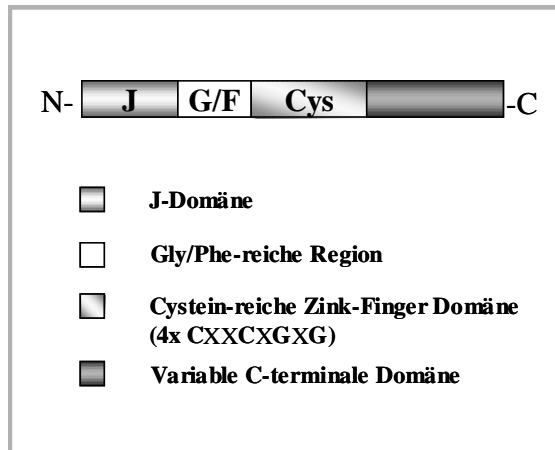
|         |   |     |
|---------|---|-----|
| NtCPIP1 | M G V D Y Y K I L K V S R N A S E E D L K K S Y K R L A M K W H P D K N - - S E | 38  |
| NtM541  | M G V D Y Y K V L G V D K N A T D D D L K K A Y R K L A M K W H P D K N P N N K | 40  |
| Le19-8  | M G V D Y Y K V L G V D K N A T D D D L K K A Y R K L A M K W H P D K N P Q N K | 40  |
| AtA39   | M G V D Y Y K V L Q V D R S A N D D D L K K A Y R K L A M K W H P D K N P N N K | 40  |
| NtCPIP1 | K E A E A K F K Q I S E A Y D V L S D P Q K R Q I Y D I Y G D E A L K S G Q F D | 78  |
| NtM541  | K A A E A K F K Q I S E A Y D V L S D S Q K R A V Y D Q Y G E D G L K G G V P P | 80  |
| Le19-8  | K E A E A K F K Q I S E A Y D V L S D S Q K K A V Y D Q Y G E E G L K G G V P P | 80  |
| AtA39   | K D A E A K F K Q I S E A Y D V L S D P Q K R A V Y D Q Y G E E G L K G N V P P | 80  |
| NtCPIP1 | P S S P M N G - - - - - N G R G - - - F K F D S R D A E D I F A E F F - - -     | 105 |
| NtM541  | P G A G G P G G G S P F F S T G E G P Q S F R F N T R S A D D I F A E F F G F S | 120 |
| Le19-8  | P G A G G P G A G S T Y F S T G D G P T S F R F N S R N A D D I F A E F F G F S | 120 |
| AtA39   | P N A A T S G - - A S Y F S T G D G S S S F R F N P R S A D D I F A E F F G F S | 118 |
| NtCPIP1 | - - - G G S D G - - - - - - - - - - - - - - - Y S R S P T G G T V R -           | 121 |
| NtM541  | S P F G G A G G - - R G P R F G G - M F G D D M F A S - F G E G G G G G A S -   | 155 |
| Le19-8  | T P Y G D G G G - - R G S R F G N - M F T D D I F A A S F G E G G G G G V P -   | 156 |
| AtA39   | T P F G G G G G G T G G Q R F A S R M F G D D M Y A S - F G E G A G G G G A M H | 157 |
| NtCPIP1 | - - - - - - - - - I R K P A P V E N K L P C S L E E L Y K G S K R K M K I S R   | 151 |
| NtM541  | - - - - - M Y Q S A P R K E A P I Q Q N L P C N L E D L Y K G T T K K M K I S R | 190 |
| Le19-8  | - - - - - M H S S V P R K E A P V Q Q N L P C N L E D L Y K G T T K K M K I S R | 191 |
| AtA39   | H H H H H H H H A A A R K V A P I E N K L P C S L E D L Y K G T T K K M K I S R | 197 |
| NtCPIP1 | I V L D V T G K P T T I E E V L A I H I K P G W K K G T K I T F P E K G N H E P | 191 |
| NtM541  | E V A D A S G K R M Q V E E I L T I N I K P G W K K G T K I T F Q E K G N E Q P | 230 |
| Le19-8  | E I A D S S G K R I - V Q E I L T I E I K P G W K K G T K I T F Q E K G N E Q P | 230 |
| AtA39   | E I V D V S G K A M Q V E E I L T I G V K P G W K K G T K I T F P E K G N E H P | 237 |
| NtCPIP1 | G A A P G D L I F V I D E K P H D V F K R D G N D L V I N Q K I S L V D A L S G | 231 |
| NtM541  | G V I P A D L V F I I D E K P H R V F S R D G N D L I V T Q K I S L V E A L T G | 270 |
| Le19-8  | G V I P A D L V F I I D E K P H K V F S R D G N D L I V T Q K I P L A E A L T G | 270 |
| AtA39   | G V I P A D L V F I I D E K P H P V F T R E G N D L I V T Q K V S L A D A L T G | 277 |
| NtCPIP1 | K I I N L A T L D G R E L T I P I T D V V K P G H E Q I I A D E G M P I S K E P | 271 |
| NtM541  | T T V Q L T T L D G R N L T I P V N S V I Q P N Y E H V V P G E G M P L P K D P | 310 |
| Le19-8  | T T V Q L T T L D G R N L T I P I N N V I Q P N Y E H I A P G E G M P L P K D P | 310 |
| AtA39   | Y T A N I A T L D G R T L T I P I T N V I H P E Y E E V V P K E G M P L Q K D Q | 317 |
| NtCPIP1 | G K K G N L R I K F E V K F P S R L S S D Q K L D I R R V L G R T V D           | 306 |
| NtM541  | T K K G N L R I K F D I K F P V R L T T T Q K A G I K E L L G S                 | 342 |
| Le19-8  | S K K G N L R I K F D I K F P A R P T V A Q K S G I K K L L G S                 | 342 |
| AtA39   | T K K G N L R I K F N I K F P A R L T A E Q K A G F K K L I G                   | 348 |

**Abb. 35:** Aminosäurevergleich von NtCPIP1 und DnaJ-ähnlichen Proteinen aus *Nicotiana tabacum* (NtM541, GenBank Acc.-Nr. AF191497), *Lycopersicon esculentum* (Le19-8, AJ295232) und *Arabidopsis thaliana* (AtA39, AL021749), die als interagierende Proteine des TSWV-MP (NSm) identifiziert wurden (Soellick *et al.*, 2000; von Bargaen *et al.*, 2001). Aminosäuren, die mit der Konsensussequenz übereinstimmen sind schwarz unterlegt und die J-Domäne von NtCPIP1 (Position 1-68) mit hellgrauem Balken angezeigt. Die in den NSm-interagierenden Proteinen identifizierten vier K-X-X-X-K-E/K Motive der Lysin-reichen Domänen sind in Boxen eingfasst. Die beiden grau unterlegten Motive sind dabei in der NtCPIP1-Sequenz vorhanden (Position 172-177 und 289-294), die schraffierten hingegen nicht. Aminosäurevergleich erfolgte mit der ClustalW-Methode im MegAlign-Programm (DNASStar Inc., Wisconsin, USA).

Diese NSm-interagierenden Proteine waren zuvor in einer Unterklasse der DnaJ-ähnlichen Proteine zusammengefasst worden (von Bargaen *et al.*, 2001), denn außer der gemeinsamen J-Domäne zeigten sie keine weiteren DnaJ-spezifischen Eigenschaften wie Cysteine-reiche Domänen, die als charakteristisch für DnaJ-Chaperone mit Funktionen bei der Hitzeschock-Antwort angesehen werden (Bukau und Horwich, 1998; Martinez-Yamout *et al.*, 2000; vgl. Abb. 36). Im Gegensatz dazu wurde für die Gruppe NSm-bindender Proteine vier Lysin-



reiche Domänen (K-X-X-X-K-E/K Motiv, Abb. 35) (von Bargen *et al.*, 2001) identifiziert, die in der NtCPIP1 Proteinsequenz allerdings durch 2 Motive nur unvollständig ausgebildet waren (Aminosäuren 172-177 und 289-294).

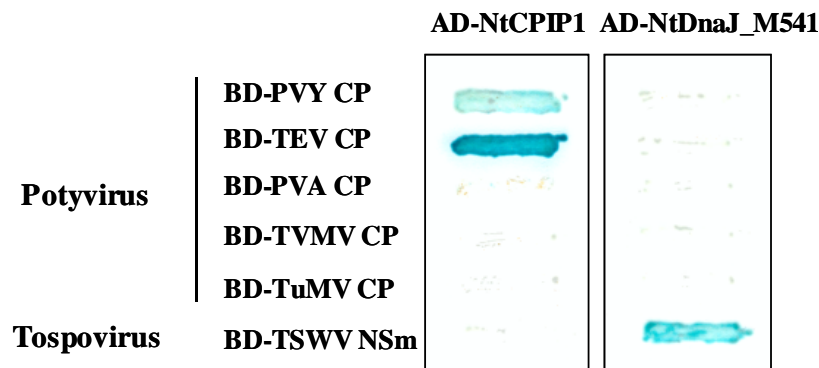


**Abb. 36:** Strukturelle Domänen des *E.coli* DnaJ-Proteins, die in eukaryotischen DnaJ-ähnlichen Proteinen der HSP40-Familie konserviert sind [modifiziert nach Kelley (1998) und Cyr *et al.* (1994)]. Das Vorhandensein einer J-Domäne von etwa 70 Aminosäuren (As) definiert das Protein als DnaJ Homolog. G/F zeigt einen Glycin- und Phenylalanin-reiche Linkerregion von etwa 35 As an. Die etwa 150 As große Cystein-reiche Zink-Finger Domäne enthält 4 Motive mit der Sequenz CXXCXGXG. Daran schließt sich eine variable C-terminale Domäne an.

### 3.2.1.2 Analysen zur Spezifität der Interaktion zwischen PVY CP und NtCPIP1

Um zu testen, ob NtCPIP1 auch mit weiteren potyviralen Capsid Proteinen interagieren kann, wurden die CP kodierenden cDNAs des TEV, *Potato virus A* (PVA), *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) und *Turnip mosaic virus* (TuMV) über PCR amplifiziert, wobei die Plasmide pTEV7D-GUS.HC (Dolja *et al.*, 1992; im Original von J.C. Carrington, Berkeley, USA; zur Verfügung gestellt von J. Hinrichs-Berger, Stuttgart), pXBS1 (von T.P. Pirone, Kentucky, USA), pUCNIb.CP (von J.-F. Laliberté, Québec, Kanada) und pQE-PVA CP (Merits *et al.*, 1998; von K. Mäkinen, Helsinki, Finnland) als Matrize eingesetzt wurden. Die Oligonukleotide (s. Anhang III.) wurden von den veröffentlichten Sequenzen [Genbank Acc.-Nrn. M15239 (*TEV CP*), X04083 (*TVMV CP*), D10601 (*TuMV CP*) und Y11427 (*PVA CP*)] abgeleitet, so dass *NdeI-SalI* (*TVMV CP*, *TuMV CP*, *PVA CP*) oder *EcoRI-BamHI* (*TEV-CP*) Schnittstellen eingefügt wurden. Die PCR-Fragmente wurden in den pCR-Blunt Vektor subkloniert und anschließend in den „Bait“-Vektor pGBKT7 (Clontech) ligiert. Als Kontrolle wurde ein weiteres PVY CP „Bait“-Konstrukt durch Insertion des *EcoRI-SalI* Fragmentes in den pGBKT7 Vektor erstellt. Darüber hinaus sollte auch das TSWV-MP (NSm) auf Interaktion mit NtCPIP1, sowie das NSm-interagierende DnaJ-ähnliche Protein (NtDnaJ\_M541) auf mögliche Bindung mit den potyviralen CPs getestet werden, wobei die entsprechenden Plasmide von T.R. Soellick (Köln) und J.-W. Kellmann (Rostock) zur

Verfügung gestellt wurden. Die Reporter-gen-Aktivierung nach Kotransformation der jeweiligen Plasmide zeigten neben PVY CP eine spezifische Interaktion von TEV CP und NtCPIP1, während PVA CP, TVMV CP und TuMV CP nicht interagierten (Abb. 37). Allerdings konnten weder die untersuchten potyviralen CPs an NtDnaJ\_M541 noch NSm an NtCPIP1 im Hefe Zwei-Hybrid System binden, was eine hohe Spezifität für die Interaktion der viralen Proteine mit Vertretern der DnaJ-ähnlichen Chaperone vermuten lässt.



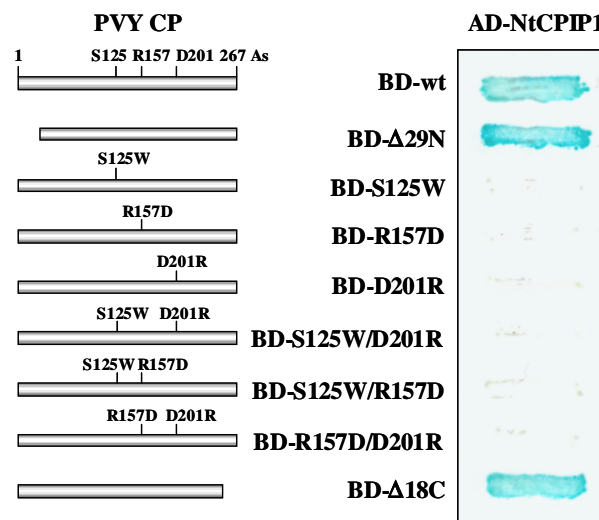
**Abb. 37:** Analyse der Protein/Protein-Interaktionen von NtCPIP1 und NtDnaJ\_M541 (Soellick *et al.*, 2000) mit potyviralen CPs (PVY, TEV, TVMV, TuMV) und dem TSWV NSm (Soellick *et al.*, 2000) über qualitative Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Kotransformation der angezeigten BD- und AD-fusionierten Plasmide in Y190-Zellen. Die Blaufärbung belegt die spezifische Interaktion von PVY CP und TEV CP mit NtCPIP1 sowie NSm und NtDnaJ\_M541.

### 3.2.1.3 Mutations- und Deletionsanalysen von PVY CP und NtCPIP1 zur Identifizierung essentieller Bindungsdomänen

Um zu analysieren welche Domänen von PVY CP für die Interaktion mit NtCPIP1 entscheidende Bedeutung haben, wurden in Analogie zu früheren Arbeiten (Dolja *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 1997) eine Reihe von PVY CP Mutanten hergestellt, die mit der GAL4-BD im pGBT9-Vektor fusioniert wurden. So wurden mittels PCR-Techniken Deletionen von 29 Aminosäuren (AS) am N-Terminus (PVY CP $\Delta$ 29N) und von 18 AS am C-Terminus (PVY CP $\Delta$ 18C) generiert sowie über Orts-gerichtete Mutagenese Einzel- und Doppel-Aminosäuresubstitutionen eingeführt. Die in diesen Mutanten substituierten Aminosäuren sind innerhalb der potyviralen CPs hochgradig konserviert (Dolja *et al.*, 1991) und hatten sowohl für die Assemblierung und den Zell-zu-Zell Transport eines infektiösen, mit dem *GUS*-Reporter gen versehenen TEV cDNA-Klones (Dolja *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1995), als auch für die plasmodesmale Ausbreitung mikroinjizierter rekombinanter BCMNV

und LMV CPs (Rojas *et al.*, 1997) essentielle Bedeutung. Die Deletionen des variablen N- und C-Terminus zeigten hingegen einen Effekt auf den Langstreckentransport des GUS-markierten TEV.

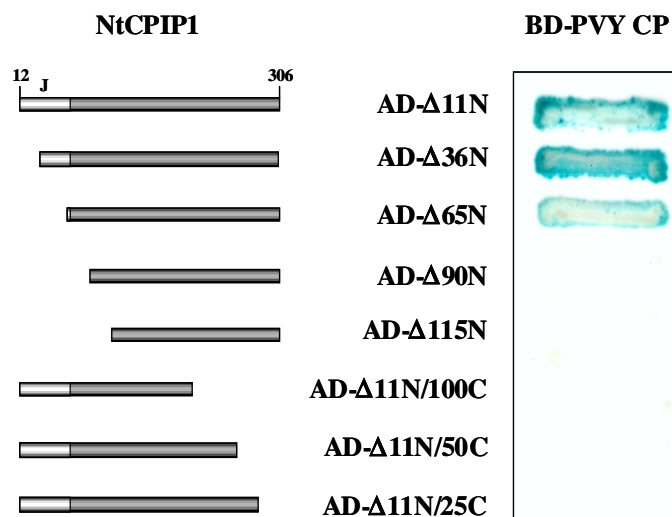
Hefe Zwei-Hybrid Analysen wurden mit den PVY CP Substitutionsmutanten S125W, R157W, D201R sowie S125W/R157D, S125W/D201R und R157/D201R durchgeführt (Abb. 38). Über Orts-gerichtete Mutagenese waren zuvor die Mutationen in das pGEM/T-PVY CP Konstrukt (3.2.1.1) eingeführt und die mutagenisierten CP-Fragmente nach Sequenzanalyse in den pGBT9-Vektor ligiert worden. Wie in Abb. 38 dargestellt, wurde die Bindung zwischen PVY CP und NtCPIP1 nicht durch die N- und C-terminalen Deletionen beeinflusst. Hingegen wurde die Expression des *lacZ*-Reportergens sowohl durch alle drei Einzelsubstitutionen als auch durch alle Kombinationen der Doppelsubstitutionen unterbunden. Daraus lässt sich eine essentielle Bedeutung der zentralen Domäne für die Interaktion mit NtCPIP1 ableiten.



**Abb 38:** Interaktion von NtCPIP1 mit verschiedenen Deletions- und Aminosäuresubstitutions-Mutanten von PVY CP im Vergleich zur unveränderten Variante (wt). Y190-Zellen wurden mit den angezeigten „Bait“-Plasmiden (BD) und AD-NtCPIP1 kotransformiert und *lacZ* Reportergen-Expression qualitativ über ein  $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay bestimmt.

NtCPIP1 gehört zur Familie der DnaJ (HSP40) Proteine, die als Co-Chaperone und Schlüsselregulatoren von HSP70-Proteinen an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind (zusammengefasst in Buckau und Horwich, 1998). Die regulatorische Funktion der DnaJ-Proteine wird dabei durch direkte Interaktion der J-Domäne mit HSP70 vermittelt, wobei deren Substrataffinität über Stimulierung der ATP-Hydrolyse verändert wird (Kelley, 1998). Um zu untersuchen welche Domäne von NtCPIP1 für die Interaktion mit PVY CP verantwortlich ist, wurden verschiedene Deletionskonstrukte von NtCPIP1 im Zwei-Hybrid

System getestet. Zusätzlich zu denen aus der Zwei-Hybrid cDNA-Bank isolierten, N-terminal verkürzten Varianten (NtCPIP1 $\Delta$ 11N, NtCPIP1 $\Delta$ 36N) wurden dafür N-terminale Deletionen von 65 ( $\Delta$ 65N), 90 ( $\Delta$ 90N) und 115 ( $\Delta$ 115N) Aminosäuren hergestellt sowie verschiedene C-terminale Deletionen von 25 ( $\Delta$ 11N/ $\Delta$ 25C), 50 ( $\Delta$ 11N/ $\Delta$ 50C), und 100 ( $\Delta$ 11N/ $\Delta$ 100C) Aminosäuren generiert, denen jeweils auch die 11 Aminosäuren am N-Terminus fehlten (Abb. 39). Der qualitative  $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay nach Kotransformation der Deletionskonstrukte mit dem PVY CP „Bait“-Konstrukt in Hefe ergab, dass die *lacZ*-Aktivität durch Deletion der J-Domäne nicht wesentlich verändert war, während alle C-terminalen Deletionen zu einer vollständigen Aufhebung der Interaktion führten.



**Abb. 39:** Interaktion von PVY CP mit verschiedenen Deletionsmutanten von NtCPIP1. Y190-Zellen wurden mit den angezeigten „Prey“-Plasmiden (AD) und BD-PVY CP kotransformiert und die *lacZ*-Expression über ein  $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay bestimmt.

### 3.2.2 Verifizierung der *in planta* Bedeutung der Interaktion durch RNA-Silencing von NtCPIP1 und PVY Infektion transgener Pflanzen

Die Identifizierung eines PVY CP-bindenden Wirtsfaktors aus *Nicotiana tabacum* und die nachgewiesene Spezifität der Interaktion im Hefe Zwei-Hybrid System ist nicht ausreichend, um eine essentielle Rolle von NtCPIP1 und somit die Rekrutierung pflanzlicher Chaperone für die potyvirale Infektion zu postulieren. Notwendig wäre der funktionale Nachweis *in planta*, beispielsweise über die Modulation der Genexpression von NtCPIP1 und der damit verbundenen Änderung in der Suszeptibilität gegenüber der Infektion mit PVY. Aus diesem

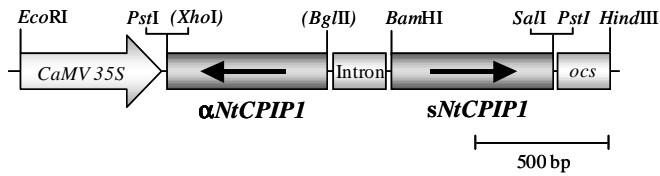
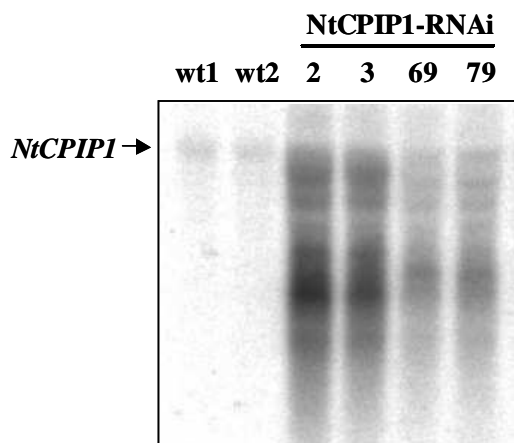
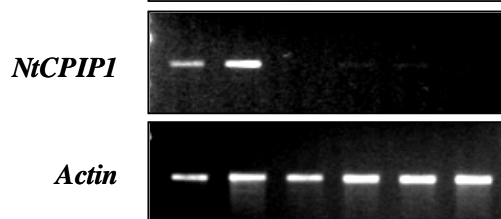
Grund sollten über ein RNA-Silencing (RNAi) Ansatz doppelsträngige *NtCPIP1*-Fragmente in Form von selbst-komplementärer „hairpin“ (hp) RNA (Smith *et al.*, 2000, Wesley *et al.*, 2001) in transgenen Tabakpflanzen exprimiert und somit die endogene Genexpression von *NtCPIP1* gehemmt werden. Nach Infektion dieser Pflanzen mit PVY würde man eine erhöhte Resistenz infolge verminderter Gehalte des CP-bindenden Wirtsfaktors postulieren.

### 3.2.2.1 Konstrukt zum RNA-Silencing (RNAi) von *NtCPIP1* in Tabak

Zur Erzeugung eines hpRNA-Konstruktes von *NtCPIP1* wurde über PCR ein 616 bp großes, *Bam*HI/*Sal*I gelinkertes Fragment (Basen 721-1336 der *NtCPIP1* cDNA, s. Anhang I.1) unter Verwendung der Primer D153 und D154 amplifiziert, in den pCR-Blunt Vektor subkloniert und sukzessive in sense (s) und antisense ( $\alpha$ ) Orientierung in den zunächst *Bam*HI/*Sal*I, danach *Bgl*II/*Xho*I geöffneten pUC-RNAi Vektor (von Chencai Chu, früher Gatersleben) inseriert. Dadurch wurde eine RNAi-Kassette aus komplementären *NtCPIP1*-Fragmenten erhalten, die durch ein kurzes Intron (199 bp) der GA20-Oxidase aus *Solanum tuberosum* (StGA20oxIN, von S. Biemelt, unveröffentlicht) getrennt waren. Die gesamte Kassette bestehend aus  $\alpha$ *NtCPIP1*-StGA20oxIn-s*NtCPIP1* wurde schließlich über *Pst*I aus dem pUC-RNAi isoliert, in einen *Sbf*I geschnittenen BinAR ligiert und so das Plasmid pBin*NtCPIP1*-RNAi erhalten (Abb. 40A).

### 3.2.2.2 Verifizierung des Silencing von *NtCPIP1* durch *Northern*-Analyse und RT-PCR

Das hpRNA-Konstrukt pBin*NtCPIP1*-RNAi wurde über *Agrobacterien*-vermittelten Gentransfer in Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. Varietät Samsun NN) transformiert und 81 Kanamycin-resistente primäre Transformanden auf Reduktion des *NtCPIP1*-Transkriptes über *Northern*-Analyse getestet. Bei 24 Pflanzen konnte ein Hybridisierungssignal detektiert werden, das als charakteristischer „Schmier“ über die RNA-Spur auftrat und eine Degradierung des Transgens andeutete (Abb 40B). Die Reduktion des endogenen *NtCPIP1* ließ sich allerdings aufgrund der niedrigen Expression in den Kontrollen nicht nachweisen, so dass 4 Linien ausgewählt und über semiquantitative RT-PCR unter Verwendung der *NtCPIP1*-spezifischen Primer D172 und D154 sowie der Actin-spezifischen Kontrollprimer D202 und D203 auf Akkumulation von *NtCPIP1*-Transkripten analysiert wurden.

**(A) pBinNtCPIP1-RNAi****(B)****(C)**

**Abb. 40:** Expressionsanalyse NtCPIP1-RNAi transgener Linien.

(A) Schematische Darstellung der binären Expressionskassette pBinNtCPIP1-RNAi, die zum RNA-Silencing von NtCPIP1 in Tabakpflanzen eingesetzt wurde.

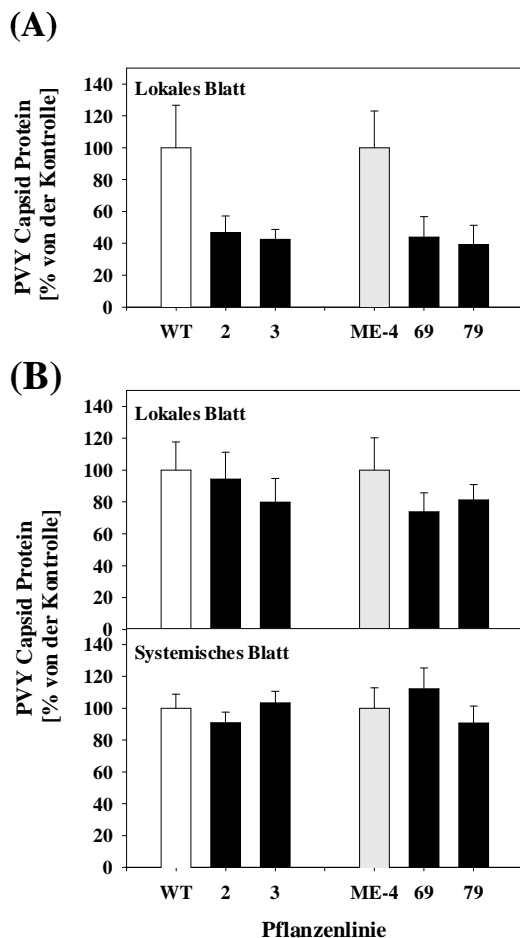
(B) Northern-Analyse NtCPIP1-spezifischer Transkripte. Gesamt-RNA wurde von Wildtyp-Pflanzen (wt1, wt2) und den transgenen Linien NtCPIP1-RNAi-2, -3, -69 und -79 isoliert und 30 µg RNA pro Spur geladen. Die Hybridisierung des Northern Blot erfolgte anschließend mit dem NtCPIP1 cDNA-Fragment. Das endogene NtCPIP1-Signal in der WT-Kontrolle ist mit einem Pfeil markiert. Die transgenen Linien zeigen einen charakteristischen „Schmier“, der auf den RNAi-induzierten Abbau des Transgens hindeutet.

(C) Verifizierung des RNA-Silencing von NtCPIP1 über RT-PCR unter Verwendung NtCPIP1-spezifischer Primer D172 und D154 sowie Actin-spezifischer Primer D202 und D203. Die cDNA-Amplifizierung nach Reverser Transkription von Gesamt-RNA aus den transgenen Linien erfolgte im linearen PCR-Bereich mit 32 Zyklen für NtCPIP1 und 25 Zyklen für Actin, wobei 1/5 (NtCPIP1) bzw. 1/10 (Actin) des PCR-Ansatzes aufgetragen wurden.

Wie in Abb. 40C dargestellt, zeigten die als NtCPIP1-RNAi-2, -3, -69 und -79 bezeichneten Linien im linearen PCR-Bereich (32 Zyklen) im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrolle nur ein sehr schwach zu detektierendes PCR-Produkt von NtCPIP1, während in der Kontrollreaktion Actin (25 Zyklen) zu vergleichbaren Mengen amplifiziert wurde. Trotz des RNA-Silencing von NtCPIP1 erwiesen sich die ausgewählten Linien sowohl gegenüber nicht-transformierten Wildtyp-Pflanzen (WT) als auch gegenüber einer transgenen Kontrolle, die das GUS-Reportergen unter Kontrolle eines Mesophyll-spezifischen Promotors exprimiert (ME-4, Ebneht, 1996), als phänotypisch unauffällig.

### 3.2.2.3 PVY-Infektion von NtCPIP1-RNAi transgenen Tabaklinien

Um den Effekt der reduzierten Expression von NtCPIP1 auf die Akkumulation und die systemische Ausbreitung von PVY zu untersuchen, wurde die Kanamycin-resistente T1-Nachkommenschaft der ausgewählten transgenen Linien mit PVY infiziert. Um Positionseffekte im Gewächshaus als Folge der großen Zahl an Pflanzen auszuschließen, wurden zwei Infektionsexperimente parallel durchgeführt. Dabei wurden die transgenen Linien NtCPIP1-RNAi-2 ( $n=49$ ) und NtCPIP1-RNAi-3 ( $n=50$ ) mit SNN Wildtyp-Pflanzen ( $n=47$ ) verglichen, während NtCPIP1-RNAi-69 ( $n=25$ ) und NtCPIP1-RNAi-79 ( $n=25$ ) im Vergleich zu der transgenen Kontrolle ME4 ( $n=23$ ) analysiert wurde. Innerhalb der Pflanzensets wurden die transgenen Linien mit den jeweiligen Kontrollen randomisiert und PVY CP-Gehalte 4 Tage nach mechanischer Inokulation im lokalen (inokulierten) und 6 Tage nach Infektion im lokalen und systemischen Blatt (5. Blatt über dem inokulierten) mittels ELISA (Herbers *et al.*, 1996a) bestimmt.



**Abb. 41:** PVY-Infektion NtCPIP1-RNAi transgener Linien. PVY CP-Gehalte wurden (A) 4 Tage nach Infektion im lokalen (inokulierten) und (B) 6 Tage nach Infektion im lokalen und systemischen Blatt in den Linien NtCPIP1-RNAi-2 ( $n=49$ ) und NtCPIP1-RNAi-3 ( $n=50$ ) im Vergleich zu nicht-transformierten Wildtyp-Kontrollen (WT) und NtCPIP1-RNAi-69 ( $n=25$ ) sowie NtCPIP1-RNAi-79 ( $n=25$ ) im Vergleich zu der transgenen Kontrolle ME-4 ( $n=23$ ) bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler und sind in Prozent der Kontrollen angegeben.

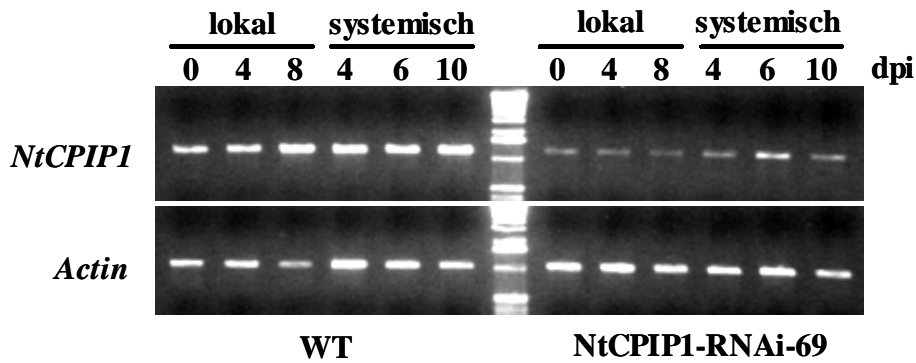
Wie in Abb. 41 dargestellt, zeigte sich 4 Tage nach Infektion die Virusakkumulation deutlich um 53,4% und 57,5% in den lokalen Blättern der Linien NtCPIP1-RNAi-2 und NtCPIP1-RNAi-3 gegenüber den WT-Pflanzen sowie um 56,0% und 60,1% in den Linien NtCPIP1-RNAi-69 ( $n=25$ ) und NtCPIP1-RNAi-79 ( $n=25$ ) im Vergleich zu der transgenen Kontrolle ME-4 reduziert. Allerdings war 6 Tage nach Infektion dieser Effekt fast überkommen und führte darüber hinaus nicht zu einer Beeinflussung der systemischen Virusausbreitung wie an den vergleichbaren Virustitern in den systemischen Blättern gegenüber den Kontrolle abzulesen war. Dieser offensichtlich spezifische Effekt des NtCPIP1-Silencing auf die Virusmultiplikation zu einem frühen Zeitpunkt im lokalen Blatt wurde in einem weiteren unabhängigen Experiment bestätigt, bei dem eine signifikante Reduktion des Virusgehaltes um 59,3% und 65,2% in den Linien NtCPIP1-RNAi-2 ( $n=44$ ) und NtCPIP1-RNAi-3 ( $n=50$ ) im Vergleich zu der transgenen Kontrolle ME-4 ( $n=50$ ) bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt).

Als mögliche Ursachen für diese transiente Reduktion der PVY-Gehalte in lokalen Blättern 4 Tage nach Infektion sind dabei (i) die nicht ausreichende Hemmung von NtCPIP1, (ii) die Aufhebung des NtCPIP1-Silencing durch die Aktivität Virus-kodierter Suppressoren, oder (iii) das Vorhandensein weiterer Isoformen von NtCPIP1 vorstellbar .

#### 3.2.2.4 Analyse der Stabilität des RNA-Silencing nach PVY Infektion

Im Hinblick auf eine mögliche Reversion des Silencing von NtCPIP1 während der Virusinfektion konnte zuvor die multifunktionale „Helper-component“ Proteinase (HC-Pro) von PVY als effizienter Silencing-Suppressor beschrieben werden (Brigneti *et al.*, 1998). Entsprechend führte die PVY-Infektion von transgenen Tabakpflanzen, die durch Expression eines CP-spezifischen Transgens resistent gegenüber PVA waren, zur Aufhebung dieser Silencing-basierten Resistenz (Savenkov und Valkonen, 2001a). Um die Hypothese zu testen, dass das NtCPIP1-Silencing durch akkumulierendes HC-Pro Protein während der PVY-Infektion überkommen wird, wurden transgene Pflanzen der Linie NtCPIP1-RNAi-69 und WT-Pflanzen mit PVY infiziert und die NtCPIP1-Expression im inokulierten Blatt vor und 4 bzw. 8 Tage nach Infektion sowie im systemischen Blatt 4, 6, und 10 Tage nach Infektion über RT-PCR bestimmt. Dabei zeigten sich zu allen Zeitpunkten die *NtCPIP1*-Signale deutlich gegenüber der WT-Kontrolle reduziert, so dass eine PVY-vermittelte Reversion des Silencing als Ursache für die eingeschränkte Resistenz wenig wahrscheinlich erscheint (Abb. 42).



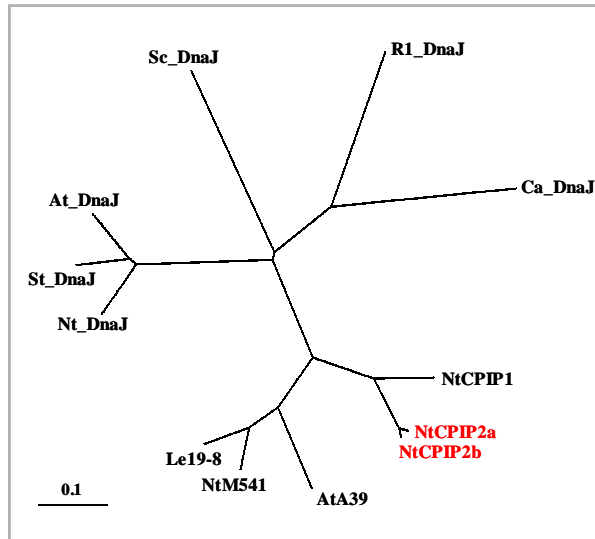


**Abb. 42:** Verifizierung der Stabilität des Silencing von NtCPIP1 in lokalen und systemischen Blättern nach PVY Infektion über RT-PCR unter Verwendung *NtCPIP1*-spezifischer Primer D172 und D154 sowie *Actin*-spezifischer Primer D202 und D203. Die cDNA-Amplifizierung nach Reverser Transkription von Gesamt-RNA aus der transgenen Linie NtCPIP1-RNAi-69 sowie WT-Kontrollen erfolgte im linearen PCR-Bereich mit 35 Zyklen für *NtCPIP1* und 25 Zyklen für *Actin*. Dargestellt sind die PCR-Produkte von *NtCPIP1* und *Actin* vor (0) und 4, 8 Tage nach PVY-Infektion (dpi) im lokal infizierten Blatt und 4, 6 sowie 10 dpi im systemischen Blatt.

Es fällt allerdings auf, dass nach PCR-Amplifikation mit 35 Zyklen deutlich ein PCR-Produkt von NtCPIP1 zu detektieren ist, das RNAi-vermittelte Silencing demnach in den transgenen Linien nicht zu einer vollständig Repression des endogenen NtCPIP1 geführt hatte.

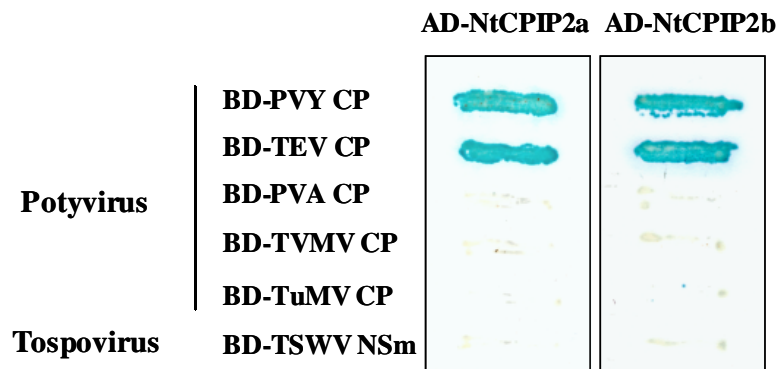
### 3.2.2.5 Analyse PVY CP-bindender Isoformen von NtCPIP1

Eine alternative Erklärung für den transienten und lokalen Effekt des NtCPIP1-Silencing auf die PVY-Akkumulation könnte das Vorhandensein von NtCPIP1-Isoformen sein, die auf ähnliche Weise wie NtCPIP1 mit PVY CP interagieren und daher möglicherweise den Verlust von NtCPIP1 kompensieren können. Aus diesem Grund wurden cDNA-Klone, die zusätzlich zu dem *NtCPIP1* Gen bei der Durchmusterung der Phagen cDNA-Bank (vgl. 3.1.1.1) isoliert wurden, auf Interaktion mit potyviralen CPs im Hefe Zwei-Hybrid System getestet. Der Sequenzvergleich zeigte, dass zwei weitere Klone identifiziert wurden, die deutlich verschieden von NtCPIP1, aber untereinander sehr ähnlich waren, und folglich als NtCPIP2a und NtCPIP2b bezeichnet wurden (Sequenzen s. Anhang I.2 und I.3). Auf Proteinebene war NtCPIP1 zu 81,3% und 82,6% identisch mit NtCPIP2a bzw. NtCPIP2b, während NtCPIP2a und NtCPIP2b zu 97,4% homolog waren. Abb. 43 zeigt die phylogenetische Einordnung der beiden Proteine (NtCPIP2a/b) im Vergleich zu der postulierten Unterklasse der TSWV NSm-interagierenden DnaJ-ähnlichen Proteine sowie DnaJ-ähnlichen Proteinen aus anderen Organismen, denen eine Cystein-reiche Domäne gemeinsam ist.



**Abb. 43:** Phylogenetische Einordnung von NtCPIP2a und 2b (rot) im Vergleich zu NtCPIP1, NSm-interagierenden Proteinen NtM541, Le19-8 und AtA39 (von Bargen *et al.*, 2001) sowie DnaJ-Proteinen aus verschiedenen Organismen. Ca\_DnaJ, Hitzeschockprotein mit Beteiligung an DnaK und GroEL Chaperon-Aktivität in *Clostridium acetobutylicum* (GenBank Acc.-Nr P30725); R1\_DnaJ, Protein mit Funktion bei der Symbiose zwischen *Rhizobium leguminosarum* und *Phaseolus vulgaris* (Y14649); Sc\_DnaJ, Protein aus Hefe, das am Proteinimport in Mitochondrien und ER beteiligt ist (NP\_014335); St\_DnaJ, während der Knolleninduktion in *Solanum tuberosum* und Blühinduktion in *Nicotiana tabacum* induziertes Gen (T07371); At\_DnaJ, uncharakterisiertes DnaJ-Protein aus *A. thaliana* (T49127). Phylogenetischer Baum wurde mit dem TreeView Programm erstellt.

In Analogie zu dem im Zwei-Hybrid System isolierten, N-terminal um 11 Aminosäuren deletierten *NtCPIP1*-Klon, wurden entsprechende GAL4 BD-fusionierte „Bait“-Konstrukte von NtCPIP2a und NtCPIP2b erstellt und mit den verschiedenen potyviralen CPs und TSWV MP in den Hefe-Reporterstamm Y190 kotransformiert. Wie in Abb. 44 dargestellt, belegte die *lacZ*-Reportergen-Aktivität jeweils die Interaktion von NtCPIP2a und NtCPIP2b mit PVY CP und TEV CP, nicht aber mit PVA CP, TVMV CP, TuMV CP sowie TSWV NSm. Die Isoformen zeigen also eine vergleichbare Spezifität der Interaktion im Hefe Zwei-Hybrid System wie NtCPIP1 und könnten damit möglicherweise den Verlust von NtCPIP1 in den transgenen Pflanzen kompensiert haben.



**Abb. 44:** Analyse der Protein/Protein-Interaktionen von NtCPIP2a und NtCPIP2b mit potyviralen CPs (PVY, TEV, TVMV, TuMV) und dem TSWV-MP NSm (Soellick *et al.*, 2000) über qualitative Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Kotransformation der angezeigten BD- und AD-fusionierten Plasmide in Y190 Zellen. Die Blaufärbung belegt die spezifische Interaktion von PVY CP und TEV CP mit NtCPIP2a und NtCPIP2b.

### 3.3 Funktionelle Analyse des *SXD1* (*sucrose export deficient 1*) Proteins in transgenen Kartoffelpflanzen

Die *sxd1*-Mutante in Mais wurde lange Zeit als einzige Transportmutante mit spezifischem Defekt in einer PD-Komponente betrachtet. Dies beruhte auf der beobachteten *source*-spezifischen Kohlenhydratakkumulation in Kombination mit strukturellen Veränderungen der PDs zwischen Bündelscheide und Phloemparenchym, was eine Inhibierung des symplastischen Transportweges in das Leitgewebe und damit der Phloembeladung nahe legte (Russin *et al.*, 1996; Botha *et al.*, 2000). Die Isolierung des *sxd1*-Locus ergab allerdings, dass das *SXD1*-Gen ein neuartiges Protein mit plastidärer Lokalisation kodierte. Daher wurde für *SXD1* zunächst eine indirekte Signalfunktion bei der Ausbildung Bündelscheiden-spezifischer PDs während des *sink/source*-Übergangs postuliert (Provencher *et al.*, 2001). Überraschenderweise zeigte jedoch das kürzlich in einer Vitamin E-defizienten *Arabidopsis*-Mutante identifizierte Gen für die Tocopherol Cyclase (*VTE1*) eine hohe Homologie zu *SXD1* (Porfirova *et al.*, 2002), und basierend auf Datenbank-Analysen wurde vermutet, dass es sich bei *SXD1/VTE1* um Orthologe handelt. Daraus ergibt sich zunächst die Möglichkeit, dass entweder Vitamin E einen Einfluss auf die plasmodesmale Struktur ausübt oder *SXD1/VTE1* eine duale Funktion besitzt. Alternativ wäre vorstellbar, dass die beiden Proteine zwar strukturhomolog, aber nicht funktionshomolog sind. Da weder in der Mais- noch in der *Arabidopsis*-Mutante PDs und Vitamin E-Gehalte parallel untersucht wurden, sollte über die funktionelle Analyse eines *SXD1*-Orthologs aus Kartoffeln überprüft werden, ob *VTE/SXD1* gleichermaßen für die Ausbildung funktionaler PDs und die Biosynthese von Tocopherolen verantwortlich ist.

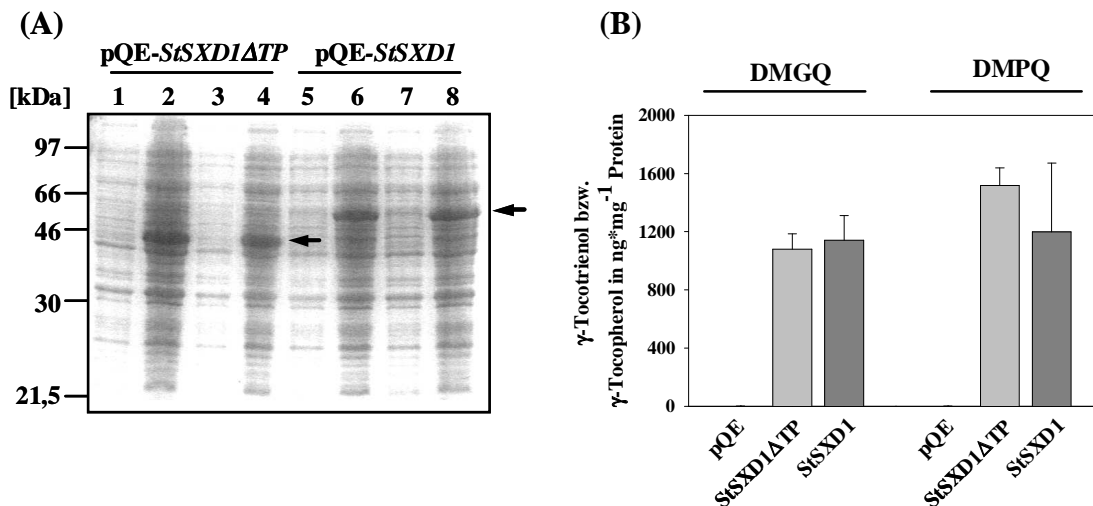
#### 3.3.1 Klonierung eines orthologen *SXD1*-Gens aus *Solanum tuberosum* und Verifizierung der Enzymaktivität *in vitro*

Die Durchmusterung translaterter EST-Datenbanken (tBlastn, Altschul *et al.*, 1990) mit der *SXD1*-Sequenz aus Mais (GenBank Acc.-Nr. AF302187) und *Arabidopsis* (Acc.-Nr. AF302188) führte zur Identifizierung eines homologen EST aus ausgewachsenen Kartoffelknollen (GenBank Acc.-Nr. BF460070). Es wurden 5'- und 3'-Primer von der 765 bp großen EST-Sequenz abgeleitet (D184 und D185) und das entsprechende cDNA-Fragment mittels RT-PCR aus Blattmaterial von *Solanum tuberosum* L. Varietät Solara amplifiziert. Nach Verifizierung der Sequenz wurden unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide

(*StSXD1*-5'RACE; Basen 148-177; *StSXD1*-3'RACE Basen 556-585 der EST-Sequenz) und dem „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit“ 5'- und 3'-RACE Fragmente erhalten, und nach Subklonierung in den pCR2.1 Vektor sequenziert. Aus den Sequenzdaten konnten schließlich Primer abgeleitet werden (D278, D279; s. Anhang III.), mit denen ein cDNA-Klon amplifiziert wurde, der die gesamte kodierende Region umfasste (Sequenz s. Anhang I.5). Dabei ließ sich aus der cDNA ein Protein von 501 Aminosäuren (*StSXD1*) ableiten, das zu 61,5% und 62,4% identisch mit den Orthologen aus *Arabidopsis* (*AtSXD1*) und Mais (*ZmSXD1*) war und darüber hinaus Homologie zu Proteinen von photosynthetischen Mikroorganismen wie *Trichodesmium erythraeum* (*TeSXD1*, GenBank Acc.-Nr. ZP\_00073283, 50,8% Identität), *Nostoc sp.* (*NoSXD1*, Acc.-Nr. BAB77769, 49,6% Identität) und *Synechocystis sp.* (*SySXD1*, Acc.-Nr. BAA17775; 34,4% Identität) zeigte. Der Aminosäurevergleich der Proteinsequenzen ist im Abschnitt II des Anhangs dargestellt.

Um zu überprüfen, ob das *StSXD1*-Gen, wie zuvor für *AtSXD1/VTE1* demonstriert, tatsächlich eine funktionale Tocopherol Cyclase kodiert, sollte *StSXD1* zunächst in *E. coli* exprimiert und die Enzymaktivität des rekombinanten Proteins bestimmt werden. Dazu wurden sowohl die gesamte kodierende Region des *StSXD1*-Gens (Basen 52-1556 des cDNA-Klons, vgl. Anhang I.5) als auch ein verkürztes cDNA-Fragment (Basen 319-1556), bei dem die 5'-Sequenz für das postulierte plastidäre Transitpeptid (TP) deletiert wurde (*StSXD1ΔTP*), mit den Primern D292/D291 (*StSXD1*) bzw. D290/D291 (*StSXD1ΔTP*) über PCR amplifiziert und in die *Bam*HI- und *Sal*I-Schnittstellen des pQE11-Expressionsvektors ligiert. Die erhaltenen Plasmide wurden in *E. coli* M15 (pREP4)-Zellen transformiert und die Expression des rekombinanten Proteins 4 Stunden nach IPTG-Induktion über SDS-PAGE verifiziert. Abbildung 45A zeigt, dass rekombinantes Protein in der erwarteten Größe von ~56 kDa für das Gesamtprotein und von ~46 kDa für *StSXD1ΔTP* in *E. coli* exprimiert wurde.

Für die Aktivitätsmessungen wurden Bakterienzellen 3 h nach Induktion über Sonifikation aufgeschlossen und Tocopherol Cyclase-Aktivität im Rohextrakt mit den Substraten 2,3-Dimethyl-5-geranylgeranyl-1,4-hydroquinone (DMGQ) und 2,3-Dimethyl-5-phytyl-1,4-hydroquinone (DMPQ) über die Bildung von  $\gamma$ -Tocotrienol und  $\gamma$ -Tocopherol bestimmt (Porfirova *et al.*, 2002). Wie in Abb. 45B dargestellt, konnte eine hohe Cyclase-Aktivität mit beiden Substraten festgestellt werden, wobei das N-terminale Transitpeptid keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hatte. Die Spezifität der Reaktionen wurde durch Analysen mit *E. coli* Zellen verifiziert, die den leeren Vektor (pQE11) exprimierten und keine nennenswerte Umsetzung der Substrate zu  $\gamma$ -Tocotrienol und  $\gamma$ -Tocopherol zeigten.



**Abb 45:** Tocopherol Cyclase-Aktivität von StSXD1 nach heterologer Expression in *E.coli*. **(A)** Coomassie-Färbung von Proteinen im Rohextrakt von rekombinanten *E.coli* Zellen vor (Spur 1, 3, 5, 7) und 4 Stunden nach (Spur 2, 4, 6, 8) IPTG-Induktion. Dargestellt sind jeweils zwei unabhängige Proteinexpressionen des „reifen“ Proteins ohne Transitpeptid (StSXD1ΔTP, ~46 kDa) sowie des Gesamtproteins (StSXD1, ~56 kDa). **(B)** Tocopherol Cyclase-Assay des rekombinanten StSXD1ΔTP- und StSXD1-Proteins im *E. coli* Rohextrakt 3 Stunden nach Induktion unter Verwendung der Substrate DMGQ und DMPQ. Die Produkte,  $\gamma$ -Tocotrienol und  $\gamma$ -Tocopherol wurden mittels Fluoreszenz-HPLC quantifiziert. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Induktionsexperimenten. *E. coli* Zellen die den leeren Vektor pQE11 exprimierten dienten dabei als Kontrolle und akkumulierten weniger als 2 ng  $\gamma$ -Tocotrienol  $\text{mg}^{-1}$  Protein mit DMGQ als Substrat bzw. weniger als 1 ng  $\gamma$ -Tocopherol  $\text{mg}^{-1}$  Protein mit DMPQ als Substrat. [Daten zu (B) von Dr. Michael Geiger nach der Methode in Porfirova *et al.* (2002) und Geiger *et al.* (2001), WO 02/00901].

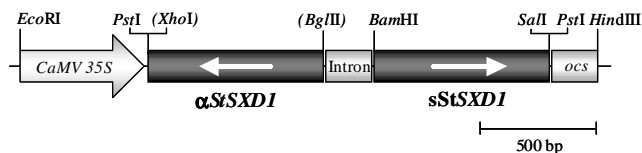
Diese Ergebnisse gaben einen eindeutigen Hinweis, dass das *SXD1*-Ortholog aus Kartoffel wie das *Arabidopsis VTE1/SXD1*-Gen eine funktionale Tocopherol Cyclase kodiert, die an der Synthese sowohl von Tocopherolen als auch Tocotrienolen beteiligt ist.

### 3.3.2 RNA-Silencing (RNAi) von *StSXD1* in Kartoffeln und Charakterisierung transgener Linien

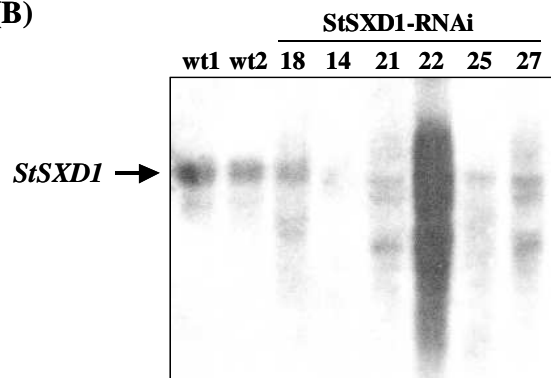
Um die funktionelle Rolle von StSXD1 *in planta* zu untersuchen, sollte dessen endogene Aktivität über RNA-Silencing in transgenen Kartoffelpflanzen reprimiert werden. Zur Erzeugung eines hpRNA-Konstruktes wurde das *Bam*HI/*Sal*I-gelinkerte, über PCR amplifizierte EST-Fragment (765 bp; Basen 503-1268 des *StSXD1* cDNA-Klons, s. Anhang I.5) in sense (s) und antisense ( $\alpha$ ) Orientierung in den als pUC-RNAi bezeichneten Vektor (vgl. 3.2.2.1) ligiert, und anschließend die durch ein Intron (199 bp der GA20-Oxidase aus *Solanum tuberosum*) getrennten komplementären *StSXD1*-Fragmente in pBinAR ligiert. Das erhaltene binäre hpRNA-Konstrukt pBinStSXD1-RNAi (Abb. 46A) wurde über *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L. Varietät

Solara) transformiert und 28 Kanamycin-resistente Primärtransformanten erhalten, die zunächst über *Northern*-Analyse auf *StSXD1*-Silencing getestet wurden. Es konnten 5 Pflanzen identifiziert werden, die eine deutlich verminderte Akkumulation von endogenen *StSXD1*-Transkripten bzw. eine auffällige Degradierung des Transgen zeigten (Abb. 46B).

**(A) pBinStSXD1-RNAi**



**(B)**

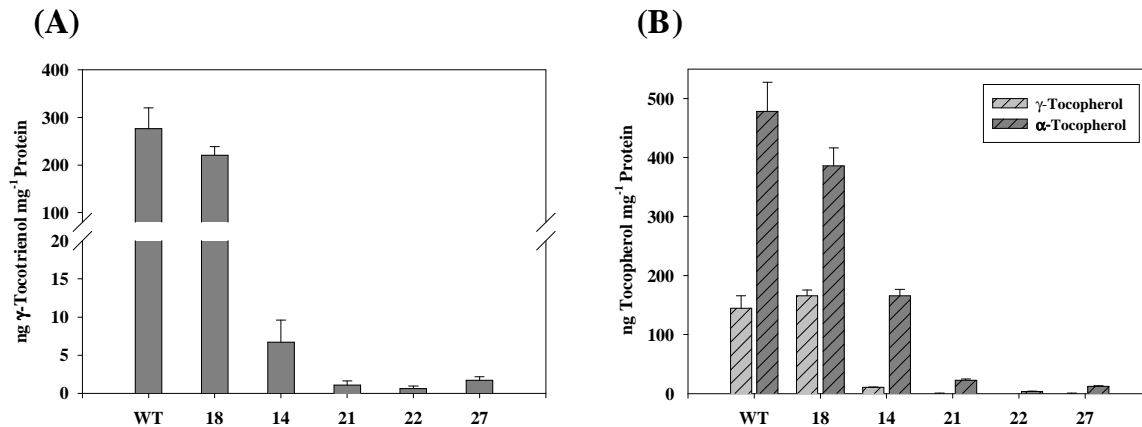


**Abb. 46:** Identifizierung von *StSXD1*-spezifischer RNA in transgenen Kartoffellinien.

**(A)** Schematische Darstellung der binären Expressionskassette pBinStSXD1-RNAi, die zum RNA-Silencing von *StSXD1* in Kartoffelpflanzen eingesetzt wurde. Das *StSXD1*-Fragment wurde mit abgeleiteten Primern des EST-Klons (GenBank Acc.-Nr. BF460070) amplifiziert und umfasste die Basen 503-1268 des cDNA-Klons (s. Anhang). **(B)** *Northern*-Analyse *StSXD1*-spezifischer Transkripte. Gesamt-RNA wurde von Wildtyp-Pflanzen (wt1, wt2) und den angezeigten *StSXD1*-RNAi transgenen Linien isoliert und 30 µg pro Spur geladen. Die Hybridisierung des *Northern Blot* erfolgte anschließend mit dem *StSXD1* EST-Fragment. Das endogene *StSXD1*-Signal in den Wildtyp-Kontrollen sowie in der nicht-supprimierten transgenen Kontrolle (NtCPIP1-RNAi-18) ist mit einem Pfeil markiert. In Linie 22 läßt die RNAi-vermittelte Degradierung des hoch-exprimierten Transgens auf effizientes Silencing schließen, was bei kürzerer Exposition des *Northern Blots* verifiziert wurde (Daten nicht gezeigt).

Die als *StSXD1*-RNAi-14, -21, -22 und -27 bezeichneten Linien wurden zusammen mit einer nicht-supprimierten transgenen Linie (*StSXD1*-RNAi-18) sowie nicht-transformierten Wildtyp-Pflanzen vegetativ vermehrt und 5 Wochen nach Transfer aus Gewebekultur in den Pflanzen die endogenen Tocopherolgehalte und Tocopherol Cyclase-Aktivität bestimmt. Es konnte verifiziert werden, dass die *StSXD1*-supprimierten Linien eine drastisch verminderte Cyclase-Aktivität in *source*-Blättern aufwiesen, was in einer Reduktion an Endprodukten der Tocopherolbiosynthese,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol, resultierte (Abb. 47A,B). Hingegen wurden in der transgenen Kontrolle NtCPIP1-RNAi-18 bei unveränderter Transkriptakkumulation keine signifikanten Änderungen der Enzymaktivität oder der Tocopherolgehalte gegenüber den WT-Pflanzen detektiert; ein eindeutiges Indiz, dass das *SXD1*-Ortholog in Kartoffel eine

funktionale Tocopherol Cyclase kodiert. Innerhalb der *StSXD1*-supprimierten Linien war insbesondere auf Basis der Tocopherolgehalte eine deutliche Abstufung (14>21>27>22) erkennbar, wobei die Linie 22 bei 0,2% Restaktivität und kaum detektierbarem  $\alpha$ -Tocopherolgehalt als Nullmutante betrachtet werden konnte.



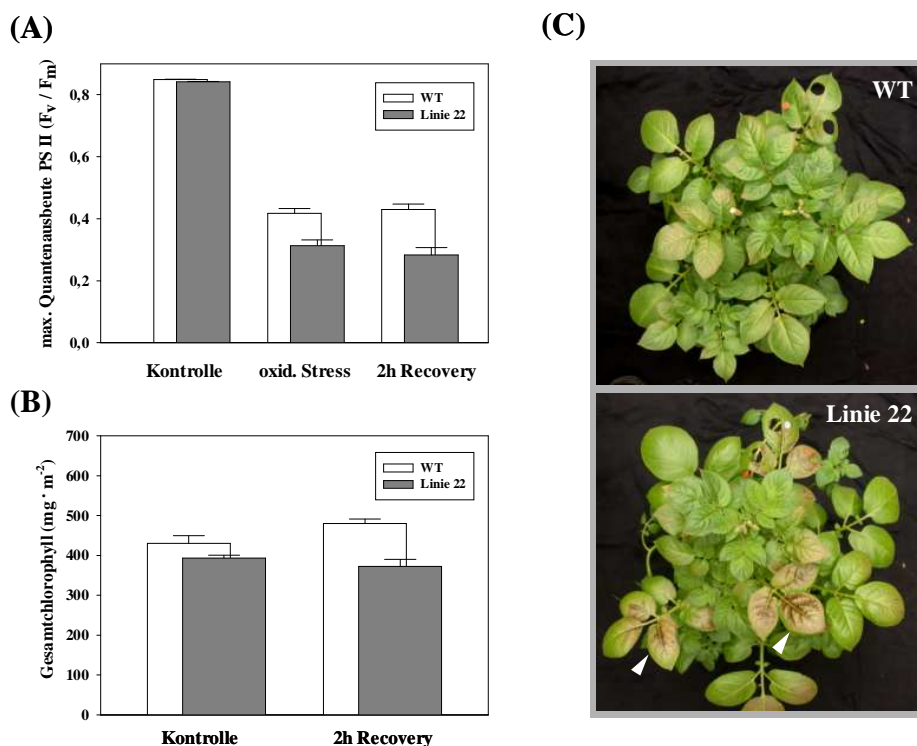
**Abb. 47:** Tocopherol Cyclase-Aktivität (A) und Tocopherolgehalte ( $\gamma$ - und  $\alpha$ -Tocopherol) (B) in *StSXD1*-supprimierten Linien im Vergleich zu einer transformierten, nicht signifikant veränderten Kontrolle (*StSXD1*-RNAi-18) sowie den untransformierten Wildtyp-Pflanzen (WT). Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 5 Pflanzen fünf Wochen nach Transfer in Gewächshausbedingungen [Daten von Dr. Michael Geiger nach der Methode in Porfiova *et al.* (2002) und Geiger *et al.* (2001); WO 02/00901].

### 3.3.3 Einfluss verminderter Tocopherolgehalte auf die Stresstoleranz und Photosyntheserate in transgenen Pflanzen

Obwohl die exakte *in vivo* Funktion von Tocopherolen in Pflanzen nicht geklärt ist, wird ihnen insbesondere eine Rolle bei dem Schutz des photosynthetischen Apparates vor oxidativem Stress zugesprochen (Fryer, 1992). Dies beruht zum einen auf der Beobachtung, dass Tocopherol in *in vitro* Experimenten reaktive Sauerstoffspezies zu entgiften vermochte und damit Membranlipide vor oxidativem Abbau schützte. Zum anderen liegt der Hauptteil des  $\alpha$ -Tocopherol in Thylakoidmembranen der Chloroplasten vor, was zu der Annahme führte, dass Tocopherol direkt an dem Schutz plastidärer Lipide und des Chlorophylls vor Sauerstofftoxizität beteiligt ist (zusammengefasst in Munné-Bosch und Alegre, 2002; Hofius und Sonnewald, 2003). Da in der Tocopherol-defizienten *Arabidopsis vte1*-Mutante unter oxidativen Stress eine Abnahme der photosynthetischen Effizienz zu detektieren war (Porfirova *et al.*, 2002), sollte der Effekt reduzierter Tocopherolgehalte in den transgenen Kartoffeln auf Stresstoleranz und Photosyntheseraten untersucht werden. Dazu wurde die

Linie StSXD1-RNAi-22 ausgewählt, die die geringsten Tocopherolgehalte aufwies und am ehesten mit der *Arabidopsis*-Mutante zu vergleichen war.

Für das Stressexperiment wurden jeweils 10 Pflanzen der transgenen Linie und der WT-Kontrolle bei kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer (500  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Licht, 70% Feuchte, 19°C Tag/15°C Nacht) angezogen und 6 Wochen nach Transfer aus der Sterilkultur für 72 Stunden bei Niedrig-Licht (50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) adaptiert. Die Pflanzen wurden dann für 16 h bei Hoch-Licht Bedingungen (730  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und niedriger Temperatur (9°C) exponiert und die Chlorophyllfluoreszenz sowie die Chlorophyllgehalte in terminalen Blättern von *source*-Fiedern (5./6. Fieder von oben) bestimmt.



**Abb. 48:** Stress-induzierte Änderungen der Chlorophyllfluoreszenz (A), des Chlorophyllgehaltes (B) und der Blattsymptome (C) von transgenen Pflanzen der Linie StSXD1-RNAi-22 im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (WT).

(A) Maximale Quantenausbeute des Photosystems II von Niedrig-Licht adaptierten Kartoffelpflanzen nach Applikation von photooxidativem Stress in Form von 16 h Licht (730  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bei einer Temperatur von 9°C. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von jeweils 10 Pflanzen vor (Kontrolle), unmittelbar im Anschluss (oxid. Stress), und 2 Stunden nach („Recovery“) der Stressbehandlung.

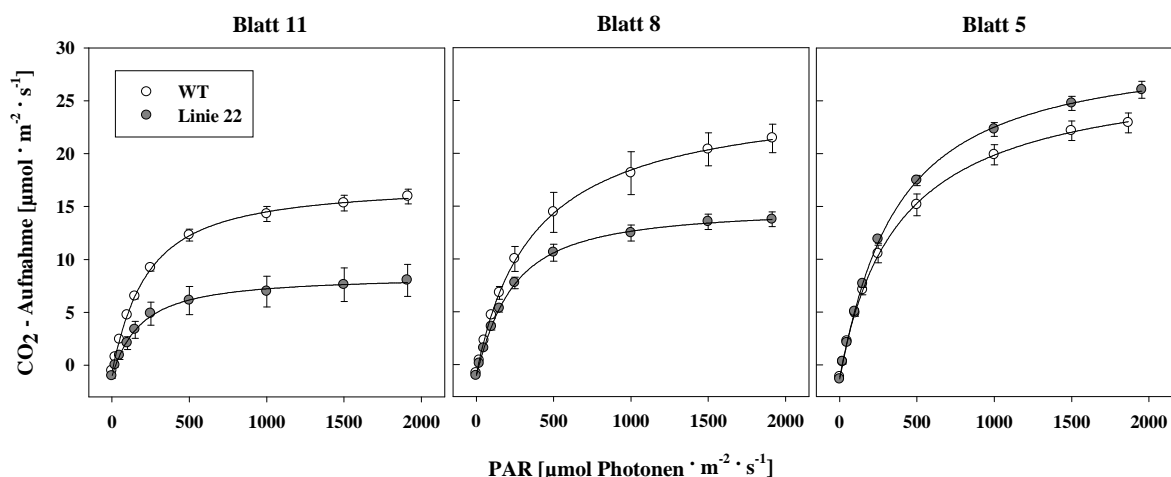
(B) Chlorophyllgehalt in den für die Fluoreszenzmessungen ausgewählten Blättern vor (Kontrolle) und 2 Stunden nach der 16-stündigen Stressbehandlung („Recovery“). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von jeweils 10 Pflanzen.

(C) Blattsymptome 4 Tage nach Beendigung der Stressbehandlung. Irreversible, nekrotische Blattschäden in der weniger stresstoleranten transgenen Linie 22 sind mit einem Pfeil angezeigt.



Die Stressbehandlung führte in den Kontrollpflanzen zu einer Abnahme der maximalen Quantenausbeute des Photosystems II um 50,9% direkt nach Exposition und um 49,4% nach 2h Erholung im Dunkeln („Recovery“). Die transgene Linie war hingegen gegenüber dem Ausgangswert um 62,8% unmittelbar nach dem Stress und sogar um 66,4% nach der Erholungsphase reduziert und zeigte somit eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber photooxidativen Stress. Auch die Chlorophyllgehalte waren in der Linie 22 gegenüber den Kontrollen verändert. So war in den Niedrig-Licht adaptierten Pflanzen vor der Behandlung (am Ende der Dunkelphase) bereits ein um etwa 9% verminderter Chlorophyllgehalt im Vergleich zu den WT-Pflanzen zu detektieren, und nach Stressapplikation war diese Differenz infolge einer Zunahme des Chlorophyllgehaltes in den WT-Pflanzen und einer leichten Abnahme in der transgenen Linie auf 23% angewachsen. In Übereinstimmung mit den beobachteten Effekten auf Chlorophyllfluoreszenz und Chlorophyllgehalt waren auch die Stress-induzierten Blattsymptome in den transgenen Pflanzen deutlich stärker ausgeprägt und selbst einige Tage nach der Stressapplikation noch als irreversible, nekrotische Blattschäden zu erkennen (Abb. 48B).

Photosynthesemessungen wurden unter ambienten Bedingungen im Gewächshaus durchgeführt und die Abhängigkeit der CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten von unterschiedlichen Lichtintensitäten (Lichtsättigungskurven) in drei verschiedenen Blattetagen bestimmt (Blatt 5, 8 und 11).

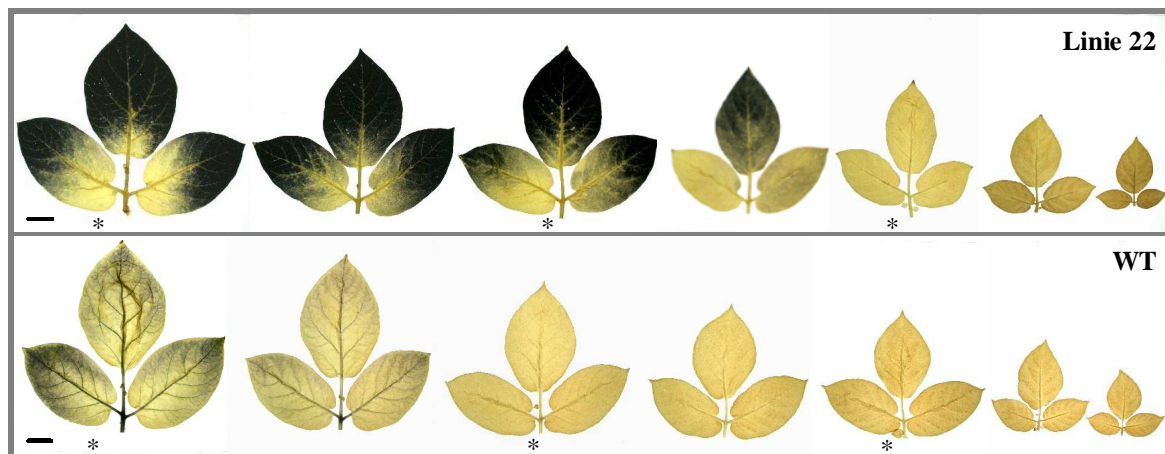


**Abb. 49:** Lichtsättigungskurven von Wildtyp-Kontrollen und transgenen Pflanzen der Linie StXSD1-RNAi-22. Gaswechselformen wurden bei einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 400 ppm an drei verschiedenen Blattstufen mit Hilfe eines LICOR-Gaswechselformen (LI6400) durchgeführt. Die Pflanzen wurden 8 Wochen nach Transfer ins Gewächshaus analysiert und hatten zu diesem Zeitpunkt etwa 14 Blattfiedern. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 4 Pflanzen.

Wie aus Abb. 49 zu erkennen, war die Photosyntheserate bei annähernder Sättigung ( $1500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in den unteren *source*-Blättern drastisch um 50,3% (Blatt 11) bzw. 33,7% (Blatt 8) gegenüber den Kontrollen vermindert, während interessanterweise in dem jüngsten *source*-Blatt eine signifikante Erhöhung der  $\text{CO}_2$ -Assimilation um 11,7% zu verzeichnen war.

### 3.3.4 Einfluss des Tocopherol-Cyclase/SXD1-Proteins auf den Assimilattransport

Die drastische Reduktion der Photosyntheseraten in den unteren Blattetagen im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen läßt einen *source*-spezifischen Effekt in der Tocopherol-defizienten Linie vermuten, der durch Kohlenhydratakkumulation verursacht sein könnte. Aus diesem Grund wurden zunächst die für die Photosynthesemessungen eingesetzten Pflanzen qualitativ auf Stärkeakkumulation mittels Jodfärbung untersucht.

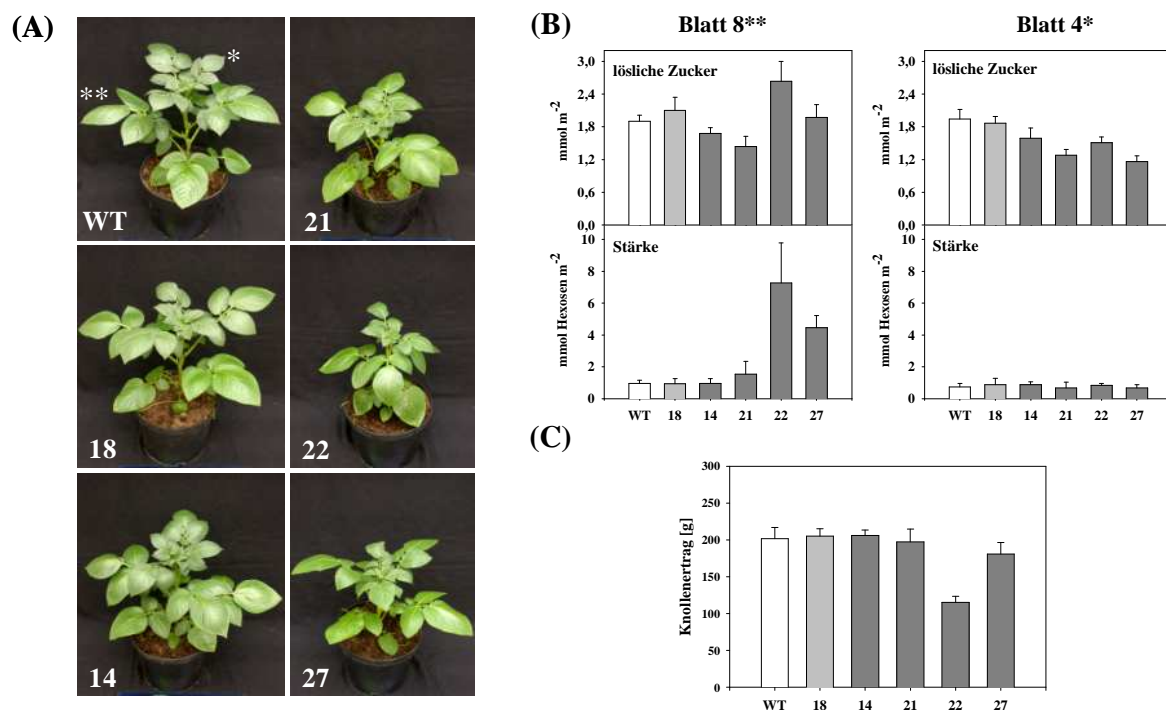


**Abb. 50:** Akkumulation von Stärke in Blättern der *StSXD1*-supprimierten Linie *StSXD1*-RNAi-22 im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Dargestellt sind Blätter zunehmenden Alters (von rechts nach links), die zunächst mit Ethanol entfärbt wurden. Die anschließende Färbung mit Iodlösung zeigt die *source*-spezifische, in akropetaler (*source-sink*) Richtung verlaufende Akkumulation von Stärke in der transgenen Linie am Ende einer verlängerten Dunkelphase. Die für die Photosynthesemessungen (vgl. 3.3.3) ausgewählten Blattstadien sind angezeigt (\*). Der Maßstab gibt 2 cm an.

Wie aus Abb. 50 zu ersehen, war in der transgenen Linie eine massive Stärkeakkumulation in den Interkostalfeldern zu detektieren, die direkt mit der *source*-Entwicklung korrelierte. Zwar zeigte sich auch in den Wildtyp-Pflanzen eine altersabhängige Akkumulation von Stärke in den unteren Blättern, doch war diese weit weniger ausgeprägt und zudem eher mit den Venen assoziiert. Bei der transgenen Linie zeigten sich die Venen (Klasse I + II) hingegen überwiegend stärkefrei, was einen direkten Hinweis auf einen Defekt im Assimilatexport gibt und damit Parallelen zu der *sxd1*-Mutante in Mais offensichtlich

macht. Es ist zudem zu sehen, dass die jüngste für Photosynthesemessungen ausgewählte Blatttage keine offensichtliche Stärkeakkumulation aufweist und damit ein direkter Zusammenhang zwischen Kohlenhydratgehalten und Photosynthesekapazität in den transgenen Pflanzen hergestellt werden kann.

Um zu untersuchen, ob die Kohlenhydratgehalte in Abhängigkeit von den verminderten Cyclase-Enzymaktivitäten und Tocopherolgehalten verändert waren, wurden in den zuvor für Tocopherol- und Cyclase-Messungen eingesetzten transgenen Linien (vgl. 3.3.3) lösliche Kohlenhydrate und Stärke am Ende der Dunkelphase bestimmt.



**Abb. 51:** Photoassimilatverteilung in *StSXD1*-RNAi transgenen Kartoffelpflanzen. **(A)** Phänotyp in *StSXD1*-supprimierten Linien 14, 21, 22 und 27 im Vergleich zu der transgenen Kontrolllinie 18 und der nicht-transformierten Wildtyp-Kontrolle (WT) 5 Wochen nach Transfer der Pflanzen aus Gewebekultur in ambiente Gewächshausbedingungen. \*,\*\* Blattstadien, die für die Bestimmung der Kohlenhydratgehalte in **(B)** ausgewählt wurden. **(B)** Kohlenhydratgehalte in zwei Blattstadien (Blatt 4 und 8) der *StSXD1*-inhibierten transgenen Linien und in den Kontrollen am Ende der Dunkelphase. Die Daten wurden von 5 Pflanzen pro Linie erhalten, wobei für jedes Einzelblatt zwei Proben gemessen und gemittelt wurden. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben und repräsentieren im Fall der löslichen Zucker die Summe von Glucose, Fructose und Saccharose. **(C)** Knollenertrag der transgenen Linien im Vergleich zu den Kontrollen. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Knollenfrischgewichtes pro Pflanze, wobei die Pflanzen bis zur Ernte für 13 Wochen angezogen wurden.

Abbildung 51A zeigt den Phänotyp der Pflanzen zum Zeitpunkt der Probennahme. Es ist zu erkennen, dass die Linien entsprechend ihrer Minderung in den Tocopherolgehalten auch eine Wuchsreduktion gegenüber den WT-Pflanzen und der nicht-supprimierten Kontrolle

ausprägten. Damit übereinstimmend waren in den Linien 22 und 27 die Stärkegehalte in der unteren *source*-Blattstufe signifikant und in der Linie 21 tendenziell gegenüber den Kontrollen erhöht (Abb. 51B). Hingegen erwiesen sich die Gehalte an löslichen Zuckern in dem wachsenden Blatt in allen supprimierten Linien gegenüber den Kontrollen reduziert, was auf einen verminderten Assimilattransport aus den exportierenden Blättern in die wachsenden Pflanzenteile schließen lässt. Da in Kartoffeln die Knollenentwicklung und der Ertrag ein wichtiges Indiz für den Assimilattransport zwischen *source* und *sink* ist, wurde von den transgenen Linien das Knollengewicht bestimmt. Dabei wird deutlich, dass tendenziell bei der Linie 27 und signifikant bei Pflanzen der Linie 22 eine Minderung des Ertrages infolge *source*-spezifischer Kohlenhydratakkumulation festzustellen war, während der Effekt in den weniger stark betroffenen Linien 14 und 21 nicht ausgeprägt wurde (Abb. 51C).

Die massive Stärkeakkumulation führte in den am stärksten betroffenen Linien (StSXD1-RNAi-22 und -27) zur Ausprägung sichtbarer phänotypischer Änderungen der unteren *source*-Blätter mit zunehmendem Pflanzenalter, die sich in Form von chlorotischen Interkostalfeldern, Randnekrosen und einem „Aufwölben“ der Blattränder zeigten. In Abb. 52 ist beispielhaft eine phänotypische Blattfieder der Linie 22 im Vergleich zur WT-Kontrolle dargestellt.

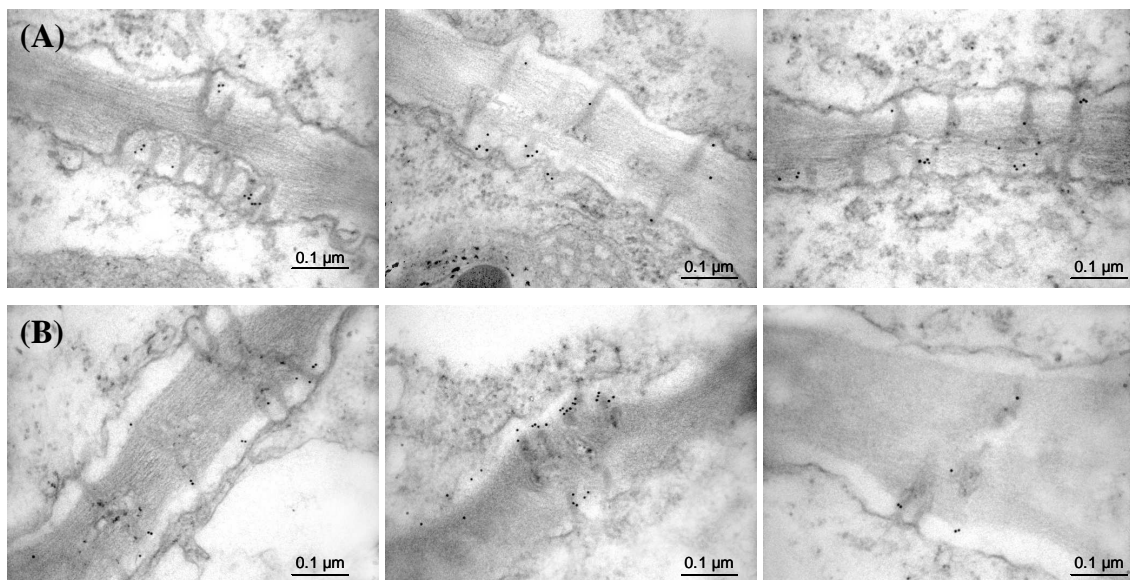


**Abb. 52:** Phänotypische Änderungen in unteren *source*-Blättern transgener Pflanzen der Linie StSXD1-RNAi-22 im Vergleich mit der Kontrolle (WT) etwa 10 Wochen nach Transfer ins Gewächshaus.

### 3.3.5 Ultrastruktur und Kallose-Markierung von Plasmodesmen in Vitamin E-defizienten Pflanzen

Der Assimilatexport-defiziente Phänotyp in der Maismutante *sxd1* wurde zuvor auf ultrastrukturelle Veränderungen der PDs zwischen Bündelscheide und Phloemparenchym als Folge einer massiven Kalloseablagerung und der dadurch bedingten Unterbrechung des symplastischen Transportweges ins Leitgewebe zurückgeführt (Russin *et al.*, 1996; Botha *et al.*, 2000). Da die Hemmung von SXD1 in den transgenen Kartoffellinien einen

vergleichbaren *source*-spezifischen Effekt auf den symplastischen Assimilattransport nahe legte, sollte überprüft werden, ob der Phänotyp mit ultrastrukturellen Änderungen an der zuvor postulierten Grenzschicht zwischen Bündelscheiden- und Phloemparenchymzellen korreliert werden konnte. Zu diesem Zweck wurde die Linie StSXD1-RNAi-22, die den stärksten Effekt auf Tocopherolstoffwechsel und Assimilatverteilung zeigte, ausgewählt und Immunogold-Markierungen mit einem anti-(1,3)- $\beta$ -Glucan Antiserum (Biosupplies, Parkville, Australia) im Vergleich zu Blättern der Wildtyp-Kontrolle (WT) durchgeführt. Es zeigte sich in verschiedenen Zelltypen eine spezifische Markierung der PDs, doch war bereits im WT ein großes Spektrum ultrastrukturell verschiedener und unterschiedlich stark markierter PDs offensichtlich. Obwohl jeweils 10 PDs an verschiedenen Grenzschichten (Mesophyll-Mesophyll, Mesophyll-Bündelscheide, Bündelscheide-Bündelscheide, Bündelscheide-Phloemparenchym, Phloemparenchym-GZ/SE-Komplex) in den Kontrollen und der transgenen Linie analysiert wurden, war keine eindeutige Aussage bezüglich ultrastruktureller Modifikationen infolge der Vitamin E-Defizienz möglich. Beispielhaft sind in Abb. 53 verschiedene PDs an der Grenzschicht zwischen Bündelscheide und Phloemparenchym in der Blattspitze von WT und der transgenen Linie dargestellt, um die große Variabilität in der Ultrastruktur und Kallosemarkierung zwischen verschiedenen PDs zu veranschaulichen.



**Abb. 53:** Immunogold-Markierung von Kallose an Plasmodesmen der Bündelscheiden/Phloemparenchym-Grenzschicht in Klasse III-Venen im *source*-Bereich (Blattspitze) von Blättern der StSXD1-RNAi transgenen Linie 22 (A) und der WT-Kontrolle (B). [Bilder von Dr. Michael Melzer nach der Methode in Hofius *et al.* (2001) unter Verwendung eines anti-(1,3)- $\beta$ -Glucan Antiserums (Biosupplies, Parkville, Australia)].

## 4 DISKUSSION

Plasmodesmen (PDs) bilden den symplastischen Transportweg zwischen benachbarten Zellen und leisten über den Austausch niedermolekularer Verbindungen, wie Photoassimilaten, Ionen und Wachstumsregulatoren, und den selektiven Transport von endogenen Makromolekülen, wie Transkriptionsfaktoren und Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexen, einen entscheidenden Beitrag zur interzellulären Kommunikation (Zambryski und Crawford, 2000; Jackson, 2001; Haywood *et al.*, 2002). Durch das wachsende Verständnis der suprazellulären Kontrolle von pflanzlichen Entwicklungsprozessen über den zellulären und systemischen Transport von RNA und Proteinsignalen kommt nun der Identifizierung von Mechanismen und Komponenten des plasmodesmalen Makromolekültransportes besondere Bedeutung zu (Lucas und Wolf, 1999; Heinlein 2002). Der erste Nachweis für die Existenz eines solchen endogenen Transportweges geht auf funktionelle Analysen viraler Movement Proteine (MPs) zurück, die durch Interaktion mit strukturellen Komponenten der PDs deren Leitfähigkeit modifizieren und damit den interzellulären Transport von infektiösem Virusmaterial ermöglichen (Carrington *et al.*, 1996; Goshroy und Citovsky, 1997; Lucas 1999, Ding *et al.*, 1999). Die Analyse der metabolischen und entwicklungspezifischen Konsequenzen MP-vermittelter Änderungen der plasmodesmalen Transporteigenschaften sowie die Identifizierung MP-interagierender Wirtsfaktoren sind daher vielversprechende Ansätze, molekulare Faktoren und Prozesse des interzellulären Transfers von Makromolekülen zu entschlüsseln. Alternativ dazu könnten plasmodesmale Transporteigenschaften durch Modulation der Expression endogener Proteine mit postulierter Rolle bei der Ausbildung funktionaler Plasmodesmen manipuliert werden, doch bleibt dieser Ansatz aufgrund der bisher geringen Zahl an möglichen Kandidaten begrenzt. Dies wiederum zeigt die Notwendigkeit, basierend auf bekannten PD-assoziierten Proteinen, wie z.B. viralen MPs, systematische Screeningstrategien aufzubauen, um pflanzliche Interaktoren zu isolieren.

#### **4.1 Wirkungsweise von PLRV-MP17 auf plasmodesmale Transportprozesse und Etablierung eines genetischen Systems zur Identifizierung von MP17-Interaktoren**

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Charakterisierung der Wirkungsweise des *Potato leafroll virus* MP (PLRV-MP17) auf plasmodesmale Transporteigenschaften, wobei insbesondere die Folgen konstitutiver und induzierbarer MP17-Expression für den symplastischen Assimilat- und Virustransport in transgenen Pflanzen untersucht wurden. Basierend auf den MP17-vermittelten Effekten auf Kohlenhydratverteilung und Pflanzenentwicklung konnte so erstmals ein genetisches System in *Arabidopsis* beschrieben werden, um Mutanten mit Defekten in potentiellen MP-Interaktoren zu identifizieren.

##### **4.1.1 Assoziation von MP17 mit verzweigten Plasmodesmen und Modifikation der plasmodesmalen Leitfähigkeit**

MP17:GFP exprimierende Tabakpflanzen wurden genutzt, um die plasmodesmale Affinität von MP17 in verschiedenen Geweben und Zelltypen zu bestimmen. Dabei ergaben GFP-Fluoreszenzanalysen in Kombination mit Immunolokalisierungen, dass MP17 mit plasmodesmalen Strukturen im vaskulären und nicht-vaskulären Gewebe von *source*-Blättern assoziiert, wie es zuvor bereits für transgene Kartoffelpflanzen beschrieben wurde (Schmitz *et al.*, 1997). Im Vergleich mit hoch-exprimierenden, phänotypisch veränderten Pflanzen der Linie U-15-2 (Herbers *et al.*, 1997) konnte verifiziert werden, dass die plasmodesmale Affinität unabhängig von der MP17-Proteinmenge gegeben war. Allerdings wurde mit steigendem MP17-Gehalt in der Linie U-15-2 eine Markierung von nicht-plasmodesmalen Strukturen beobachtet, die an Komponenten des Cytoskeletts erinnerten (3.1.1.2, Abb. 6D,K). Es bleibt jedoch zu klären, ob MP17 tatsächlich in vergleichbarer Weise wie das TMV-MP mit Mikrotubuli oder Mikrofilamenten zu interagieren vermag (Boyko *et al.*, 2000; Heinlein *et al.*, 1995; McLean *et al.*, 1995), oder ob die nicht-plasmodesmale Lokalisation eher die Konsequenz abgesättigter plasmodesmaler Rezeptormoleküle infolge der starken Akkumulation des MP17-Liganden war. Die generelle Assoziation von MP17 mit PDs in vaskulären und nicht-vaskulären Zelltypen in *source*-Blättern unterschied sich deutlich von der für TMV-MP beschriebenen Präferenz. So zeigte TMV-MP eine Affinität zu PDs des nicht-vaskulären Gewebes und zwischen Bündelscheiden- und Phloemparenchymzellen, war

allerdings nicht innerhalb des Phloemgewebes mit Hilfe von TMV-MP Antikörpern zu detektieren (Ding *et al.*, 1992). Es ist bemerkenswert, dass die generelle plasmodesmale Affinität von MP17 auf *source*-Gewebe beschränkt bleibt, was frühere Daten zur Lokalisation von TMV-MP und CMV-MP bestätigt, wonach MPs nicht mit einfachen, unverzweigten PDs des *sink*-Gewebes interagieren (Ding *et al.*, 1992; Itaya *et al.*, 1998). PDs in *sink*-Blättern haben ein erheblich höheres Ausschlussvermögen (>50 kDa) als verzweigte („branched“) PDs des *source*-Gewebes und erlauben somit den unspezifischen Transport von Makromolekülen (z.B. GFP) sowie die interzelluläre Ausbreitung MP-defizienter Viren (Oparka *et al.*, 1999). Interessanterweise war in *sink*-Blättern die Akkumulation von MP17 an PDs von Trichomen zu detektieren (Abb. 5A-C), die zuvor als strukturell verschieden von Mesophyll-PDs charakterisiert wurden (Waigmann *et al.*, 1997). Zudem haben detaillierte Untersuchungen zur Häufigkeit und Dynamik der strukturellen Änderungen von PDs beim *sink/source*-Übergang in Tabakblättern gezeigt, dass in Trichomzellen vor allen anderen Zelltypen die Entwicklung von einfachen („simple“) zu verzweigten PDs zu beobachten und somit auch als erstes eine Markierung der PDs durch MPs zu erwarten ist (Roberts *et al.*, 2001). Da die untersuchten *sink*-Blätter in den MP17:GFP transgenen Pflanzen eine Größe von etwa 1-2 cm aufwiesen, ist anzunehmen, dass in den Trichomen das plasmodesmale „Branching“ bereits eingesetzt hatte und so die Interaktion von MP17 mit verzweigten PDs erfolgen konnte. In der terminalen Trichomzelle herrschen jedoch über die gesamte Blattentwicklung einfache PDs vor (Roberts *et al.*, 2001), entsprechend war dort keine MP17 Akkumulation sichtbar (Abb. 5A).

Mittels Farbstoff-gekoppelter Mikroinjektionen konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von MP17 an PDs des Mesophylls zu einer signifikanten Erhöhung der plasmodesmalen Leitfähigkeit in MP17 und MP17:GFP exprimierenden Linien führte (Tab. 3-1). Die erhöhte Kapazität MP17-modifizierter PDs, Farbstoffe von 12 kDa zu transportieren, lag dabei in der Größenordnung, die für TMV-MP (Ding *et al.*, 1992; Wolf *et al.*, 1989; Wolf *et al.*, 1991), CMV-MP (Vaquero *et al.*, 1994) und *Alfalfa mosaic virus* MP (Poirson *et al.*, 1993) exprimierende Pflanzen ermittelt wurde. Dies zeigt eindeutig, dass MP17 im Mesophyll in vergleichbarer Weise wie eine Reihe verschiedener MPs wirken kann, und dass die immanente Fähigkeit von MP17 zur generellen, nicht auf das Phloem beschränkten plasmodesmalen Assoziation zu signifikanten Änderungen der symplastischen Transporteigenschaften führt.



#### 4.1.2 Dosisabhängige Modulation des Kohlenhydratstatus und der Virusresistenz

Die Entwicklung chlorotischer Interkostalfelder in ausgewachsenen *source*-Blättern von hoch-exprimierenden MP17-Linien wurde zuvor der Akkumulation von löslichen Zuckern und Stärke infolge einer Inhibierung der Phloembeladung („Exportblock“) zugeschrieben (Herbers *et al.*, 1997). Bei niedrigem Expressionsniveau konnte allerdings in MP17 und MP17:GFP exprimierenden Pflanzen eine Verminderung des Kohlenhydratgehaltes festgestellt werden, was eher auf einen stimulierten Export hinweist. Interessanterweise war in beiden Fällen eine vergleichbare Erhöhung des molekularen Ausschlussvermögens in Mesophyllzellen zu detektieren. Dies zeigt, dass die Modifikation von PDs nur geringe MP17-Proteinmengen erfordert und Kohlenhydratakkumulation und Phänotypentwicklung unabhängig von Änderungen der symplastischen Permeabilität im Mesophyll induziert wurden.

Durch Quantifizierung der MP17-Proteingehalte in der Line U-15-2 sowie in MP17:GFP transgenen Pflanzen konnte verifiziert werden, dass die Akkumulation von löslichen Zuckern und Stärke sowie die Wuchsretardierung positiv mit der Proteindosis korreliert war. Bei niedrigem Proteingehalt führte die erhöhte plasmodesmale Permeabilität vermutlich über einen stimulierten symplastischen Assimilattransport zur Verminderung der Kohlenhydratgehalte in *source*-Blättern (3.1.1.4, Abb. 7). Dies ist in Übereinstimmung mit transgenen Kartoffelpflanzen, die TMV-MP unter Kontrolle des Mesophyll-spezifischen Promotors ST-LS1 exprimierten und infolge eines modifizierten plasmodesmalen Ausschlussvermögens höhere Saccharoseexportraten und verminderte Kohlenhydratgehalte gegenüber den Kontrollen aufwiesen (Olesinski *et al.*, 1996). Ein ähnlicher Effekt auf die Assimilatverteilung ist auch für die Expression von CMV-MP und CMV-MP:GFP in Tabakpflanzen beschrieben (Shalitin *et al.*, 2002), was allerdings früheren Arbeiten entgegensteht, bei denen das entsprechende MP in Tabakpflanzen trotz erhöhter plasmodesmaler Leitfähigkeit keinen signifikanten Einfluss auf den Kohlenhydratmetabolismus zeigte (Lucas *et al.*, 1996). Mit steigendem MP17-Proteingehalt wird der primäre Effekt von MP17 auf die plasmodesmale Leitfähigkeit im Mesophyll wahrscheinlich von eher pleiotropen, metabolischen Konsequenzen der MP17-Expression überlagert, was letztendlich durch Inhibierung der Phloembeladung in Kohlenhydratakkumulation und Wachstumsdefekt resultiert. Es ist denkbar, dass diese Auswirkungen bei hoher MP17-Dosis unabhängig vom Effekt auf die PDs erfolgen und durch einen Eingriff in den Phloemetabolismus verursacht werden. Deutlich verminderte ATP-

Gehalte in Mittelrippen phänotypisch veränderter Pflanzen sprechen für diese Möglichkeit (Herbers *et al.*, 1997). Dies würde auch erklären, warum die Phloem-spezifische Akkumulation des TMV-MP unter Kontrolle des rolC-Promotors trotz fehlender plasmodesmaler Assoziation des TMV-MP in Geleit- und Phloemparenchymzellen zu verminderten Saccharoseexportraten und erhöhten Kohlenhydratgehalten im Mesophyll transgener Kartoffeln führte (Almon *et al.*, 1997). Im Fall des MP17 kann allerdings ein spezifischer, expressionsabhängiger Einfluss auf die Funktion von PDs im Leitgewebe nicht ausgeschlossen werden, da MP17 im Gegensatz zu TMV-MP auch im Phloem mit PDs assoziiert (Schmitz *et al.*, 1997; Hofius *et al.*, 2001; diese Arbeit). Die Kohlenhydratakkumulation bei hoher Expression könnte somit die Konsequenz unterschiedlicher Affinitäten bzw. Wirkungen auf PDs verschiedener Zelltypen sein. Diese Hypothese wird durch Daten von Herbers *et al.* (1997) unterstützt, wonach PDs im Phloemgewebe von phänotypisch veränderten Blättern deformiert erscheinen, während Mesophyll-PDs im gleichen Entwicklungsstadium (7-Blattstadium) Wildtyp-ähnliche Struktur aufweisen. Insgesamt läßt sich feststellen, dass allein durch Modulation des MP17-Expressionsniveaus die Konsequenzen für die Assimilatverteilung sehr verschieden sind und damit Situationen widerspiegeln, die im Falle des TMV-MP durch Einsatz zellspezifischer Promotoren erzielt wurden. Damit erscheinen nun auch die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse bei Verwendung unterschiedlicher MPs, Pflanzenspezies und Konstrukte in einem anderen Licht. Diese wurden zuvor allein mit spezifischen Einflüssen der MPs auf den Transport endogener Signalmoleküle erklärt (Lucas und Wolf, 1999; Lucas *et al.*, 1996), doch ist nun ebenso denkbar, dass eine gewisse Variabilität in der MP-Expression infolge verschiedener Pflanzenlinien und eingesetzter Promotoren die Ursache für die beobachteten Effekte ist.

Die Analyse MP17 und MP17:GFP transgener Linien nach Infektion mit dem Potyvirus PVY zeigte eindeutig, dass auch die MP17-vermittelten Resistenzmechanismen eine starke Expressionsabhängigkeit aufwiesen. So konnte ein erhöhter Schutz gegenüber PVY nur in Zucker-akkumulierenden und phänotypisch betroffenen Pflanzen detektiert werden (Linie U-15-2p; 3.1.1.5, Abb. 8), was mit der Induktion von PR-Protein spezifischen Transkripten korrelierte. Dies lässt eine Kohlenhydrat-vermittelte Resistenzantwort vermuten und zeigt gute Übereinstimmung mit anderen Zucker-akkumulierenden Pflanzenlinien, die eine Hefe-Invertase in der Vakuole oder der Zellwand exprimierten und sowohl die Induktion von PR-Transkripten als auch eine erhöhte Resistenz gegenüber der Multiplikation und systemischen Ausbreitung von PVY aufwiesen (Herbers *et al.*, 1996a). Interessanterweise führte die MP17-

Expression unterhalb der Dosis, die Assimilataakkumulation und PR-Protein Expression induzierte, zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber PVY (Linien U-15-2np; 35S-1-41). Die gesteigerte PVY Akkumulation macht dabei einen komplementären Effekt des MP17-Proteins für PVY-kodierte Transportfunktionen wahrscheinlich, vermutlich bedingt durch die MP17-vermittelte Erhöhung der plasmodesmalen Permeabilität. Dies wird von früheren Untersuchungen mit transgenen Tabakpflanzen unterstützt, die ein funktionales oder nicht-funktionales TMV-MP exprimierten. Nur die Expression der mutierten Variante, die nicht mehr in der Lage war PDs in vergleichbarer Art und Weise wie das Wildtyp TMV-MP zu modifizieren, führte zu einer Resistenz gegenüber einer Reihe verschiedener Viren, während das funktionale MP die Suszeptibilität erhöhte (Cooper *et al.*, 1995; Lapidot *et al.*, 1993). Allerdings scheint es auch einen unteren Schwellenwert für die fördernde Wirkung des MP17 auf die Virusausbreitung des MP17 zu geben, da die MP17:GFP exprimierende Linie mit der niedrigsten Expression (35S-1-20) trotz veränderter plasmodesmaler Leitfähigkeit (3.1.1.3, Tab. 3-1) keinen Effekt auf den PVY Titer zeigte. Diese Ergebnisse weichen im Ganzen deutlich von den Beobachtungen an MP17 transgenen Kartoffellinien ab, für die eine Breitspektrumresistenz gegenüber mehreren Viren (u.a. auch PVY) beschrieben wurde. Obwohl auch in diesen Pflanzen Änderungen im Kohlenhydratmetabolismus beobachtet wurden, konnte keine signifikant erhöhte Expression von PR-Proteinen detektiert werden. Es wurde ein Pathogen-vermittelter Resistenzmechanismus postuliert, der auf der plasmodesmalen Lokalisation des MP17 und damit der Absättigung allgemeiner PD-Rezeptoren des Makromolekültransportes basierte und somit mit den Transportfunktionen nicht-verwandter Viren interferierte (Tacke *et al.*, 1996). In den MP17 transgenen Tabakpflanzen erwiesen sich hingegen Kohlenhydrat-induzierte Abwehrreaktionen als essentiell für einen erhöhten Schutz gegenüber PVY; die plasmodesmale Lokalisation und Modifikation *per se* war nicht ausreichend für die MP17-vermittelte Resistenz, sondern führte sogar zu einer erhöhten Suszeptibilität.

#### **4.1.3 Venöse Phänotypentwicklung und Modulation *sink*-assoziierter Transportprozesse nach Ethanol-induzierter MP17-Expression**

Unter Verwendung des *alc*-Expressionssystems (Salter *et al.*, 1998; Caddick *et al.*, 1998; Roslan *et al.*, 2001) konnten transgene Tabakpflanzen erhalten werden, die MP17 und die Reporterfusion MP17:GFP unter Kontrolle eines Ethanol-induzierbaren Promotors exprimierten. Damit war eine experimentelle Alternative zu den bisher beschriebenen

konstitutiven und Gewebe-spezifischen Expressionen von MPs in transgenen Pflanzen gegeben (Lucas *et al.*, 1996; Lucas und Wolf, 1999), was insbesondere die Analyse des MP-vermittelten Einflusses auf symplastische Transportprozesse und *sink/source*-Beziehungen mit hoher zeitlicher Auflösung erlaubte. Entscheidender Vorteil dabei ist, dass die transgenen Pflanzen bis zum Zeitpunkt der Ethanol-Applikation wie Kontrollpflanzen wachsen und damit pleiotrope und adaptive Effekte als Folge einer MP-Akkumulation über die gesamte Pflanzenentwicklung ausgeschlossen werden können. Darüber hinaus lassen sich unter induktiven Bedingungen hohe Expressionsraten erzielen. Da Ethanol im Gegensatz zu vielen anderen chemischen Induktoren in der eingesetzten Konzentration nur minimale Phytotoxizität aufweist, sind störende Nebenwirkungen bei der Manipulation und Analyse von Stoffwechselwegen auszuschließen (Caddick *et al.*, 1998).

In mehreren AlcMP17 transgenen Linien konnte übereinstimmend die rasche Entwicklung eines spezifischen Phänotyps nach Ethanol-Induktion detektiert werden, der im Unterschied zu den konstitutiv exprimierenden Pflanzen nicht in *source*-Blättern auftrat, sondern auf die im Wachstum befindlichen Blätter beschränkt war und direkt mit dem *sink/source*-Übergang innerhalb des Blattes korreliert schien. Dabei zeigte sich der Phänotyp in Form von Chlorosen zunächst (30-48 Stunden nach Induktion) spezifisch mit der Venenklasse III assoziiert (3.1.2.2, Abb. 15). Erst später (72 Stunden nach Induktion) waren die phänotypischen Änderungen als kontinuierlich chlorotische Bereiche um die Venenklasse II sichtbar und häufig von Blattdeformationen begleitet. Insgesamt erinnerte der Venen-assoziierte Phänotyp sowie die eindeutige Korrelation mit wachsenden, basalen Blattbereichen sehr an die Ausprägung von systemischen Virussympomen. Diese entwickeln sich vornehmlich in den Blättern, die zum Import und der symplastischen Entladung von Photoassimilaten und damit auch von infektiösem Virusmaterial befähigt sind (Leisner und Turgeon, 1993). Interessanterweise wurde zuvor übereinstimmend für Viren und Phloem-mobile Substanzen (wie z.B. Carboxyfluorescein) das Netzwerk aus Klasse III-Venen als Ort der Phloementladung in *sink*-Blättern identifiziert (Roberts *et al.*, 1997). Die Beobachtung, dass bereits vor der sichtbaren Ausprägung des chlorotischen Phänotyps eine spezifische Akkumulation von Stärke am Ende der Dunkelphase im Bereich der Venenklasse III auftrat, lässt daher einen primären Effekt des MP17 auf den Assimilattransport in die importierenden *sink*-Blattbereiche vermuten. Der Vergleich der Stärkeakkumulation und -verteilung in verschiedenen Blattaltersstufen bei konstitutiver und Ethanol-induzierter Expression bestätigte das „inverse“ Muster der beiden MP17-vermittelten Phänotypen (3.1.2.3, Abb. 16 und Abb. 17). Die bei konstitutiver MP17 Expression beobachtete massive

Stärkeakkumulation ist infolge einer postulierten Inhibierung der Phloembeladung (Herbers *et al.*, 1997) *source*-spezifisch und nimmt daher mit dem Blattalter in akropetaler Richtung zu, während der venöse Stärkephänotyp nach induzierter MP17 Expression ausschließlich in den wachsenden *sink*-Bereichen in basipetaler Ausdehnung zu detektieren ist. In beiden Fällen können damit die phänotypischen Blattsymptome direkt mit der MP17-vermittelten Akkumulation von Stärke korreliert werden.

Die quantitative Analyse der kinetischen Änderungen des Kohlenhydratstatus in *sink/source*-Übergangsblättern nach Ethanol-induzierter MP17 Expression belegte zudem, dass in den transgenen Linien gegenüber der Kontrolle bereits 6 Stunden nach Induktion Stärke in der Blattlamina (einschließlich des Netzwerkes der Klasse III-Venen) akkumulierte (3.1.2.4, Abb. 18). Eine vergleichbare Akkumulation zum Ende der Lichtphase war auch 30 bzw. 54 Stunden nach Induktion deutlich ausgeprägt, doch erst zu diesen Zeitpunkten zeigten sich die löslichen Zucker, insbesondere die Hexosen, signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. Parallel zum Anstieg löslicher Kohlenhydrate wurden 30-42 Stunden nach der Induktion signifikante Änderung in der Genexpression Kohlenhydrat-responsiver Gene detektiert (3.1.2.5, Abb. 19), was nicht Folge einer direkten Perzeption des MP17 war, wie die *Northern*-Analysen der in Dunkelheit gehaltenen MP17-induzierten Pflanzen belegten (Abb. 20). Die Repression photosynthetischer Gene (wie z.B. *rbcS*) sowie die Induktion Abwehrrelevanter (wie z.B. *PR-Q*) und an der Synthese von Speicherstoffen (wie z.B. *AGPase*) beteiligter Gene wurde zuvor direkt auf die Signalfunktion von löslichen Zuckern zurückgeführt (Koch, 1996; Herbers *et al.*, 1995; Herbers *et al.*, 1996b). Entsprechend hatte die innerhalb der ersten 30 Stunden nach Induktion beobachtete Akkumulation von Stärke keine signifikanten Auswirkungen auf die Expression dieser Gene.

Eine rasche und spezifische Akkumulation von Stärke erwies sich zuvor häufig mit der Ausprägung von lokalen und systemischen Virussympptomen assoziiert (zusammengefasst in Goodman *et al.*, 1986; Fraser 1987). Detaillierte biochemische, physiologische und histochemische Analysen an CMV-infizierten Kürbiskotyledonen zeigten allerdings, dass sich der Virus-vermittelte Einfluss auf Kohlenhydratmetabolismus und Symptomausprägung nicht einheitlich darstellt, sondern eine hohe raum-zeitliche Komplexität aufweist (Técsi *et al.*, 1994b, Técsi *et al.*, 1996). So wurde während der frühen Infektionsphase zunächst ein Anstieg des Stärke- und eine Abnahme des Saccharosegehaltes detektiert, während zu einem späteren Zeitpunkt ein verstärkter Einbau des fixierten Kohlenstoffs in lösliche Zucker zu verzeichnen war (Técsi *et al.*, 1994a). Die Feinanalyse der CMV-induzierten Läsionen zeigte zudem, dass die Virusreplikation in einzelnen Zellen eine Serie von metabolischen

Änderungen in den Nachbarzellen verursachte und Effekte auf Photosynthese und Stärkegehalt nicht die direkte Konsequenz der Virusakkumulation waren (Técsi *et al.*, 1994b). Interessanterweise wurde in CMV-infizierten Melonen (*Cucumis melo* L.) ein direkter Einfluss der Infektion auf den Assimilattransport über das Phloem beschrieben. So wurde im Phloemexudat eine signifikante Erhöhung von Saccharose gegenüber der in *Cucurbitaceen* vorherrschenden Zuckertransportform Stacchyose festgestellt, was ein Umschalten von einer symplastischen auf eine apoplastische Phloembeladung vermuten ließ (Shalitin und Wolf, 2000). Dabei waren Änderungen in der Zuckerkomposition des Phloensaftes auch in Blättern zu sehen, die nachweislich keine Viruspartikel enthielten, so dass die Effekte nicht nur über eine unmittelbare Virusprotein (z.B. MP) vermittelte Modifikation des plasmodesmalen Transportweges erklärt werden konnte. Es wurde vermutet, dass es sich eher um eine generelle Abwehrreaktion der Pflanze handelte, die zu einem Block der symplastischen Phloembeladung auch in entfernten Blättern durch die Wirkung von Signalmolekülen führte (Shalitin und Wolf, 2000).

Es lässt sich daher spekulieren, dass die induzierte Expression des MP17 zu metabolischen Konsequenzen ähnlich denen einer Virusinfektion in systemischen Blättern führte, was zunächst über eine massive Stärkeakkumulation in den *sink*-assoziierten Blattbereichen sichtbar wurde. Dabei ist vorstellbar, dass MP17 unmittelbar über die Interaktion mit PDs den Assimilattransport beeinflusst hat, oder aber als Viruskomponente erkannt wurde und der symplastische Transportweg in das *sink*-Gewebe infolge einer pflanzlichen Abwehrreaktion blockiert wurde.

Die im Gegensatz zur konstitutiven Expression offensichtliche Beeinflussung des *sink*-assoziierten Kohlenhydratmetabolismus und/oder Assimilattransportes nach MP17-Induktion wurde durch Analysen zur Virusresistenz unterstützt. So konnte ein signifikant verminderter PVY-Gehalt in den systemischen Blättern von Ethanol-induzierten Pflanzen detektiert werden, die zum Zeitpunkt der Infektion einen MP17-vermittelten Phänotyp ausprägten. In der folgenden, jüngeren Blattstufe, die sich erst nach Abklingen der MP17-Expression ausbildete und infolgedessen keine phänotypischen Änderungen zeigte, war hingegen eine mit den Kontrollen vergleichbare Suszeptibilität gegenüber PVY festzustellen (3.1.2.6, Abb. 21). Damit wird einerseits deutlich, dass der MP17-induzierte Phänotyp in Blättern auftritt, die zum Import von PVY befähigt sind und damit einen *sink* für Photoassimilate darstellen. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass die MP17-vermittelte Resistenz lokal auf Blätter mit phänotypischen Änderungen begrenzt bleibt und nicht über systemische Signale in die nachwachsenden Blattstufen „transportiert“ werden kann. Eine systemisch vermittelbare

Resistenz („systemic acquired resistance“, SAR) wurde für transgene Tabakpflanzen beschrieben, die in Folge der apoplastischen Expression einer Hefe-Invertase neben großer Mengen löslicher Zucker auch PR-Protein spezifische Transkripte und Salicylat (SA) akkumulierten (Herbers *et al.*, 1996a, vgl. 4.1.2). Nach induzierbarer Expression der Hefe-Invertase mit Hilfe des *alc*-Systems (Caddick *et al.*, 1998) konnte eine Kohlenhydrat-vermittelte Resistenz gegenüber PVY bestätigt werden, doch war sie in Übereinstimmung mit den beobachteten Effekten in den AlcMP17-Linien lokal auf Zucker-akkumulierende und PR-Protein exprimierende Blätter beschränkt und führte trotz systemisch erhöhter SA-Gehalte nicht zu einer SAR (Qu, 2001). Neben dieser indirekten, Kohlenhydrat-induzierten Abwehrreaktion könnte MP17 allerdings auch direkt über den Block des Virusimportes und der symplastischen Entladung in die systemischen Blätter zu der beobachteten Resistenzhöhung geführt haben. Das primäre Auftreten des venösen Phänotyps an den Klasse III-Venen, den präferentiellen Orten der Virus- und Photoassimilatentladung in *sink*-Gewebe (Roberts *et al.*, 1997), ist dafür ein wichtiges Indiz.

Der MP17-induzierte Phänotyp legt eine auf das vaskuläre Gewebe begrenzte Wirkungsweise des MP17-Proteins nahe. Dies würde mit der natürlichen Funktion des MP17 beim Transport des PLRV in Einklang stehen, der sich nur innerhalb des GZ/SE-Komplexes und zwischen Phloem-assoziierten Zellen, nicht aber in Mesophyllzellen effizient ausbreiten kann (Barker 1987; Nurkiyanova *et al.*, 2000). Eine eingeschränkte Besiedelung des Mesophyll konnte durch synergistische Effekte einer Koinfektion mit Potyviren oder effizienter mit Umbraviren erzielt werden, vermutlich durch Bereitstellung von Transportfunktionen und/oder der Suppression RNA-vermittelter Abwehrmechanismen [wie z.B. „post-transcriptional gene silencing“ (PTGS)] in nicht-vaskulärem Gewebe (Barker, 1989; Savenkov und Valkonen, 2001b; Ryabov *et al.*, 2001). Das generelle Fehlen einer Transportfunktion für die effiziente Ausbreitung in Mesophyll und Epidermis wird dabei als eine wesentliche Ursache der Phloemlimitierung postuliert (zusammengefasst in Taliansky und Barker, 1999). So war MP17 in transgenen Kartoffelpflanzen, die einen Vollängen (biologisch aktiven) cDNA-Klon des PLRV-Genoms exprimierten, präferentiell im vaskulären Gewebe mit PDs assoziiert, im Mesophyll hingegen nur an nicht-plasmodesmalen Strukturen zu lokalisieren (Schmitz *et al.*, 1997). Die konstitutive Expression von MP17 in Kartoffeln (Schmitz *et al.*, 1997) und Tabak (Hofius *et al.*, 2001; diese Arbeit) belegte allerdings eine generelle Affinität zu PDs, und in der vorliegenden Arbeit konnte zudem die MP17-vermittelte Modifikation der plasmodesmalen Leitfähigkeit im Mesophyll nachgewiesen werden. Es bleibt daher unklar, warum bei Anwesenheit anderer PLRV-

kodierter Faktoren MP17 nur im Phloem mit PDs assoziiert, obwohl offensichtlich eine intrinsische Fähigkeit zur plasmodesmalen Interaktion auch im Mesophyll gegeben ist.

Interessanterweise ließ auch die Lokalisierung von MP17:GFP nach Ethanol-Induktion eine präferentielle Affinität des MP17 zu PDs in Venen-assoziierten Zelltypen vermuten. Allerdings konnte eine plasmodesmale Assoziation nur zwischen Zellen von Trichomen, der Epidermis und darunter liegenden Parenchymzellen in phänotypischen Bereichen der Klasse II- und III-Venen eindeutig nachgewiesen werden (3.1.2.7, Abb. 22). Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass in anderen Zelltypen, z.B. im Phloem, plasmodesmal und/oder cytoplasmatisch lokalisiertes Protein vorhanden war, aber unterhalb des Detektionslimits lag. Tatsächlich zeigten Immunogold-Markierungen von MP17 in den AlcMP17 transgenen Linien geringe Proteinmengen an nicht-plasmodesmalen Zellstrukturen etwa 48 h nach Induktion im vaskulären Gewebe (Daten nicht gezeigt). Dennoch ist auffällig, dass die MP17:GFP-Interaktion mit PDs in den Zelltypen auftrat, für die beim *sink/source*-Übergang innerhalb des Blattes als erstes die Entwicklung von einfachen zu verzweigten PDs postuliert wurde (Roberts *et al.*, 2001). Dies deutet auf eine hohe Affinität von MP17 zu einem PD-Entwicklungsstadium hin, das direkt mit dem *sink/source*-Übergang korreliert zu sein scheint. Fehlende Assoziation mit einfachen PDs im *sink*-Bereich sowie geringer ausgeprägte Affinitäten zu bereits vollständig verzweigten PDs in *source*-Bereichen könnte daher zum raschen Abbau des nicht-plasmodesmal lokalisierten MP17 geführt haben. Es ist lange bekannt, dass viele MPs nur transient während früher und mittlerer Phasen der Virusinfektion akkumulieren (Maule, 1991), und es wurde vermutet, dass proteolytischer Abbau dafür verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang wurde für TMV-MP gezeigt, dass es *in vivo* über das 26S Ubiquitin-Proteasomsystem degradiert (Reichel und Beachy, 2000) und über Phosphorylierung durch eine PD-assoziierte Proteinkinase stabilisiert wird (Kawakami *et al.*, 1999). Interessanterweise konnte über „DNA-Shuffling“ eine TMV-MP Variante mit deutlich verbesserter Transportfunktion erhalten werden, was auf eine erhöhte Akkumulation infolge der Umgehung des Mikrotubuli-assoziierten MP-Abbauweges zurückgeführt wurde (Gillespie *et al.*, 2002). Auch die beobachtete Instabilität des *Turnip yellow mosaic virus* MP *in vitro* wurde mit dem selektiven Abbau über den Ubiquitin-vermittelten Proteasomweg erklärt (Drugeon und Jupin, 2002). Eine entsprechend geringe Stabilität und die Degradierung des nicht PD-assoziierten MP17 über das 26S-Proteasom würde daher erklären, warum mittels *Western*-Analyse trotz hoher Transkriptakkumulation kein Protein in den verschiedenen Geweben während der Induktionskinetik detektiert werden konnte.



Auf Basis der vornehmlich in der Venenperipherie auftretenden plasmodesmalen MP17-Lokalisation nach Ethanol-Induktion ist allerdings anzunehmen, dass die Entwicklung des venösen Phänotyps nicht ausschließlich durch Interaktion von MP17 mit PDs verursacht wurde. Vielmehr müssen direkte Effekte auf den Wirtsmetabolismus postuliert werden, die in PD-unabhängiger aber Phloem-spezifischer Weise beispielsweise durch die Interaktion mit zellulären Proteinen oder RNAs hervorgerufen wurden. Die Identifizierung verschiedener MP-interagierender Transkriptionsfaktoren weist auf eine mögliche, unmittelbare Einflussnahme über die Modulation der zellulären Genexpression hin (Masushita *et al.*, 2001; Matsushita *et al.*, 2002; Desvoyes *et al.*, 2002). Zudem könnten MPs aufgrund ihrer unspezifischen Nukleinsäure-Bindungsfähigkeit in die Funktion nicht-zellautonomer RNA-Spezies eingreifen, die z.B. als Elizitoren für PTGS und Entwicklungsprozesse wirken und dafür über das Phloem, vermutlich unter Beteiligung MP-ähnlicher RNA-Bindeproteine, transportiert werden (Xoconostle-Cázares *et al.*, 1999; Ueki und Citovsky 2001; Lucas *et al.*, 2001). Daneben kann nicht ausgeschlossen werden, dass die bereits 1-3 Stunden nach Ethanol-Induktion akkumulierenden MP17-Transkripte von der Pflanze als fremd erkannt wurden und über direkte Perzeption eine Abwehrreaktion induzierten, die in der Inhibierung der symplastischen Phloementladung in den wachsenden Pflanzenbereiche resultierte. Über die Ethanol-induzierbare Expression nicht-translatierbarer MP17-Transkripte bleibt diese Möglichkeit im Detail zu untersuchen.

#### **4.1.4 Plasmodesmale Affinität von MP17 und Beeinflussung des Assimilatexportes in *Arabidopsis***

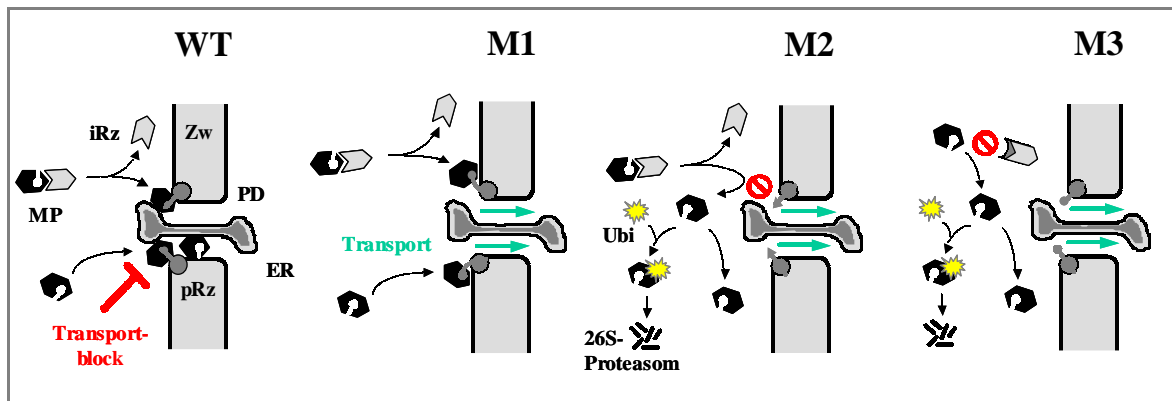
Die Analysen zur konstitutiven und induzierbaren Expression von MP17 haben deutlich gemacht, dass letztendlich nur über die Identifizierung der pflanzlichen MP17-Interaktoren die komplexe Wirkungsweise von MP17 auf plasmodesmale Transportprozesse verstanden werden kann. Alternativ zu den zuvor beschriebenen biochemischen und Hefe-Zwei-Hybrid Ansätzen zur Isolierung MP-bindender Proteine (Kellmann 2001, Heinlein 2002) sollte ein genetisches System in *Arabidopsis* entwickelt werden, um Mutanten mit veränderten Bindungseigenschaften der putativen MP17-Rezeptoren zu identifizieren. Zunächst konnten unter Verwendung der in Tabak eingesetzten Konstrukte pET15 (Herbers *et al.*, 1997, vgl. 1.4.2, Abb. 2B) und p35S-1 (Hofius *et al.*, 2001; vgl. 3.1.1.1 Abb. 4A) transgene *Arabidopsis*-Linien erhalten werden, die MP17 und MP17:GFP konstitutiv exprimierten. Da die relativ wenigen Wirtspflanzen von PLRV überwiegend in der Familie der *Solanaceen* zu finden sind

(Harrison, 1984), wurden zunächst die physiologischen und zellbiologischen Konsequenzen der MP17-Expression in dem wirtsfremden („non-host“) Pflanzenhintergrund überprüft. Dies war insofern bedeutsam, als dass in *Arabidopsis* exprimiertes TMV-MP proteolytisch inaktiviert wurde und somit nicht in der Lage war, einen MP-defizienten TMV-Stamm zu komplementieren (Hughes *et al.*, 1995). Diese fehlende Funktionalität von TMV-MP erwies sich bisher offenbar als limitierend für die intensivere Nutzung von *Arabidopsis* als Modellsystem für die Analyse von MP-Funktionen in Pflanzen, denn detaillierte physiologische und genetische Arbeiten in MP-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien sind in der Literatur nicht weiter zu finden. Demzufolge gilt hervorzuheben, dass das MP17-Protein in *Arabidopsis* phänotypische Änderungen in Form einer starken Wuchsretardierung und Entwicklungsverzögerung sowie chlorotische Aufhellungen in den *source*-Blättern hervorrief, was dem MP17-vermittelten Phänotyp in Tabak (Herbers *et al.*, 1997) sehr ähnlich war (3.1.3.1, Abb. 24A,B). Analysen des Kohlenhydratstatus in den transgenen Linien bestätigten, dass die phänotypischen Änderungen mit der Akkumulation von löslichen Zuckern und Stärke in *source*-Blättern korrelierten und damit eine Inhibierung des Assimilatexportes als Ursache für die beobachteten Effekte wahrscheinlich machte (Abb. 24C). Es gibt inzwischen direkte Hinweise, dass *Arabidopsis* wie Tabak und Kartoffel eine apoplastische Phloembeladung aufweist, da eine Mutante mit Defekt im Saccharosetransporter SUC2 einen charakteristischen Export-defizienten Phänotyp in Form von verminderten Saccharosetransportraten, massiver Kohlenhydratakkumulation in *source*-Blättern und drastischer Inhibierung von Wachstum und Reproduktion zeigte (Gottwald *et al.*, 2000). Ein veränderter metabolischer Status im Phloem, wie zuvor in den hoch-exprimierenden MP17-transgenen Tabakpflanzen beobachtet (Herbers *et al.*, 1997), könnte somit auch in *Arabidopsis* die Phloembeladung über die Aktivität der Saccharosetransporter beeinflusst haben. Wahrscheinlicher sind aber Effekte der MP17-vermittelten Änderungen plasmodesmaler Transporteigenschaften und der damit verbundenen Modifikation der symplastischen Transportkapazität für Saccharose. Über GFP-Fluoreszenzanalysen und Immunogold-Markierungen in den MP17:GFP transgenen Linien konnte bestätigt werden, dass MP17 auch in *Arabidopsis* in vergleichbarer Weise wie in Tabak- (Hofius *et al.*, 2001, diese Arbeit) und Kartoffelpflanzen (Schmitz *et al.*, 1997) eine generelle Affinität zu PDs des vaskulären und nicht-vaskulären *source*-Gewebes besitzt (3.1.3.3, Abb. 27 und Abb. 28). Dabei erwies sich das mit dem binären Konstrukt p35S-1 in *Arabidopsis* erzielte Expressionsniveau, im Unterschied zu transgenen Tabakpflanzen, als ausreichend, um Kohlenhydratakkumulation und Wachstumshemmung zu induzieren (Linie 35S-MP17:GFP-

16) (3.1.3.2, Abb. 25 und Abb. 26). Allerdings war auch in *Arabidopsis* eine expressionsabhängige Modulation des Kohlenhydratstatus festzustellen, denn in Übereinstimmung mit niedrig-exprimierenden MP17:GFP transgenen Tabaklinien (3.1.1.4, Tab. 3-2) war bei geringem MP17-Proteingehalt eine Verminderung des Stärkegehaltes festzustellen (Linie 35S-MP17:GFP-9). Dies lässt auf gesteigerte Exportraten aus den *source*-Blättern möglicherweise infolge einer erhöhten plasmodesmalen Permeabilität im Mesophyll schließen, und tatsächlich gibt es erste Hinweise, dass die entsprechende Linie eine leichte Zunahme (15-20%) des oberirdischen Frisch- und Trockengewichtes gegenüber den Kontrollen aufweist (Daten nicht gezeigt). Insgesamt lassen sich aus der plasmodesmalen Markierung durch MP17 sowie der dosisabhängigen Einflussnahme auf Pflanzenentwicklung und Assimilatverteilung konservierte Wirkmechanismen und MP17-Interaktionspartner zwischen *Arabidopsis* und *Solanaceen* ableiten. Damit war die Grundvoraussetzung gegeben, um die mutagenisierte Population einer phänotypischen *Arabidopsis*-Linie nach MP17-Suppressormutanten zu durchmustern, die infolge veränderter Bindungseigenschaften der potentiellen MP17-Rezeptoren die MP17-vermittelte Wachstumshemmung revertierten.

#### **4.1.5 Identifizierung von MP17-Suppressormutanten mit potentiellen Defekten in MP17-Interaktionspartnern**

Auf Basis eines einfachen und optimierten Testsystems, dass die Selektion von Mutanten mit Wiltyp-ähnlichem Wachstum aus der EMS-mutagenisierten Population der phänotypischen Linie 35S-MP17:GFP-16 erlaubte (3.1.3.4., Abb. 29), wurden aus ~84000 ausgelegten Samen der M2-Nachkommenschaft etwa 30 Revertanten identifiziert und über die plasmodesmale Lokalisierung und Expression des MP17:GFP-Proteins klassifiziert. Von den Mutanten, die dabei weder ein GFP-Fluoreszenzsignal noch eine Proteinakkumulation in der *Western*-Analyse zeigten, wurden zudem über *Northern*-Analyse diejenigen Revertanten aussortiert, die wahrscheinlich infolge von Mutationen im Transgen keine Expression oder aber Anzeichen von Transkriptinstabilität zeigten (3.1.3.6, Abb. 30). Die übrigen Mutanten ließen sich in verschiedene Kategorien einteilen (3.1.3.6, Tab. 3-3), was darauf hindeutet, dass die Suppression des MP17-vermittelten Phänotyps auf unterschiedlichen Mutationen des PD-lokalisierten oder auch eines putativen, am plasmodesmalen „Targeting“ beteiligten intrazellulären Rezeptors beruhen kann.



**Abb. 54:** Schematische Darstellung möglicher Mutationen des putativen plasmodesmalen (pRz) oder intrazellulären MP17-Rezeptors (iRz), die zur Aufhebung des Transportblockes in den Wachstums-retardierten MP17:GFP transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (WT) führen. Eine veränderte Positionierung des MP17 an den PDs resultiert in keinen detektierbaren Änderungen der punktuellen GFP-Fluoreszenz im Zellwandbereich, der Effekt auf den Transport ist aber vermindert (M1). Die Aufhebung der plasmodesmalen Bindung revertiert ebenfalls den Phänotyp, das Fusionsprotein ist nicht mehr mit PDs assoziiert und könnte daher rasch über das Ubiquitin/26S-Proteasomsystem selektiv abgebaut werden (M2). Möglicherweise wird es auch durch Assoziation mit intrazellulären Komponenten (ER, Cytoskelett) stabilisiert und bleibt als Protein detektierbar. Fehlende plasmodesmale Bindung kann auch Folge der Inhibierung des intrazellulären Transportes durch Mutation eines putativen intrazellulären Rezeptors (z.B. molekulare Chaperone) sein (M3), was die gleichen Konsequenzen wie M2 hat. PD; Plasmodesma; MP, Movement Protein; Zw, Zellwand; pRz, plasmodesmaler Rezeptor; iRz, intrazellulärer Rezeptor; ER, Endoplasmatisches Retikulum; Ubi, Ubiquitinierung.

Wie in Abb. 54 modellhaft dargestellt, könnte eine Mutation im plasmodesmalen Rezeptor zu einer veränderten Positionierung des MP17 an den PDs geführt haben, was den MP17-vermittelten Einfluss auf die Transportprozesse vermindert (Abb. 54, M1). In diesem Fall würde man trotz revertiertem Phänotyp weder eine deutliche Änderung der plasmodesmal lokalisierten GFP-Fluoreszenz noch des Proteinsignals in der *Western*-Analyse erwarten. Beispiele dafür sind die Mutanten PG10-3-1 und PG8-6-2 (3.1.3.6, Abb. 31). Zum anderen könnte aber die Suppression des MP17-Effektes durch eine inhibierte MP17-Bindung an den plasmodesmalen Rezeptor hervorgerufen worden sein (Abb. 54, M2). Bei diesen Mutanten würde man eine reduzierte oder nicht mehr lokalisierbare GFP-Fluoreszenz im Zellwandbereich postulieren, während das Fusionsprotein mittels *Western*-Analyse entweder detektierbar bleibt oder bei cytoplasmatischer Lokalisation rasch durch das Ubiquitin/26S-Proteasomsystem proteolytisch abgebaut wird. Zu dieser Klasse würde man einerseits die Mutanten PG6-2-1, PG6-3-1 und PG8-2-2 zählen, die nur ein leicht vermindertes Expressionsniveau aber fehlende GFP-Markierung in den Zellwänden zeigten (3.1.3.6, Abb. 31 und Abb. 32). Andererseits sind bei postuliertem proteolytischen Abbau des Fusionsproteins auch PG10-5-1 und PG23-2-1 dieser Kategorie zuzuordnen, für die ausschließlich die Akkumulation MP17:GFP-spezifischer Transkripte nachgewiesen wurden.

Es bleibt aber zu klären, ob nicht Mutationen im Transgen zu „premature“ Stopkodons geführt haben könnten, infolgedessen ebenfalls kein Protein nachweisbar wäre. Zudem kann die Inhibierung der plasmodesmalen Lokalisierung auch durch ein verändertes „Targeting“ des MP17:GFP-Proteins verursacht worden sein, also durch Mutationen in einem potentiellen intrazellulären Rezeptor (Abb. 54, M3). Dies hätte vergleichbare Auswirkungen auf die Stabilität und Detektion des Fusionsproteins wie ein Defekt im plasmodesmalen Interaktionspartner (M2) und könnte daher von diesem auf Basis der Primärcharakterisierung nicht unterschieden werden.

Neben der Reversion des MP17-vermittelten Phänotyps können die beobachteten entwicklungspezifischen Veränderungen in den Suppressormutanten als weiteres Indiz für die Modifikation der plasmodesmalen Transporteigenschaften und damit der interzellulären Kommunikation betrachtet werden. Auffällig waren Verschiebungen des Blühzeitpunktes in einigen Mutanten (3.1.3.6, Abb. 33), was in direktem Zusammenhang mit Änderungen im Transport und der Verteilung von Assimilaten stehen kann. Saccharose wird neben den Phytohormonen Gibberellin und Cytokinin als Signalstoff der Blühinduktion angesehen und dazu auf symplastischen Weg über das Phloem und die PDs in das Apikalmeristem transportiert (Bernier *et al.*, 1993). So führte die photoperiodische Blühinduktion in *Sinapis alba* zu einem raschen und transienten Anstieg von Saccharose im Phloemexudat des apikalen Sprossgewebes (Bernier *et al.*, 1993), und auch in *Arabidopsis* konnte die Effizienz der photoperiodisch-vermittelten Blühinduktion mit der Amplitude eines gesteigerten Saccharoseexportes aus den *source*-Blättern korreliert werden (Corbesier *et al.*, 1998). Anhand von Transportstudien mit einem Phloem-mobilen Farbstoff wurde die unmittelbare Bedeutung der symplastischen Kontinuität zwischen Blatt und Sprossspitze für die Blühinduktion verdeutlicht. So zeigte sich übereinstimmend in verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen und -Mutanten bei unterschiedlichen photoperiodischen Induktionsbedingungen eine direkte Korrelation zwischen der Ausbildung der Blütenprimordien und der symplastischen Isolierung des apikalen Sprossmeristems für den applizierten Farbstoff (Gisel *et al.*, 2002). Es wurde daher vermutet, dass auf diese Weise der Import eines systemischen Blührepressors inhibiert wird und somit das reproduktive Entwicklungsprogramm im Meristem induziert werden kann. Folglich kann in den identifizierten Suppressormutanten die reproduktive Entwicklung durch Änderungen in den plasmodesmalen Transporteigenschaften direkt beeinflusst worden sein. Allerdings muss zunächst mit molekularen und genetischen Analysen verifiziert werden, dass nicht multiple Mutationen für einige der entwicklungspezifischen Effekte in den Mutanten verantwortlich sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem genetischen Ansatz in *Arabidopsis* ein effizientes System zur Isolierung von Mutanten mit potentiellen Defekten in MP-interagierenden Wirtsfaktoren etabliert wurde. Dabei lassen die verschiedenen Klassen von MP17-Suppressormutanten sowie die beobachteten Effekte auf Wachstum und Entwicklung mehrere MP17-Rezeptoren vermuten, die auf unterschiedliche Weise zum intrazellulären und plasmodesmalen Transport endogener Makromolekülen beitragen. In Zukunft müssen zur genetischen Charakterisierung der Mutanten Rückkreuzungen in den Parentalhintergrund vorgenommen und zur Genklonierung eine Kartierungspopulation über das Einkreuzen der Mutationen in eine MP17:GFP exprimierende, phänotypische Linie im *Landsberg erecta* (*Ler*)-Hintergrund erstellt werden. Zu diesem Zweck wurden inzwischen nach Transformation des p35S-1 Konstruktes in den *Ler*-Ökotypen transgene Linien erhalten, für die in vergleichbarer Weise wie im Col-0 Hintergrund eine plasmodesmale Lokalisation des Fusionproteins sowie phänotypische Änderungen verifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2 Identifizierung eines DnaJ-ähnlichen Proteins als Capsid Protein-bindenden Wirtsfaktor für die Ausbreitung von Potyviren**

Im zweiten Teil der Arbeit sollten mit Hilfe des Zwei-Hybrid Systems in Hefe pflanzliche Interaktionspartner des PVY Capsid Proteins (CP) identifiziert und ihre Bedeutung während der Infektion *in planta* analysiert werden. Potyviralen CPs wird aufgrund ihrer Beteiligung an der Assemblierung des Transportkomplexes sowie der Fähigkeit zur Modifikation der plasmodesmalen Leitfähigkeit eine MP-ähnliche Funktion beim intra- und interzellulären Transport zugeschrieben (Dolja *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 1997), doch waren interagierende Wirtsfaktoren und die zugrundeliegende Transportmechanismen bisher weitestgehend unbekannt (Revers *et al.*, 1999). Mit der Identifizierung eines PVY CP-bindenden DnaJ-ähnlichen Proteins, NtCPIP1, und der Verifizierung der funktionellen Signifikanz der Interaktion *in planta*, konnte somit erstmals die Beteiligung von molekularen Chaperonen und die Rekrutierung von HSP70-ähnlichen Proteinen bei der zellulären Ausbreitung von Potyviren postuliert werden.

#### 4.2.1 Spezifität der Interaktion zwischen PVY CP und NtCPIP1 und Identifizierung von Interaktionsdomänen

Das im Hefe Zwei-Hybrid System identifizierte und spezifisch mit PVY CP interagierende NtCPIP1-Protein ist aufgrund der charakteristischen aminoterminalen J-Domäne (3.2.1.1., Abb. 35) in die Familie der DnaJ-ähnlichen (HSP40) Proteine einzuordnen (Buckau und Horwich, 1998). Generell gelten DnaJ-Proteine als Co-Chaperone und Schlüsselregulatoren von HSP70-Proteinen, die neben der Funktion bei der Hitzestressantwort, an verschiedenen zellulären Prozessen wie Proteinfaltung, Assemblierung von Proteinkomplexen sowie am Proteintransport zwischen Zellkompartimenten beteiligt sind (zusammengefasst in Bukau und Horwich, 1998; Ellis und Hartl, 1999). Die regulatorische Funktion der DnaJ-Proteine wird dabei vermutlich über die Interaktion der J-Domäne mit den HSP70 Partnerproteinen vermittelt, wodurch deren ATP-Hydrolyseaktivität stimuliert, eine Konformationsänderung induziert und die Substrataffinität erhöht wird (Kelley, 1998). In der HSP40-Familie wurden neben der J-Domäne weitere strukturelle Bereiche charakterisiert: eine Glycin- und Phenylalanin-reiche Region, eine Cystein-reiche Zinkfinger-Domäne und eine weniger konservierte C-terminale Domäne, die für die Substratbindung von Bedeutung ist (Kelley, 1998). Da keines dieser Motive zusätzlich in der NtCPIP1-Proteinsequenz identifiziert werden konnte, ließ sich NtCPIP1 in eine DnaJ-Unterklasse eingruppiert, deren Vertreter nur über die J-Domäne verfügen und beispielsweise eine Rolle beim Proteinimport in das ER (Zimmermann, 1998), die Mitochondrien (Rassow *et al.*, 1994), und in pflanzliche Peroxisomen (Crookes und Olsen, 1998) spielen. Zu dieser Untergruppe zählen interessanterweise auch DnaJ-ähnliche Proteine aus Tabak, Tomate und *Arabidopsis*, die als Interaktionspartner des TSWV-MP (NSm) im Hefe Zwei-Hybrid System identifiziert wurden (Soellick *et al.*, 2000; von Bargaen *et al.*, 2001) und signifikante Homologie (bis zu 59,5% Identität) zu NtCPIP1 zeigten (3.2.1.1, Abb. 35). In den Proteinsequenzen der NSm-interagierenden DnaJ-Proteine wurden zusätzlich zu der J-Domäne vier Lysin-reiche Domänen beschrieben (von Bargaen *et al.*, 2001), die partiell auch in NtCPIP1 zu finden sind. Allerdings waren NtCPIP1 und NtDnaJ\_M541 im Zwei-Hybrid System in ihrer jeweiligen Interaktion mit PVY CP bzw. NSm nicht reziprok austauschbar, wie auch alle anderen getesteten potyviralen CPs nicht mit NtDnaJ\_M541 interagierten (3.2.1.2, Abb. 37). Nur für das TEV CP konnte neben PVY CP eine spezifische Interaktion mit NtCPIP1 detektiert werden, die sich auch in einem separaten Zwei-Hybrid Ansatz bestätigen ließ, bei dem

mehrere NtCPIP1-kodierende cDNA-Klone als Bindungspartner von TEV-CP identifiziert wurden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt lässt sich daraus eine relativ hohe Spezifität für die Interaktion der verschiedenen viralen Proteine mit Vertretern der DnaJ-ähnlichen Proteine postulieren. Höchste Homologie zu NtCPIP1 (bis zu 63,4% Identität) zeigten allerdings einige funktionell nicht charakterisierte DnaJ-Proteine aus *Arabidopsis*, die innerhalb der DnaJ-Familie mit insgesamt 89 Vertretern phylogenetisch eine eigene Klasse bilden (Miernyk, 2001). Es bleibt zu bestimmen, ob diese Proteine mit PVY CP zu interagieren vermögen, denn *Arabidopsis* stellt für PVY im Unterschied zu TSWV keinen suszeptiblen Wirt dar (Edwardson, 1974; Horvath, 1979).

Potyvirale CPs verfügen generell über drei Domänen, wobei die variablen N- und C-terminalen Regionen an der Oberfläche der Viruspartikel exponiert sind und die zentrale Domäne RNA bindet (Dolja *et al.*, 1994). Auf Basis genetischer Analysen an einem infektiösen, mit dem *GUS*-Reporter gen versehenen TEV cDNA-Klon konnte zuvor gezeigt werden, dass der zentrale Bereich essentielle Bedeutung sowohl für die Assemblierung als auch für den Zell-zu-Zell Transport hat, während die N- und C-terminalen Regionen entscheidend für den Langstreckentransport sind (Dolja *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1995). Die Bedeutung der zentralen Domäne für die Zell-zu-Zell Transportfunktion potyviral CPs wurde über Mikroinjektionen rekombinanter CPs des *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) und des *Lettuce mosaic virus* (LMV) bestätigt, da Substitutionen hochgradig konservierter Aminosäuren (Dolja *et al.*, 1991) die Fähigkeit zur plasmodesmalen Modifikation und interzellulären Ausbreitung stark verminderten (Einzel- und Doppel-Substitutionsmutanten) oder vollständig aufhoben (Dreifach-Substitutionsmutanten) (Rojas *et al.*, 1997). Mit analogen Mutations- und Deletionskonstrukten von PVY CP konnte im Zwei-Hybrid System ebenfalls die zentrale Domäne als entscheidend für die Interaktion mit NtCPIP1 bestimmt werden. Die für den Langstreckentransport relevanten N- und C-terminalen Bereiche hatten hingegen keine Bedeutung für die Bindung (3.2.1.3, Abb. 38). Dies ist ein indirekter Hinweis, dass die zuvor beschriebenen Konsequenzen einer mutierten zentralen CP-Domäne für die Assemblierungskompetenz und die Zell-zu-Zell Ausbreitung des TEV:GUS sowie für die plasmodesmale Transportfähigkeit rekombinanter CPs auf die Inhibierung kompatibler Interaktionen mit Wirtsfaktoren zurückzuführen sind, was bereits von Dolja *et al.* (1994, 1995) postuliert wurde. Weiter lässt sich ableiten, dass NtCPIP1 als PVY CP-bindender Wirtsfaktor vermutlich eine Funktion bei der Assemblierung des potyviralen Transportkomplexes und/oder beim intrazellulären und plasmodesmalen „Targeting“ ausübt.



Die Deletionsanalysen des NtCPIP1-Proteins zeigten darüber hinaus, dass die J-Domäne nicht in die Interaktion mit PVY CP involviert ist (3.2.1.3, Abb. 39). Dies ist in Übereinstimmung mit der zuvor postulierten Funktion der J-Domäne, über Interaktion mit der ATPase-Domäne der HSP70-Proteine die Bindung von Substraten zu vermitteln, die zuvor durch DnaJ rekrutiert wurden (Kelley, 1999; Laufen *et al.*, 1999). Da allerdings alle weiteren N- und C-terminalen Deletionen von NtCPIP1 die Interaktion vollständig inhibierten und es in Hefezellen wegen des zu niedrigen Expressionsniveaus der AD-Plasmide nicht möglich war, die korrekte Expression der Deletionsmutanten über *Western*-Analyse zu verifizieren, müssen in Zukunft alternative *in vitro*-Bindungsassays gewählt werden, um die Substratbindungsdomäne von NtCPIP1 zu identifizieren.

#### **4.2.2 Transiente und lokale Virusresistenz gegenüber PVY in *NtCPIP1*-inhibierten Pflanzen**

Die biologische Signifikanz der im Zwei-Hybrid System identifizierten und charakterisierten Interaktion zwischen PVY CP und NtCPIP1 konnte mit Hilfe NtCPIP1-defizienter transgener Pflanzen verifiziert werden, die eine verminderte Suszeptibilität gegenüber PVY während der frühen Infektionsphase ausprägten. Das Silencing von *NtCPIP1* wurde dabei durch stabile Transformation eines RNAi-Konstruktes erzielt, das die Expression doppelsträngiger (ds) RNA-Fragmente in Form selbst-komplementärer „hairpin“ RNA vermittelte. Diese wirken als äußerst effiziente Induktoren des „post-transcriptional gene silencing“ (PTGS) und führen damit in transgenen Pflanzen zu einer wesentlich höheren Suppressionsstärke und -häufigkeit von Endogenen als konventionelle Co-Suppressions- und Antisensekonstrukte (Chuang und Meyerowitz, 2000; Levin *et al.*, 2001, Smith *et al.*, 2000; Wesley *et al.*, 2001). Tatsächlich erwiesen sich diese herkömmlichen Strategien zunächst als ineffizient und unzureichend, um die Genexpression von *NtCPIP1* in transgenen Pflanzen zu hemmen (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung des hpRNA-Konstruktes hingegen führte in mehreren Linien zu einer deutlichen Reduktion der *NtCPIP1*-spezifischen Transkripte, wobei allerdings keine vollständige, einem „knock-out“ oder Nullallel vergleichbare Repression erzielt wurde (3.2.2.2, Abb. 40; 3.2.2.4, Abb. 42). Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen, wonach das durch hpRNA-Konstrukte induzierte Silencing zu einer dramatisch reduzierten aber detektierbaren Genexpression führt (Wesley *et al.*, 2001). Dabei kann die Suppressionsstärke verschiedener Linien durchaus variieren, doch liegt die Hemmung

über die gesamte Bandbreite auf einem niedrigeren Niveau als in antisense- und co-supprimierten Pflanzen.

Die Hemmung der NtCPIP1-Genexpression führte in vier verschiedenen Linien und unabhängigen Infektionsexperimenten zu einer vergleichbaren Reduktion des Virusgehaltes um 50-60% in inokulierten Blättern im Vergleich zu den Kontrollen (3.2.2.3, Abb. 41). Allerdings war diese erhöhte Resistenz nur 4 Tage nach Infektion detektierbar und resultierte nicht in einer verminderten systemischen Ausbreitung des Virus. Diese transiente und lokale Resistenz machte deutlich, dass die nach Silencing von NtCPIP1 verbliebene Restmenge CP-bindender DnaJ-Proteine ausreichend war, um eine primäre Limitierung während der frühen Infektionsphase zu überkommen und eine vergleichbare systemische Besiedelung wie in den Kontrollen zu ermöglichen. Die Kompensation des Verlustes an CP-interagierenden Wirtsfaktoren kann dabei mehrere Ursachen haben:

- (i) Im einfachsten Fall kann man postulieren, dass die über die Expression des hpRNA-Konstruktes vermittelte Hemmung von NtCPIP1 nicht effizient genug war, um die endogenen Proteingehalte unter ein für die zelluläre Ausbreitung von PVY kritisches Niveau zu bringen. Da *NtCPIP1*-spezifische Transkripte aufgrund der niedrigen endogenen Expression in Kontrollpflanzen nur unzureichend über *Northern Blot*-Hybridisierung zu detektieren waren und zudem die Signale in den transgenen Linien durch den charakteristischen „Schmier“ der Transgen-Abbauprodukte überdeckt wurden, konnte das Silencing nur qualitativ über RT-PCR bestimmt werden. Eine exakte Quantifizierung der Suppressionsstärke und Korrelation mit den beobachteten Auswirkungen auf die Virusresistenz war demnach nicht möglich.
- (ii) Alternativ bestand die Möglichkeit, dass das Silencing von NtCPIP1 nicht stabil war und während der Virusinfektion überkommen wurde. So ist in den letzten Jahren gezeigt worden, dass PTGS einen natürlichen pflanzlichen Abwehrmechanismus gegenüber replizierenden Viren darstellt (zusammengefasst in Voinnet, 2001), aber viele Viren dieser Strategie mit der Aktivität Virus-kodierter Proteine begegnen, die PTGS effektiv supprimieren (zusammengefasst in Carrington *et al.*, 2001; Li und Ding, 2001). Das multifunktionale potyvirale HC-Pro konnte dabei als einer der ersten Silencing-Suppressoren identifiziert werden (Brigneti *et al.*, 1998). Im Folgenden wurde gezeigt, dass das PVY (N-Stamm) HC-Pro nicht nur in artifiziellen *Agrobacterien*-Infiltrationsassays das Silencing von Reportergenen unterdrückt (Brigneti *et al.*, 1998), sondern auch während einer Virusinfektion die sense- und antisense-vermittelte Hemmung eines Endogens in transgenen Pflanzen revertieren kann (Di Serio *et al.*, 2001). Die Analyse der *NtCPIP1*-Transkriptakkumulation in lokalen und systemischen Blättern PVY-infizierter Kontroll- und *NtCPIP1*-supprimierter

Pflanzen ergab allerdings keinen Hinweis, dass das RNA-Silencing während der Infektion revertiert wurde (3.2.2.4, Abb. 42). Dennoch lässt sich nicht ausschließen, dass auf stark infizierte Blattbereiche begrenzt, eine lokale Suppression des Silencing stattgefunden hat, dieses aber durch „Verdünnungseffekte“ bei der Probenaufbereitung nicht detektierbar war.

(iii) Schließlich wurde als weitere Möglichkeit in Betracht gezogen, dass der partielle Verlust von *NtCPIP1* durch alternative CP-bindende Isoformen während der Infektion kompensiert wurde. Es konnten *NtCPIP2a* und *NtCPIP2b* kodierende cDNA-Klone über ein konventionelles Phagen cDNA-Screening identifiziert werden, und im Zwei-Hybrid System zeigten diese untereinander ähnlichen Proteine (97,4% Identität) eine vergleichbare Spezifität der Interaktion mit potyviralen CPs wie *NtCPIP1*. Da die bisherige Expressionsanalyse von *NtCPIP2a/b* während der Infektionskinetik in Kontroll- und *NtCPIP1*-gehemmten Pflanzen kein signifikantes Silencing der Isoformen durch das *NtCPIP1*-spezifische hpRNA-Konstrukt erkennen ließ, könnte die Expression der *NtCPIP1*-Isoformen tatsächlich zur Kompensation der *NtCPIP1*-Defizienz beigetragen haben (Daten nicht gezeigt). Um diese Möglichkeit abschließend zu untersuchen, wäre es sinnvoll, die Genexpression von *NtCPIP2a/2b* in transgenen Pflanzen einerseits Isoform-spezifisch zu hemmen und zum anderen mit Hilfe von Hybridkonstrukten ein simultanes Silencing der verschiedenen Isoformen zu induzieren. In letzterem Fall würde man eine deutlich höhere und stabilere Virusresistenz postulieren.

Unter dem Gesichtspunkt einer verbesserten und dauerhaften Virusresistenz gegenüber PVY und anderen Potyviren könnte die Expression dominant-negativer Mutanten der verschiedenen Isoformen eine alternative Strategie zum RNA-Silencing in transgenen Pflanzen darstellen. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre die konstitutive Expression N-terminaler Deletionskonstrukte, die keine J-Domäne mehr aufweisen. Dies würde die Bindungsfähigkeit mit dem viralen Partner nicht beeinflussen, aber die potentielle Rekrutierung von HSP70-Proteinen für die zelluläre Virusausbreitung inhibieren.

#### **4.2.3 Mögliche Rolle von molekularen Chaperonen beim intrazellulären und plasmodesmalen Transport von Potyviren**

Die spezifische Interaktion zwischen PVY CP und einem pflanzlichen Wirtsfaktors aus der Familie der DnaJ-ähnlichen Proteine legt die Beteiligung HSP70-abhängiger Mechanismen an der potyviralen Virusausbreitung nahe. Generell induzieren eine Reihe tierischer aber auch pflanzlicher Viren die Expression von HSP70-Chaperonen oder rekrutieren zelluläre HSP70 über Interaktion mit Virus-kodierten J-Domänen (zusammengefasst in Sullivan und Pipas,

2001; Maule *et al.*, 2002). Die spezifische und transiente Induktion von HSP70 in Zellen der vordersten Ausbreitungsfront verschiedener Virusinfektionen, wie beispielsweise des *Pea seed-borne mosaic potyvirus*, weist indirekt auf eine mögliche Rolle dieser Chaperone beim plasmodesmalen Makromolekültransport hin (Aranda *et al.*, 1996; Havelda und Maule, 2000). Den besten Beleg für eine direkte Beteiligung von HSP70 am Virustransport liefern aber Closteroviren, die als einzige Virusgruppe für ein virales HSP70 Homolog (HSP70h) kodieren. So fungiert das HSP70h des *Beet yellows closterovirus* (BYV) als virales MP (Peremyslov *et al.*, 1999), lokalisiert dabei an PDs (Medina *et al.*, 1999) und interagiert mit Mikrotubuli (Karasev *et al.*, 1992). Daneben hat das HSP70h im Zusammenspiel mit dem Capsid Protein essentielle Bedeutung für die Assemblierung und die Stabilität des Virions, und vermittelt als integraler Bestandteil des Transportkomplexes über die intrinsischen Signale zur Mikrotubuli- und PD-Assoziation dessen intrazellulären Transport (Alzhanova *et al.*, 2001). In Analogie zur postulierten mechanischen Rolle von HSP70 Proteinen beim Proteinimport in das ER und die Mitochondrien (Pilon und Schekman, 1999) könnte das HSP70h zudem über die Bereitstellung mechanischer Energie als molekularer Motor der plasmodesmalen Translokation dienen (Alzhanova *et al.*, 2001). Basierend auf diesen Funktionen des HSP70h lässt sich daher spekulieren, dass Potyviren sowohl für die Assemblierung des Transportkomplexes als auch für den plasmodesmalen Transport zelluläre HSP70-Proteine rekrutieren und zwar über die Interaktion des viralen CP mit DnaJ-Proteinen. Aufgrund der Lokalisierung von HSP70-Proteinen im Phloemexudat wurde bereits früher angenommen, dass spezialisierte endogene HSP70-Proteine existieren, die die Kapazität zum eigenen Transport durch PDs im GZ/SE-Komplex besitzen (Schobert *et al.*, 1995). Mit der Identifizierung einer HSP70-Unterklasse aus *Cucurbita maxima*, die über ein intrinsisches Motiv zum plasmodesmalen Targeting verfügt, konnte kürzlich der entsprechende Nachweis erbracht werden (Aoki *et al.*, 2002). Durch Rekrutierung von Vertretern dieser HSP70-Klasse über die DnaJ-ähnlichen Co-Chaperone könnte damit der potyvirale Transportkomplex in Richtung der PDs gelenkt werden, möglicherweise durch HSP70-vermittelte Interaktion mit dem Cytoskelett. Ein vergleichbarer Transportmechanismus wurde auch für den TSWV Tosspovirus postuliert, dessen MP NSm mit dem helicalen Nucleocapsid und den zuvor erwähnten DnaJ-ähnlichen Proteinen aus verschiedenen Pflanzenspezies interagiert (Soellick *et al.*, 2000). Allerdings konnte die funktionale Bedeutung der Interaktion für der TSWV-Infektion bisher *in planta* nicht nachgewiesen werden. Insgesamt scheint sich aber abzuzeichnen, dass die assistierende Funktion molekularer Chaperone ein generelleres Prinzip des Virustransportes ist als zuvor angenommen, und sich dieses trotz Unterschieden in den

jeweils involvierten viralen und pflanzlichen Faktoren in so verschiedenen Virusgruppen wie denen der Closteroviren, Tospoviren und Potyviren ausgeprägt hat.

### **4.3 Funktionelle Analyse des *SXD1*-Orthologs in Kartoffeln zeigt eine essentielle Rolle der Tocopherol Cyclase für den plasmodesmalen Assimilattransport**

Im dritten Teil der Arbeit sollte über einen RNA-Silencing Ansatz die Bedeutung eines *SXD1*-Orthologs für die Ausbildung funktionaler PDs und für die Synthese von Tocopherolen in transgenen Kartoffelpflanzen analysiert werden. Diese duale Funktion war zuvor über die Charakterisierung der Assimilatexport-defizienten Maismutante *sxd1* (Russin *et al.*, 1996; Provencher *et al.*, 2001) sowie der Vitamin E-defizienten *Arabidopsis*-Mutante *vte1* (Porfirova *et al.*, 2002) für das *SXD1*/*VTE1*-Protein abgeleitet worden. Mit Hilfe *SXD1*-gehemmter Kartoffellinien konnte somit erstmals innerhalb eines pflanzlichen Systems demonstriert werden, dass der Verlust der Tocopherol Cyclase-Aktivität und die dadurch bedingte Inhibierung der Tocopherolbiosynthese direkte Auswirkungen auf den Assimilattransport hat und in einem Exportblock für Photoassimilate aus *source*-Blättern resultiert.

#### **4.3.1 *SXD1*-Ortholog in Kartoffel kodiert eine Tocopherol Cyclase**

Über die *in silico* Identifizierung eines *SXD1*-homologen EST-Klons und die Amplifizierung der flankierenden 5' und 3' cDNA-Fragmente konnte das *SXD1*-Gen aus Kartoffel kloniert werden (s. Anhang I.5). Das abgeleitete Protein zeigte höchste Homologie (62% Identität auf Proteinebene) zu den zuvor charakterisierten *SXD1*- bzw. *VTE1*-Proteinen aus Mais und *Arabidopsis* sowie signifikante Ähnlichkeit mit orthologen Proteinen verschiedener photosynthetischer Mikroorganismen (Abschnitt II, s. Anhang). Nach rekombinanter Expression von *StSXD1* in *E.coli* konnte funktionales Protein erhalten werden, das hohe Tocopherol Cyclase-Aktivität zeigte und in vergleichbarer Weise wie das *VTE1*-Protein aus *Arabidopsis* (Porfirova *et al.*, 2002) die Synthese sowohl von  $\gamma$ -Tocopherol als auch  $\gamma$ -Tocotrienol vermittelte (3.3.1, Abb. 45). Dabei hatte das postulierte plastidäre Transitpeptid (Provencher *et al.*, 2001) keinen Einfluss auf die Aktivität des rekombinanten Proteins. Die *in vitro* Daten konnten in transgenen Kartoffelpflanzen über das RNAi-vermittelte Silencing von *StSXD1* verifiziert werden. Nach Transformation eines *StSXD1*-spezifischen hpRNA-Konstruktes wurden transgene Linien erhalten, die drastisch verminderte Cyclase-Aktivitäten

in den Blättern zeigten und infolgedessen eine deutliche Vitamin E-Defizienz ausprägten (3.3.2, Abb. 47). Dabei konnte eine Linie generiert werden (StSXD1-RNAi-22), die nur noch 0,2% der Cyclase-Aktivität und 0,7% des  $\alpha$ -Tocopherolgehaltes der entsprechenden WT-Kontrollen aufwies und somit den für die *vte1*-Nullmutante beschriebenen Veränderungen im Tocopherolstoffwechsel (Porfirova *et al.*, 2002) sehr nahe kam. Die erhaltenen transgenen Linien demonstrierten zudem die Effizienz des verwendeten hpRNA-Konstruktes, mit dem bei generell starker Hemmung eine wünschenswerte Variabilität in der Ausprägung des Effektes erzielt wurde (Wesley *et al.*, 2001). Insgesamt wurde damit sowohl *in vitro* als auch *in planta* eindeutig belegt, dass das StSXD1-Ortholog eine Tocopherol Cyclase kodiert, die essentielle Bedeutung für die Biosynthese von Tocopherolen in Kartoffelpflanzen hat.

#### 4.3.2 Verminderte Stresstoleranz in Tocopherol-defizienten Kartoffelpflanzen

Tocopherole sind lipophile Substanzen mit antioxidativen Eigenschaften, die ausschließlich von photosynthetischen Organismen synthetisiert werden. Sie sind essentieller Bestandteil der tierischen Ernährung, da sie verschiedene reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale auf chemischem oder physikalischem Wege entgiften können und somit mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) vor Lipidoxidation schützen (Fukuzawa und Gebicky, 1983; Bramley *et al.*, 2000). In Pflanzen gibt es Hinweise, dass Tocopherole ähnlich wie in tierischen Systemen als Antioxidantien und Radikalfänger wirken (Fryer, 1992) und damit eine wichtige Funktion beim Schutz gegenüber verschiedenen Stressbedingungen ausüben (zusammengefasst in Munné-Bosch und Alegre, 2002). Darüber hinaus wurde Tocopherolen aufgrund der direkten Interaktion mit Membranlipiden eine Rolle bei der Stabilisierung von Membranen und der Kontrolle der Membranpermeabilität zugesprochen (Munné-Bosch und Alegre, 2002). Ältere Befunde lassen zudem die Beteiligung von Tocopherolen bei der Blüteninduktion (Michniewicz und Kamienska, 1964, Michniewicz und Kamienska 1965; Baszynski, 1967) sowie Pflanzen/Pathogen-Interaktionen (Castle und Day, 1984) vermuten. Allerdings sind in den meisten Fällen die Hinweise nur indirekter Natur, so dass ein endgültiger Nachweis für die *in vivo* Funktion von Vitamin E in Pflanzen noch aussteht.

Über die Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz konnte verifiziert werden, dass die Reduktion des Vitamin E-Gehaltes in transgenen Kartoffelpflanzen der Linie 22 im Vergleich zu WT-Kontrollen in einer deutlich stärkeren Reduktion der photosynthetischen Quantenausbeute nach photooxidativen Stress resultierte (3.3.3, Abb. 48). Auch zeigte sich der Chlorophyllgehalt gegenüber den Kontrollen nach der Stressapplikation stärker

vermindert (23%) als vorher in Niedrig-Licht adaptierten Pflanzen (9%). Dies weist insgesamt auf eine höhere Sensitivität gegenüber photooxidativem Stress als Folge der Tocopheroldefizienz in der transgenen Linie hin, was zusätzlich durch die Entwicklung irreversibler, stressinduzierter Symptome in den *SXDI*-gehemmten Pflanzen unterstrichen wurde. Ähnliche Effekte auf Quantenausbeute und Chlorophyllgehalt konnten unter photooxidativen Stressbedingungen in der *vte1*-Mutante beobachtet werden (Porfirova *et al.*, 2002). Dies unterstützt die postulierte Funktion von Tocopherolen beim Schutz photosynthetischer Komplexe in den Thylakoiden vor Sauerstofftoxizität und Lipidperoxidation (Fryer 1992; Munné-Bosch und Alegre, 2002). Entsprechend konnte zuvor auch für transgene Tabakpflanzen, die infolge der Antisense-vermittelten Reduktion in der Geranylgeranyl-Reduktase eine partielle Verminderung der Tocopherolgehalte aufwiesen, eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress demonstriert werden (Tanaka *et al.*, 1999; Grasses *et al.*, 2001). Allerdings waren diese Pflanzen auch in ihrer Chlorophyllbiosynthese gehemmt, was die Unterscheidung zwischen Tocopherol- und Chlorophyll-spezifischen Effekten erschwerte. Unter diesem Gesichtspunkt ist es bemerkenswert, das auch in der Linie 22 vor der Stressapplikation ein leicht verminderter Chlorophyllgehalt detektiert wurde und diese Pflanzen generell eine hellere Blattfarbe gegenüber den WT-Kontrollen aufwiesen (3.3.3, Abb. 48B). Dies scheint im Gegensatz zu der *vte1*-Mutante zu stehen, für die kein Effekt auf den Chlorophyllgehalt unter optimalen Bedingungen beschrieben wurde (Porfirova *et al.*, 2002) und damit zusätzliche pleiotrope Auswirkungen der Tocopheroldefizienz in den Kartoffeln vermuten lässt.

Insgesamt lässt sich aber feststellen, dass sowohl in der *vte1*-Mutante als auch in den transgenen Kartoffelpflanzen die Minderung der Stresstoleranz relativ moderat ausfiel, was die Beteiligung alternativer Redoxsysteme (z.B. Ascorbat, Glutathion, Carotinoide) an der oxidativen Stressantwort wahrscheinlich macht. In diesem Zusammenhang konnte die Isolierung einer Vitamin C-defizienten Mutante (*soz1/vtc1*) beschrieben werden, die eine erhöhte Sensitivität gegenüber verschiedenen Stressbedingungen zeigte (Conklin *et al.*, 1996).

### 4.3.3 Inhibierung des Assimilatexportes in *SXDI*-supprimierten Kartoffelpflanzen

Die qualitativen und quantitativen Analysen der Kohlenhydratverteilung in den *SXDI*-supprimierten Kartoffelpflanzen belegten, dass die Verminderung in den Tocopherolgehalten infolge einer gehemmten Tocopherol Cyclase-Aktivität in einem Assimilatexport-defizienten Phänotyp resultierte. Dabei war die Ausprägung des Phänotyps direkt mit der Tocopherol-

Konzentration in den Blättern korreliert und dementsprechend die deutlichsten Effekte in der Linie 22 festzustellen (3.3.4, Abb. 50 und 51). Es war auffällig, dass bei einer generell starken Reduzierung des Gehaltes an  $\alpha$ -Tocopherol auf 4,7% (Linie StSXD1-RNAi-21), 2,5% (Linie 27) bzw. 0,7% (Linie 22) des Vergleichswertes in den WT-Kontrollen, die phänotypischen Unterschiede zwischen diesen Linien deutlich variierten, und beispielsweise in der Linie 21 nur noch marginale Auswirkungen auf den Kohlenhydratstatus in den *source*-Blättern zu detektieren waren. Allerdings zeigte sich übereinstimmend in allen transgenen Linien eine tendentielle Verminderung der löslichen Zucker in den jüngeren Blattstufe, was auf ein unzureichende Assimilatversorgung der *sink*-Gewebe schließen lässt. Als Folge der Unterversorgung heterotropher Pflanzenorgane aus den *source*-Gewebe wurde daher auch in der Linie 22 eine deutliche Reduktion des Knollenertrages beobachtet. Somit prägte insbesondere die Linie 22 einen Phänotyp aus, der an transgene Kartoffelpflanzen mit einer inhibierten apoplastischen Phloembeladung als Folge der konstitutiven oder Phloem-spezifischen Hemmung des Saccharosetransporters erinnerte (Riesmeier *et al.*, 1994; Kühn *et al.*, 1996). In Übereinstimmung mit diesen Export-defizienten Pflanzen war auch in der SXD1-gehemmten Linie eine deutliche Inhibierung der Photosyntheserate in den *source*-Blättern zu verzeichnen (3.3.3, Abb. 49). Die CO<sub>2</sub>-Assimilation erwies sich dabei abhängig vom Entwicklungsstadium der Blätter und konnte mit der *source*-spezifischen Stärkeakkumulation korreliert werden. Entsprechend war in der jüngsten untersuchten Blattstufe, die gegenüber den Kontrollen unveränderte Stärkegehalte zeigte, keine Verminderung, sondern interessanterweise eine signifikante Steigerung der Photosyntheserate zu beobachten. Dies lässt kompensatorische Prozesse als Folge der *source*-spezifischen photosynthetischen Limitierung erkennen und zeigt damit, dass die Tocopherol-Defizienz *per se* nicht die Photosynthesekapazität in der transgenen Linie beeinflusst hat.

Die Inhibierung des Assimilatexportes als Folge des Silencing von *StSXD1* in den transgenen Kartoffellinien zeigt damit eindeutige Parallelen zu dem Phänotyp, der durch den Verlust des SXD1-Orthologs in der Maismutante *sxd1* hervorgerufen wurde (Russin *et al.*, 1996; Provencher *et al.*, 2001). Dagegen wurden für die *vte1*-Mutante keine phänotypischen Auffälligkeiten beschrieben, die ähnliche Konsequenzen der Vitamin E-Defizienz für den Assimilattransport und Kohlenhydratverteilung in *Arabidopsis* vermuten lassen (Porfirova *et al.*, 2002). Allerdings muss die *vte1*-Mutante zunächst im Hinblick auf Kohlenhydratmetabolismus und plasmodesmale Transporteigenschaften detailliert biochemisch und zellbiologisch charakterisiert werden, bevor Schlussfolgerungen hinsichtlich möglicher Unterschiede zwischen den Pflanzenspezies gezogen werden können.



Die ultrastrukturellen Untersuchungen der PDs in phänotypischen *SXD1*-supprimierten Kartoffeln der Linie 22 konnten im Gegensatz zu der *sxd1*-Maismutante keinen Aufschluss über die Ursache der beobachteten Inhibierung des Assimilatexportes geben. Zuvor war die Unterbrechung der symplastischen Kontinuität zwischen Mesophyll und Leitgewebe infolge massiver Kalloseablagerungen an den PDs der Bündelscheiden/Phloemparenchym-Grenzschicht als Grund für den Verlust der Exportkapazität postuliert worden (Botha *et al.*, 2000). Diese spezifischen PDs wurden auch als Barriere für den Eintritt verschiedener Viren in den Phloemgewebe identifiziert, was prinzipielle strukturelle Unterschiede sowohl zu den PDs des Mesophyll als auch des GZ/SE-Komplexes wahrscheinlich macht (zusammengefasst in Nelson und van Bel, 1998). Auf Basis der Immunogold-Markierungen mit einem anti-(1,3)  $\beta$ -Glucan Antiserum konnten allerdings keine endgültigen Aussagen im Hinblick auf mögliche Unterschiede zwischen der Linie 22 und der WT-Kontrolle getroffen werden, da innerhalb der untersuchten Gewebe eine relativ hohe Variabilität in den plasmodesmalen Strukturen als auch der Kallosemarkierung zu beobachten war (3.3.5, Abb. 53). Ähnlich stellte sich die Situation in anderen Zelltypen innerhalb des Mesophylls und des Leitgewebes dar. In Zukunft müssen daher alternative Methoden wie beispielsweise Mikroinjektionen zur zellspezifischen Analyse der plasmodesmalen Permeabilität (Botha *et al.*, 2000) zum Einsatz kommen. Zudem wäre es sinnvoll, ultrastrukturelle Analysen in verschiedenen Blatt- und Entwicklungsstadien durchzuführen, um pleiotrope Effekte infolge der massiven Stärkeakkumulation auszuschließen.

Obwohl mit den *StSXD1*-RNAi transgenen Kartoffelpflanzen verifiziert werden konnte, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Tocopherolstoffwechsel und dem *source*-spezifischen Assimilattransport gibt, bleibt die Wirkungsweise von Vitamin E auf die Ausbildung funktionaler PDs völlig unverstanden. Dies ist daher ein gutes Beispiel, dass die Analyse von „knock-out“ Mutanten und von konstitutiv RNAi-supprimierten transgenen Pflanzen in vielen Fällen Probleme bereitet, da weniger der direkte Effekt des untersuchten Gens als vielmehr die Adaptation an eine kontinuierliche Defizienz betrachtet wird. Diese Nachteile müssen daher in Zukunft durch die Verwendung konditionaler Mutanten oder induzierbarer RNAi-Strategien vermieden werden. Die Etablierung eines Ethanol-induzierbaren Expressionssystems zum dsRNA-vermittelten Silencing ist dabei ein vielversprechender Ansatz (Chen *et al.*, eingereichtes Manuskript).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die interzelluläre Ausbreitung von Viren in Pflanzen erfordert die Funktion Virus-kodierter Transportproteine („Movement Protein“, MP), die über kompatible Interaktionen mit Wirtsfaktoren den symplastischen Transportweg für Photoassimilate und endogene Makromoleküle rekrutieren. Dabei kommt der Struktur und Funktion der Plasmodesmen (PDs), den cytoplasmatischen Zell-zu-Zell Verbindungen, eine entscheidende Bedeutung zu. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von molekularen Faktoren plasmodesmaler Transportprozesse, wobei drei Ansätze verfolgt wurden:

- (1) Analyse der zellbiologischen, metabolischen und virologischen Konsequenzen MP-vermittelter Änderungen des plasmodesmalen Transportweges und Identifizierung daran beteiligter Wirtsfaktoren am Beispiel des *Potato leafroll virus* MP (PLRV-MP17).
- (2) Isolierung pflanzlicher Interaktionspartner eines am intra- und interzellulären Virustransport beteiligten viralen Capsid Proteins (CP) mit MP-ähnlichen Eigenschaften.
- (3) Charakterisierung des an der Ausbildung funktionaler PDs beteiligten SXD1 (*sucrose export deficient 1*) Proteins und dessen Bedeutung für den symplastischen Assimilattransport.

Hierbei bildete Ansatz (1) den Schwerpunkt der Arbeit.

(1) Die konstitutive Expression des PLRV-MP17 in transgenen Tabakpflanzen führt zu einer starken Wuchsretardierung, einer massiven Akkumulation von Kohlenhydraten in *source*-Blättern sowie einer limitierten Virusresistenz (Herbers *et al.*, 1997). Um zu untersuchen, ob die MP17-induzierten Änderungen durch Modifikation spezifischer PDs oder durch pleiotrope Effekte infolge der hohen MP17-Gehalte hervorgerufen werden, wurden diese Pflanzen mit phänotypisch unauffälligen Tabaklinien verglichen, die MP17 in translationaler Fusion mit GFP exprimierten. Subzelluläre Lokalisierungsstudien zeigten eine generelle Assoziation von MP17 mit PDs des vaskulären und nicht-vaskulären Gewebes in *source*-Blättern, während in *sink*-Blättern die Lokalisation auf PDs der Trichome beschränkt blieb. Farbstoff-gekoppelte Mikroinjektionsanalysen belegten eine Erhöhung der plasmodesmalen Leitfähigkeit in Mesophyllzellen transgener Linien, die sich unabhängig von der MP17-Proteinmenge und phänotypischen Änderungen ausprägte. Hingegen konnten Kohlenhydratakkumulation, Phänotypentwicklung sowie Änderungen der

Resistenzeigenschaften gegenüber *Potato virus Y* (PVY) mit der Menge an MP17-Protein korreliert werden. Dies lässt auf sekundäre metabolische Effekte bei hohem MP17-Expressionsniveau schließen, die den primären Einfluss von MP17 auf die plasmodesmale Leitfähigkeit überlagern.

Um zwischen direkten Effekten von MP17 und der metabolischen Adaptation der Pflanzen bei hohem Expressionsniveau zu unterscheiden, wurden Tabakpflanzen generiert, die MP17 und MP17:GFP unter Kontrolle eines Ethanol-induzierbaren Promotors exprimierten. Expressionsanalysen ergaben eine maximale Transkriptakkumulation 24-48 Stunden nach Ethanolapplikation und eine einheitliche Induktionskinetik in unterschiedlichen Blattstadien. Mehrere transgene Linien entwickelten 30-36 Stunden nach Ethanolapplikation einen spezifischen Phänotyp, der durch Venen-assoziierte Chlorosen charakterisiert war und sich zuerst in den Venen höherer Ordnung (Klasse III) manifestierte. Im Unterschied zu den konstitutiv exprimierenden Pflanzen war der Effekt auf aktiv wachsende Blätter beschränkt und schien dem basipetalen *sink/source*-Gradienten innerhalb des Blattes zu folgen. Die quantitative Bestimmung der Kohlenhydratgehalte und qualitative Visualisierung der Stärkeverteilung ergab, dass der Ausprägung des chlorotischen Phänotyps eine deutliche Stärkeakkumulation vorausging, die spezifisch mit den Venen höherer Ordnung am Ende der Dunkelphase assoziiert war. Fluoreszenzmikroskopische Analysen belegten eine präferentielle Affinität von MP17:GFP zu PDs Venen-assoziiierter Zelltypen in den phänotypischen Blättern, was auf eine mit dem *sink/source*-Übergang korrelierte Entwicklungsabhängigkeit der MP17/PD-Interaktion schließen lässt. Die transgenen Linien zeigten zudem eine limitierte lokale Resistenz gegenüber PVY, die auf phänotypisch veränderte, systemische Blätter beschränkt war und vermutlich durch eine unspezifische, Kohlenhydrat-vermittelte Abwehrreaktion und/oder einen MP17-induzierten „Block“ des Virusimportes verursacht wurde.

Die ektopische Expression von MP17 und MP17:GFP führte auch in *Arabidopsis thaliana* zu einer generellen plasmodesmalen Assoziation in *source*-Gewebe sowie einer Inhibierung des Assimilatexportes, was konservierte MP17-Interaktionspartner zwischen *Solanaceen* und *Arabidopsis* vermuten lässt. Daher wurde in einem genetischen Ansatz die EMS-mutagenisierte Population einer MP17:GFP transgenen Linie auf Suppressormutanten durchmustert, die durch Reversion des MP17-vermittelten Wachstumsdefektes charakterisiert waren. Es konnten etwa 30 Mutanten mit Wildtyp-ähnlichem Wachstum isoliert werden, die basierend auf der Proteinexpression und subzellulären Lokalisierung von MP17:GFP unterschiedlichen Klassen zugeordnet wurden. Einige Mutanten zeigten zudem einen

„Blühphänotyp“, was einen direkten Hinweis auf mögliche Änderungen des Assimilattransportes gab.

(2) Der zweite Ansatz zielte auf die Isolierung von pflanzlichen Interaktionspartnern des PVY Capsid Proteins (CP), da potyviralen CPs aufgrund ihrer Beteiligung an der Assemblierung des Transportkomplexes sowie der Fähigkeit zur Modifikation der plasmodesmalen Leitfähigkeit eine wichtige Rolle beim intra- und interzellulären Transport zugeschrieben wird. Mit Hilfe des Zwei-Hybrid Systems in Hefe wurde ein neuartiges DnaJ-ähnliches Protein (NtCPIP1) aus *Nicotiana tabacum* isoliert, das spezifisch mit PVY CP und dem verwandten *Tobacco etch virus* (TEV) CP interagiert. Die funktionale Bedeutung der Interaktion wurde durch PVY-Infektion von transgenen Tabakpflanzen verifiziert, die mittels RNAi in der Expression von NtCPIP1 supprimiert waren und verminderte Virusgehalte während der Etablierung der Infektion zeigten. Für den Zell-zu-Zell Transport von Potyviren konnte somit die Beteiligung von zellulären HSP70-Proteinen postuliert werden, die über die Bindung des potyviralen CP an DnaJ-ähnliche Proteine während der Infektion rekrutiert werden.

(3) Im dritten Ansatz sollte das pflanzliche SXD1-Protein im Hinblick auf seine Bedeutung für die Ausbildung funktionaler PDs und den symplastischen Assimilattransport untersucht werden. Die *sxd1* (*sucrose export defective 1*) Maismutante wurde zuvor infolge eines Assimilatexport-defizienten Phänotyps und strukturellen Veränderungen von PDs zwischen Bündelscheide und Phloemparenchym als Transportmutante mit spezifischem Defekt in einer PD-Komponente betrachtet. Die Isolierung einer Vitamin E-defizienten *Arabidopsis*-Mutante (*vte1*) zeigte allerdings, dass *SXD1/VTE1* für die Tocopherol Cyclase kodiert, wobei in *Arabidopsis* kein offensichtlicher Effekt auf den Assimilattransport beschrieben wurde. Um die Frage zu klären, ob SXD1 sowohl für Veränderungen der PDs als auch die verminderten Vitamin E Gehalte verantwortlich ist, wurde das orthologe *SXD1*-Gen aus *Solanum tuberosum* isoliert und die Expression von *StSXD1* in transgenen Pflanzen über RNAi supprimiert. Durch biochemische Analyse der Pflanzen, die in Zusammenarbeit mit Dr. M. Geiger (Sungene, Gatersleben) erfolgte, konnte verifiziert werden, dass *StSXD1* für die Tocopherol Cyclase kodiert. Die daraus resultierende Vitamin E-Defizienz führte in den transgenen Pflanzen zu einer verminderten Toleranz gegenüber photooxidativem Stress und darüber hinaus, aufgrund eines bisher unverstandenen Mechanismus, zu einer Inhibierung des Assimilatexportes.

## 6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                |  |
|----------------|--|
| 3-AT           | 3-Amino-1,2,4-triazol  |
| Abb.           | Abbildung  |
| AD             | Aktivierungsdomäne GAL4-Transkriptionsfaktor   |
| AGPase         | ADP-Glucose Pyrophosphorylase  |
| AS             | Aminosäuren  |
| ATP            | Adenosintriphosphat  |
| BD             | Bindungsdomäne GAL4-Transkriptionsfaktor   |
| β-ME           | β-Mercaptoethanol  |
| CaMV           | <i>Cauliflower mosaic virus</i>  |
| cDNA           | „complementary DNA“, komplementäre DNA   |
| CHAPS          | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate  |
| CLSM           | „Confocal laser scanning microscope“ (konfokales Laserskanning-Mikroskop)                                      |
| CMV            | <i>Cucumber mosaic virus</i>   |
| CP             | Capsid Protein   |
| cv.            | „cultivar“, Kultivar   |
| DEPC           | Diethylpyrocarbonat  |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid   |
| DNA            | Desoxyribonucleinsäure   |
| DNase          | Desoxyribonuclease   |
| DTT            | Dithiothreitol   |
| dNTP           | Desoxyribonucleosidtriphosphat   |
| dpi            | „days post infection“, Tage nach Virusinfektion  |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA           | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| EMS            | Ethylmetansulfonat   |
| EST            | „Expressed Sequence Tag“   |
| f.c.           | „final concentration“, Endkonzentration  |
| FG             | Frischgewicht  |
| FITC           | Fluorescein 5(6)-isothiocyanate  |
| GFP            | „Green Fluorescent Protein“  |
| GUS            | β-Glucuronidase  |
| GZ/SE-Komplex  | Geleitzell/Siebelement-Komplex   |
| HEPES          | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure   |
| hpi            | „hours post induction“, Stunden nach Ethanol-Induktion   |
| HPLC           | „High performance (pressure) liquid chromatography“  |
| HSP            | „heat shock protein“, Hitzeschockprotein   |
| IPTG           | Isopropyl-β-D-Galaktopyranosid   |
| IgG            | Immunoglobulin   |
| INT-BG         | relative Signalstärke („Intensity“) des <i>Western</i> -Signals abzüglich des Hintergrundwertes („Background“) |
| kb             | Kilobasenpaare   |
| kDa            | Kilodalton   |
| <i>Ler</i>     | <i>Landsberg erecta</i>  |
| LiAc           | Lithiumacetat  |
| Lsg.           | Lösung   |

|               |   |
|---------------|---|
| LYCH          | Lucifer Yellow CH   |
| $\mu\text{E}$ | mikro-Einstein ( $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )                               |
| MG            | Molekulargewicht  |
| min           | Minute  |
| M-MLV         | Moloney Murine Leukemia Virus   |
| MP            | Movement Protein, Transportprotein  |
| mRNA          | „messenger RNA“, Boten-RNA  |
| nos           | Nopalinsynthase   |
| ocs           | Octopinsynthase   |
| OD            | optische Dichte   |
| ORF           | „open reading frame“; offener Leserahmen  |
| PAGE          | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| PAR           | „photosynthetically active radiation“, photosynthetisch aktive Strahlung                        |
| PCR           | „Polymerase Chain Reaction“, Polymerase-Kettenreaktion  |
| PD            | Plasmodesma   |
| PEG           | Polyethylenglycol   |
| PG            | „parental group“, Parentalgruppe  |
| PLRV          | <i>Potato leafroll virus</i>  |
| PR-Protein    | „pathogenesis-related protein“, Pathogen-induziertes Protein                                    |
| PSL-BG        | Strahlungsdosis des <i>Northern</i> -Signals abzüglich Hintergrundwert („Background“)           |
| PVA           | <i>Potato virus A</i>   |
| PVY           | <i>Potato virus Y</i>   |
| RACE          | „Rapid amplification of cDNA ends“  |
| RbcS          | „Rubisco small subunit“, kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase |
| RNA           | Ribonukleinsäure  |
| RT            | Raumtemperatur oder Reverse Transkription   |
| s             | Sekunde   |
| s.            | siehe   |
| SD            | „synthetic complete drop-out“- Medium   |
| SDS           | Natriumdodecylsulfat  |
| SDS-PAGE      | denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese   |
| ssDNA         | „single stranded“ DNA, Einzelstrang DNA   |
| SNN           | Samsun NN ( <i>Nicotiana tabacum</i> )  |
| TEV           | <i>Tobacco etch virus</i>   |
| TMV           | <i>Tobacco mosaic virus</i>   |
| TSWV          | <i>Tomato spotted wilt virus</i>  |
| TuMV          | <i>Turnip mosaic virus</i>  |
| TVMV          | <i>Tobacco vein mottling virus</i>  |
| Tris          | Tri-(Hydroxymethyl)-Aminomethan   |
| Tx            | Tochtergeneration bei transgenen Linien, bzw. „time point“ (Zeitpunkt) nach Ethanolinduktion    |
| ü.N.          | über Nacht  |
| Var.          | Varietät  |
| Vol.          | Volumen   |
| (v/v)         | Volumenprozent  |
| (w/v)         | Gewichtsprozent   |
| WT            | Wildtyp   |

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Almon E, Horowitz M, Wong H-L, Lucas WJ, Zamski E und Wolf S (1997)** Phloem-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein alters carbon metabolism and partitioning in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* **115**: 1599-1607
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW und Lipman DJ (1990)** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410
- Alzhanova DV, Napuli AJ, Creamer R und Dolja VV (2001)** Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. *EMBO J.* **20**: 6997-7007.
- Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, Herr JM Jr, Mau C, Mallory A, Pruss G, Bowman L und Vance VB (2000)** A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **290**: 142-144
- Aoki K, Kragler F, Xoconostle-Cazares B und Lucas WJ (2002)** A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:16342-16347
- Aranda MA, Escaler M, Wang D und Maule AJ (1996)** Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 15289-15293.
- Aranda MA, Escaler M, Thomas CL und Maule AJ (1999)** A heat shock transcription factor in pea is differentially controlled by heat and virus replication. *Plant J.* **20**:153-61
- Arnon DI (1949)** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15
- Balachandran S, Hull RJ, Vaadia Y, Wolf S und Lucas WJ (1995)** Alteration in carbon partitioning, induced by the movement protein of tobacco mosaic virus, originates from the mesophyll and is independent of change in plasmodesmal size exclusion limit. *Plant Cell Environ.* **18**: 1301-1310
- Balachandran S, Xiang Y, Schobert C, Thompson GA und Lucas WJ (1997)** Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14150-14155
- Balachandran S, Hurry VM, Kelley SE, Osmond CB, Robinson SA, Rohozinski J, Seaton GGR und Sims DA (1997)** Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiol. Plantarum* **100**: 203-213.
- Baluska F, Samaj J, Napier R und Volkmann D (1999)** Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex. *Plant J.* **19**: 481-488
- Barker H (1987)** Invasion of non-phloem tissue in *Nicotiana clevelandii* by potato leafroll luteovirus is enhanced in plants also infected with potato Y potyvirus. *J. Gen. Virol.* **68**: 1223-1227
- Barker H (1989)** Specificity of the effect of sap transmissible viruses in increasing the accumulation of luteoviruses in co-infected plants. *Ann. Appl. Biol.* **115**: 71-78
- Bartel und Fields (1995)** Analyzing Protein-Protein interactions using 2-Hybrid System. *Methods in Enzymology* **254**: 241-263

- Baszynski (1967)** The effect of vitamin E on flower initiation in *Calendula officinalis* L. grown in short day. *Naturwissenschaften* **54**: 339-340
- Baulcombe DC (1996)** Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**: 1833-1844
- Bechthold N, Ellis J und Pelettier G (1993)** *In planta Agrobacterium*-mediated transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Academy of Sciences Paris* **316**: 1194-1199
- Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A und Lejeune P (1993)** Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* **5**: 1147-1155
- Börnke (2001)** Molekulare Ansätze zur Beeinflussung der Photoassimilatverteilung in transgenen Pflanzen. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg, Halle
- Botha CEJ, Cross RHM, van Bel AJE und Peter CI (2000)** Phloem loading in the sucrose-export-defective (SXD-1) mutant maize is limited by callose deposition at plasmodesmata in bundle sheath-vascular parenchyma interface. *Protoplasma* **214**: 65-72
- Boyko V, Ferralli J und Heinlein M (2000)** Cell-to-cell movement of TMV RNA is temperature-dependent and corresponds to the association of movement protein with microtubules. *Plant J.* **22**: 315-325
- Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, Schuch W, Sheehy PJA und Wagner KH (2000)** Vitamin E. *J. Sci. Food Agr.* **80**: 913-938.
- Breeden L und Nasmyth K (1985)** Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **50**: 643-50.
- Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW und Baulcombe DC (1998)** Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17**: 6739-6746
- Bürkle L, Hibberd JM, Quick WP, Kuhn C, Hirner B und Frommer WB (1998)** The H<sup>+</sup>-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiol.* **118**: 59-68
- Bukau B und Horwich AL (1998)** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-366.
- Bullock WO, Fernandez JM und Short JM (1987)** XLI-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-378
- Caddick MX, Greenland AJ, Jepson I, Krause KP, Qu N, Riddell KV, Salter MG, Schuch W, Sonnwald U und Tomsett AB (1998)** An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nat. Biotechnol.* **16**: 177-180
- Carrington JM, Kasschau KD, Mahajan SK und Schaad MC (1996)** Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* **8**: 1670-1681
- Carrington JC, Jensen PE und Schaad MC (1998)** Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J.* **14**: 393-400.
- Carrington JC, Kasschau KD und Johansen LK (2001)** Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology* **281**: 1-5
- Caspar T, Lin T-P, Kakefuda G, Benbow L, Preiss J und Sommerville C (1991)** Mutants of *Arabidopsis* with altered starch regulation. *Plant Physiol.* **95**: 1181-1188
- Castle AJ und Day AW (1984)** Isolation and identification of alpha-tocopherol (Vitamin E) as an inducer of the parasitic phase of the smut fungus, *Ustilago violacea*. *Phytopathology* **74**: 1194-1200
- Causier B und Davies B (2002)** Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Mol. Biol.* **50**: 855-870



- Chay CA, Gunasinge UB, Dinesh-Kumar SP, Miller WA und Gray SM (1996)** Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17 kDa protein, respectively. *Virology* **219**: 57-65
- Chen MH, Sheng J, Hind G, Handa AK und Citovsky V (2000)** Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J.* **19**: 913-920
- Chisholm ST, Mahajan SK, Whitham SA, Yamamoto ML und Carrington JC (2000)** Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 489-494
- Chisholm ST, Parra MA, Anderberg RJ und Carrington JC (2001)** Arabidopsis RTM1 and RTM2 genes function in phloem to restrict long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Physiol* **127**: 1667-1675
- Chuang CH und Meyerowitz, EM (2000)** Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 4985-4990.
- Church GM und Gilbert W (1984)** Genomic Sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1991
- Citovsky V, Wong ML, Shaw AL, Prasad BV und Zambryski P (1992)** Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell* **4**: 397-411.
- Citovsky V, McLean BG, Zupan JR und Zambryski P (1993)** Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes Dev.* **7**: 904-910
- Clough SJ und Bent AF (1998)** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**:735-743
- Conklin PL, Williams EH und Last RL (1996)** Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9970-9974
- Cooper B, Lapidot M, Heick JA, Doods JA und Beachy RN (1995)** A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analogue increases susceptibility. *Virology* **206**: 307-313.
- Corbesier L, Lejeune P und Bernier G (1998)** The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* **206**: 131-137
- Crawford KM und Zambryski PC (1999)** Plasmodesmata signaling: many roles, sophisticated statutes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 382-387
- Cronin S, Verchot J, Haldeman-Cahill R, Schaad MC und Carrington JC (1995)** Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* **7**: 549-559
- Crookes WJ und Olsen LJ (1998)** The effects of chaperones and the influence of protein assembly on peroxisomal protein import. *J. Biol. Chem.* **273**: 17236-17242
- Cyr DM, Langer T und Douglas MG (1994)** DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 176-181
- Deblaire R, Bytebier B, deGreve H, Debroek F, Schell J, van Montagu M und Leemans J (1985)** Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors of *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids Res* **13**: 4777-4788
- Derrick, PM und Barker H (1997)** Short and long distance spread of potato leafroll luteovirus: effects of host genes and transgenes conferring resistance to virus accumulation in potato. *J. Gen. Virol.* **78**: 243-251

- Desvoyes B, Faure-Rabasse S, Chen MH, Park JW und Scholthof HB (2002)** A novel plant homeodomain protein interacts in a functionally relevant manner with a virus movement protein. *Plant Physiol.* **129**: 1521-1532.
- Ding B, Haudenschild JS, Hull RJ, Wolf S, Beachy, RN und Lucas WJ (1992)** Secondary plasmodesmata are specific sites of localisation of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **4**: 915-928
- Ding B (1998)** Intercellular protein trafficking through plasmodesmata. *Plant Mol Biol.* **38**: 279-310
- Ding B, Itaya A und Woo YM (1999)** Plasmodesmata and cell-to-cell communication in plants. *Int. Rev. Cytol.* **190**: 251-316
- Ding XS, Carter SA, Deom CM und Nelson RS (1998)** Tobamovirus and potyvirus accumulation in minor veins of inoculated leaves from representatives of the Solanaceae and Fabaceae. *Plant Physiol.* **116**: 125-136
- Di Serio F, Schob H, Iglesias A, Tarina C, Bouldoires E und Meins F Jr (2001)** Sense- and antisense-mediated gene silencing in tobacco is inhibited by the same viral suppressors and is associated with accumulation of small RNAs *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 6506-6510
- Dolja VV, Boyko VP, Agranovsky AA und Koonin EV (1991)** Phylogeny of capsid proteins of rod-shaped and filamentous RNA plant viruses: two families with distinct patterns of sequence and probably structure conservation. *Virology* **184**: 79-86
- Dolja VV, McBride HJ und Carrington JC (1992)** Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of beta-glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10208-12
- Dolja VV, Haldeman R, Robertson NL, Dougherty WG und Carrington JC (1994)** Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J.* **13**: 1482-91.
- Dolja VV, Haldeman-Cahill R, Montgomery AE, Vandenbosch KA und Carrington JC (1995)** Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* **206**: 1007-1016.
- Dorokhov YL, Makinen K, Frolova OY, Merits A, Saarinen J, Kalkkinen N, Atabekov JG und Saarma MA (1999)** A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Lett.* **461**: 223-228
- Drugeon G und Jupin I (2002)** Stability in vitro of the 69K movement protein of Turnip yellow mosaic virus is regulated by the ubiquitin-mediated proteasome pathway. *J. Gen. Virol.* **83**: 3187-3197
- Ebneth E (1996)** Expressionsanalyse des Promotors einer cytosolischen Fruktose-1,6-bisphosphatase aus Kartoffel in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen. Dissertation, Freie Universität Berlin
- Edwardson, JR (1974).** Host ranges of viruses in the PVY-group. *Fl. Ag. Expt. Stat. Mono. Ser. No. 5*, 225 pp.
- Ellis RJ und Hartl FU (1999)** Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**: 102-110
- Epel BL (1994)** Plasmodesmata: composition, structure and trafficking. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1343-1356
- Epel BL, Kuchuck B, Kotlizky G, Shurtz S, Erlanger M und Yahalom A (1995)** Isolation and characterization of plasmodesmata. *Method Cell Biol.* **50**: 237-253
- Epel BL, van Lent JWM, Cohen L, Kotlizky G, Katz A und Yahalom A (1996)** A 41 kDa protein isolated from maize mesocotyl cell walls immunolocalizes to plasmodesmata. *Protoplasma* **191**: 70-78
- Escaler M, Aranda MA, Thomas CL und Maule AJ (2000)** Pea embryonic tissues show common responses to the replication of a wide range of viruses. *Virology* **267**: 318-325

- Evert RV und Russin WA (1993)** Structurally, phloem unloading in the maize leaf cannot be symplastic. *Am. J. Bot.* **80**: 1310-1317
- Fields S und Song O (1989)** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246
- Fraser RSS (1987)** *Biochemistry of virus-infected plants*, Letchworth, Hertfordshire: Research Studies Press.
- Fryer MV (1992)** The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol). *Plant Cell Environ.* **15**: 381-392
- Funayama S, Sonoike K und Terashima I (1997)** Photosynthetic properties of leaves of *Eupatorium makinoi* infected by a geminivirus. *Photosynthesis Res.* **53**: 253-261
- Fukuzawa und Gebicky (1983)** Oxidation of alpha-tocopherol in micelles and liposomes by the hydroxyl, perhydroxyl, and superoxide free radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **226**: 242-251
- Gatz C (1997)** Chemical control of gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 89-108
- Gatz C und Lenk I (1998)** Promoters that respond to chemical inducers *Trends Plant Sci.* **3**: 352-358
- Ghoshroy S, Lartey R, Sheng J und Citovski V (1997)** Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 27-50
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR und Wodds RA (1995)** Studies on the transformation of intact yeast-cells by the LiAc/s-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**: 355-360
- Gilbertson RL und Lucas WJ (1996)** How do viruses traffick on the 'vascular highway'? *Trends Plant Sci.* **1**: 260-268
- Gillespie T, Boevink P, Haupt S, Roberts AG, Toth R, Valentine T, Chapman S und Oparka KJ (2002)** Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**: 1207-1222
- Gisel A, Hempel FD, Barella S und Zambryski P (2002)** Leaf-to-shoot apex movement of symplastic tracer is restricted coincident with flowering in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 1713-1717
- Goodman, RN, Király Z und Wood KR (1986)** *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. Columbia: University of Missouri Press
- Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF und Sussman MR (2000)** Genetic evidence for the *in planta* role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13979-13984
- Grasses T, Grimm B, Koroleva O und Jahns P (2001)** Loss of alpha-tocopherol in tobacco plants with decreased geranylgeranyl reductase activity does not modify photosynthesis in optimal growth conditions but increases sensitivity to high-light stress. *Planta* **213**: 620-628
- Grusak MA, Beebe DU und Turgeon R (1996)** Phloem loading. In: *Photoassimilates distribution in plant and crops* (E Zamski, AA Schaffer, eds): Source-sink relationships. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 209-227
- Guo D, Rajamaki ML, Saarma M und Valkonen JP (2001)** Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *J Gen Virol.* **82**: 935-939
- Ham BK, Lee TH, You JS, Nam YW, Kim JK und Paek KH (1999)** Isolation of a putative tobacco host factor interacting with cucumber mosaic virus-encoded 2b protein by yeast two-hybrid screening. *Mol. Cells* **9**: 548-555

- Harper JW, Adami G, Wei N, Keyomarsi K und Elledge SJ (1993)** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816
- Harrison BD (1984)** Potato leafroll virus. In: CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 291, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Slough, UK
- Havelda Z und Maule AJ (2000)** Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *Plant Cell* **12**: 1975-1986
- Haywood V, Kragler F und Lucas WJ (2002)** Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signalling. *Plant Cell* **14** (Supplement): 303-325
- Heinlein M, Epel BL, Padgett HS und Beachy RN (1995)** Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* **270**: 1983-1995
- Heinlein M, Padgett HS, Gens JS, Pickard BG, Casper SJ, Epel BL und Beachy RN (1998)** Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* **10**: 1107-1120
- Heinlein M (2002)** Plasmodesmata: dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 543-552
- Henkes S, Sonnewald U, Badur R, Flachmann R und Stitt M (2001)** A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **13**: 535-51
- Herbers K, Mönke G, Badur R und Sonnewald U (1995)** A simplified procedure for the subtractive cDNA cloning of photoassimilate-responding genes: isolation of cDNAs encoding a new class of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **29**: 1027-1038
- Herbers K, Meuwly P, Frommer WB, Métraux JP und Sonnewald U (1996a)** Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: Possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* **8**: 793-803
- Herbers K, Meuwly P, Métraux JP und Sonnewald U (1996b)** Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *FEBS Lett.* **397**: 239-244
- Herbers K, Tacke E, Hajirezaei M, Krause KP, Melzer M, Rohde W und Sonnewald U (1997)** Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. *Plant J.* **12**: 1045-1056
- Herbers K und Sonnewald U (1998)** Molecular determinants of sink strength. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 207-216
- Herbers K und Sonnewald U (1998)** Altered gene expression brought about by inter- and intracellular formed hexoses and its possible implications for plant-pathogen interactions. *J. Plant Res.* **111**: 232-328
- Herbers H, Takahata Y, Melzer M, Mock H-P, Hajirezaei M und Sonnewald U (2000)** Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Mol. Plant Pathol.* **1**: 51-60
- Ho LC (1988)** Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* **39**: 355-378.
- Höfgen R und Wilmitzer L (1988)** Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl. Acid Res.* **16**: 9877

- Höfgen R und Willmitzer L (1990)** Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Sci.* **66**: 221-230
- Hofius D (1998)** Untersuchungen zum Einfluss des PLRV Movement Proteins auf den Kohlenhydratmetabolismus in transgenen Tabakpflanzen. Diplomarbeit. Universität Hohenheim, Stuttgart-Hohenheim.
- Hofius D, Herbers K, Melzer M, Omid A, Tacke E, Wolf S und Sonnewald U (2001)** Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the potato leafroll virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant J.* **28**: 529-543
- Hofius D und Sonnewald U (2003)** Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology. *Trends Plant Sci.* **8**: 6-8
- Hong Y, Levay K, Murphy JF, Klein PG, Shaw JG und Hunt AG (1995)** A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. *Virology* **214**: 159-166.
- Horváth J (1979)** *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.* **14**: 157
- Huang Z, Andrianov VM, Han Y und Howell SH (2001)** Identification of *Arabidopsis* proteins that interact with the cauliflower mosaic virus (CaMV) movement protein. *Plant Mol. Biol.* **47**: 663-675
- Hughes RK, Perbal MC, Maule AJ und Hull R (1995)** Evidence for proteolytic processing of tobacco mosaic virus movement protein in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **8**: 658-665.
- Imlau A, Truernit E und Sauer N (1999)** Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* **11**: 309-322
- Itaya A, Woo Y-M, Masuta C, Bao Y, Nelson RS und Ding B (1998)** Developmental regulation of intercellular protein trafficking through plasmodesmata in tobacco leaf epidermis. *Plant Physiol.* **118**: 373-385
- Iwabuchi K, Li B, Bartel P und Fields S (1993)** Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* **8**:1693-1696
- Jackson D (2001)** The long and the short of it: signaling development through plasmodesmata. *Plant Cell* **13**: 2569-2572.
- Jorgensen RA, Atkinson RG, Forster RLS und Lucas WJ (1998)** An RNA-based information superhighway in plants. *Science* **279**: 1486-1487
- Joshi CP, Zhou H, Huang X und Chiang VL (1997)** Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Mol. Biol.* **35**: 993-1001
- Karasev AV, Kashina AS, Gelfand VI und Dolja VV (1992)** HSP70-related 65 kDa protein of beet yellows closterovirus is a microtubule-binding protein. *FEBS Lett.* **304**: 12-14
- Kawakami S, Padgett HS, Hosokawa D, Okada Y, Beachy RN und Watanabe Y (1999)** Phosphorylation and/or presence of serine 37 in the movement protein of tomato mosaic tobamovirus is essential for intracellular localization and stability *in vivo*. *J. Virol.* **73**: 6831-6840
- Kelley WL (1998)** The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 222-227
- Kelley WL (1999)** Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s. *Curr. Biol.* **9**: R305-R308
- Kellmann JW (2001)** Identification of plant virus movement-host protein interactions. *Z. Naturforsch. A* **56**: 669-679

- Kempers R und van Bel AJE (1997)** Symplasmic connections between sieve elements and companion cell in the stem phloem of *Vicia faba* L. have a molecular size exclusion limit of at least 10 kDa. *Planta* **101**: 195-201
- Kim I, Hempel FD, Sha K, Pfluger J und Zambryski PC (2002)** Identification of a developmental transition in plasmodesmatal function during embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **129**: 1261-1272
- Koch KE (1996)** Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 509-540
- Kotlizky G, Katz A, van der Laak J, Boyko V, Lapidot M, Beachy RN, Heinlein M und Epel BL (2001)** A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus interferes with targeting of wild-type movement protein to microtubules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 895-904
- Kragler F, Monzer J, Shash K, Xoconostle-Cazares B und Lucas WJ (1998)** Cell-to-cell transport of proteins: requirement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *Plant J* **15**: 367-381
- Kragler F, Monzer J, Xoconostle-Cázares B und Lucas WJ (2000)** Peptide antagonists of the plasmodesmal macromolecular trafficking pathway. *EMBO J* **19**: 2856-2868
- Kühn C, Quick WP, Schulz A, Riesmeier JW, Sonnewald U und Frommer WB (1996)** Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant Cell Environ.* **19**: 1115-1123
- Lapidot M, Gafny R, Ding B, Wolf S, Lucas WJ und Beachy RN (1993)** A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant J.* **4**: 959-970.
- Lämmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Laufen T, Mayer MP, Beisel C, Klostermeier D, Mogk A, Reinstein J und Bukau B (1999)** Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5452-5457
- Lazarowitz SG (1999)** Probing plant cell structure and function with viral movement proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 332-338
- Lazarowitz SG und Beachy RN (1999)** Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* **11**: 535-548
- Leisner SM und Turgeon R. (1993)** Movement of virus and photoassimilate in the phloem: a comparative analysis. *Bioessays* **15**: 741-748
- Lemoine R, Kühn C, Thiele N, Delrot S und Frommer WB (1996)** Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: Effects on amount and activity. *Plant Cell. Environ.* **19**: 1124-1131
- Levin JZ, de Framond AJ, Tuttle A, Bauer MW und Heifetz PB (2000)** Methods of double-stranded RNA-mediated gene inactivation in *Arabidopsis* and their use to define an essential gene methionine biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* **44**: 759-775.
- Li XH, Valdez P, Olvera RE und Carrington JC (1997)** Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *J. Virol.* **71**: 1598-1607.
- Li WX und Ding SW (2001)** Viral suppressors of RNA silencing. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 150-154
- Logemann J, Schell J und Willmann L (1987)** Improved method for the preparation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**: 16-20

- Lomonosov GP (1995)** Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* **33**: 323-343
- Lucas WJ, Balachandran S, Park J und Wolf S (1996)** Plasmodesmal companion cell-mesophyll communication in the control over carbon metabolism and phloem transport: insight gained by viral movement protein. *J. Exp. Bot.* **47**: 1119-1128
- Lucas WJ (1999)** Plasmodesmata and the cell-to-cell transport of proteins and nucleoprotein complexes. *J. Exp. Bot.* **50**: 979-987
- Lucas WJ und Wolf S (1999)** Connections between virus movement, macromolecular signalling and assimilate allocation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 192-197
- Lucas WJ, Yoo BC und Kragler F (2001)** RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 849-857
- Lukowitz W, Gillmor CS und Scheible WR (2000)** Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol.* **123**: 795-805
- MacDonald PN (Hrsg.) et al. (2001)** Two-Hybrid Systems: methods and protocols. *Methods in Molecular biology* Vol. **177**. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, pp. 336
- Martinez-Yamout M, Legge GB, Zhang O, Wright PE und Dyson HJ (2000)** Solution structure of the cysteine-rich domain of the Escherichia coli chaperone protein DnaJ. *J. Mol. Biol.* **300**: 805-818
- Matsushita Y, Deguchi M, Youda M, Nishiguchi M und Nyunoya H (2001)** The tomato mosaic tobamovirus movement protein interacts with a putative transcriptional coactivator KELP. *Mol. Cells* **12**: 57-66
- Matsushita Y, Miyakawa O, Deguchi M, Nishiguchi M und Nyunoya H (2002)** Cloning of a tobacco cDNA coding for a putative transcriptional coactivator MBF1 that interacts with the tomato mosaic virus movement protein. *J. Exp. Bot.* **53**: 1531-1532
- Maule AJ (1991)** Virus movement in infected plants. *Plant Sciences* **9**: 457-473
- Maule A, Leh V und Lederer C (2002)** The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 279-284
- McLean BG, Zupan J und Zambryski PC (1995)** Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell* **7**: 2101-2114.
- Medina V, Peremyslov VV, Hagiwara Y und Dolja VV (1999)** Subcellular localization of the HSP70-homolog encoded by beet yellows closterovirus. *Virology* **260**: 173-181
- Merits A, Guo D und Saarma M (1998)** VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *J. Gen. Virol.* **79**: 3123-3127
- Merits A, Guo D, Jarvekulg L und Saarma M (1999)** Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* **263**: 15-22
- Michniewicz M und Kamienska A (1964)** Flower formation induced by kinetin and vitamin E treatment in cold-requiring plant (*Cichorium intybus* L.) grown under non-inductive conditions. *Naturwissenschaften* **51**: 295-296
- Michniewicz M und Kamienska A (1965)** Flower formation induced by kinetin und vitamin E treatment in long-day plant (*Arabidopsis thaliana*) grown in short day. *Naturwissenschaften* **52**: 623
- Miernyk JA (2001)** The J-domain proteins of *Arabidopsis thaliana*: an unexpectedly large and diverse family of chaperones. *Cell Stress Chaperones* **6**: 209-218

- Munné-Bosch S und Alegre L (2002)** The function of totopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **21**: 31-57
- Nelson RS und van Bel AJE (1998)** The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. *Prog. Bot.* **59**: 476-533
- Nurkiyanova KM, Ryabov EV, Commandeur U, Duncan GH, Canto T, Gray SM, Mayo MA und Taliansky ME (2000)** Tagging potato leafroll virus with the jellyfish green fluorescent protein gene. *J. Gen. Virol.* **81**: 617-26
- Olesinski AA, Almon E, Navot N, Perl A, Galun E, Lucas WJ und Wolf S (1996)** Tissue-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic potato plants alters plasmodesmal function and carbohydrate partitioning. *Plant Physiol.* **111**: 541-550
- Oparka KJ, Roberts AG, Boevink P, Santa Cruz S, Roberts I, Pradel KS, Imlau A, Kotlitzki G, Sauer N und Epel B (1999)** Simple, but not branched, plasmodesmata allow the non-specific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* **97**: 743-754
- Oparka KJ und Santa Cruz S (2000)** The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 323-347
- Paap (2002)** Wechselwirkung zwischen Genprodukten des Kartoffelblattrollvirus (PLRV) und Wirtsfaktoren der Kartoffel (*Solanum tuberosum*). Dissertation, Universität zu Köln
- Patrick JW (1997)** Phloem unloading: Sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 191-222
- Peremyslov VV, Hagiwara Y und Dolja VV (1999)** HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14771-14776
- Pilon M und Schekman R (1999)** Protein translocation: how Hsp70 pulls it off. *Cell* **97**: 679-682
- Poirson A, Turner A, Giovane C, Berna A, Roberts K und Godefroy-Colburn T (1993)** Effect of the alfalfa mosaic virus movement protein expressed in transgenic plants on the permeability of plasmodesmata. *J. Gen. Virol.* **74**: 2459-2461
- Porfirova S, Bergmuller E, Tropf S, Lemke R und Dörmann P (2002)** Isolation of an Arabidopsis mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 12495-500
- Provencher LM, Miao L, Sinha N und Lucas WJ (2001)** Sucrose export defective1 encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signalling. *Plant Cell* **13**: 1127-1141
- Qu N (2001)** Establishment of a chemical-inducible expression system for manipulating primary metabolism in transgenic plants. Dissertation, Universität Rostock
- Radford JE und White RG (1998)** Localization of a myosin-like protein to plasmodesmata. *Plant J.* **14**: 743-750
- Rassow J, Maarse AC, Krainer E, Kubrich M, Muller H, Meijer M, Craig EA und Pfanner N (1994)** Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J. Cell. Biol.* **127**: 1547-1556
- Reichel C, Mas P und Beachy RN (1999)** The role of the ER and cytoskeleton in plant viral trafficking. *Trends Plant Sci.* **4**: 458-462
- Reichel C und Beachy RN (2000)** Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. *J. Virol.* **74**: 3330-3337



- Revers F, Le Gall O, Candresse T und Maule AJ (1999)** New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* **12**: 367-376
- Reichelt S, Knight AE, Hodge TP, Baluska F, Samaj J, Volkmann D und Kendrick-Jones J (1999)** Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *Plant J* **19**: 555-567
- Riesmeier JW, Willmitzer L und Frommer WB (1992)** Isolation and characterisation of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* **11**: 4705-4713.
- Riesmeier JW, Frommer WB und Willmitzer L (1994)** Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J.* **13**: 1-7
- Ritzenthaler C, Findlay K, Roberts K und Maule AJ (2000)** Rapid detection of plasmodesmata in purified cell walls. *Protoplasma* **211**: 165-171
- Roberts AG, Cruz SS, Roberts IM, Prior D, Turgeon R und Oparka KJ (1997)** Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a fluorescent solute with a fluorescent Virus. *Plant Cell* **9**: 1381-1396
- Roberts IM, Boevink P, Roberts AG, Sauer N, Reichel C und Oparka KJ (2001)** Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. *Protoplasma* **218**: 31-44
- Rocha-Sosa M, Sonnewald U, Frommer W, Stratmann M, Schell J und Willmitzer L (1989)** Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J.* **8**: 23-29
- Romeis T, Ludwig AA, Martin R und Jones JD (2001)** Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J.* **20**: 5556-5567
- Rojas MR, Zerbini FM, Allison RF, Gilbertson RL und Lucas WJ (1997)** Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**: 283-295
- Rosahl S, Schell J und Willmitzer L (1987)** Expression of a tuber-specific storage protein in transgenic tobacco plants: demonstration of an esterase activity. *EMBO J.* **6**: 1155-1159
- Roslan HA, Salter MG, Wood CD, White MRH, Croft KP, Robson F, Coupland G, Doonan J, Laufs P, Tomsett AB und Caddick MX (2001)** Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **28**: 225-235
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B und Lucas WJ (1999)** Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* **126**: 4405-4419
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B und Lucas WJ (2001)** The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 202-209
- Russin WA, Evert RE, Vanderveer PJ, Sharkey TD und Briggs SP (1996)** Modification of a specific class of plasmodesmata and loss of sucrose export ability in a *sucrose export defective1* maize mutant. *Plant Cell* **8**: 645-658.
- Ryabov EV, Roberts IM, Palukaitis P und Taliansky M (1999)** Host-specific cell-to-cell and long-distance movements of cucumber mosaic virus are facilitated by the movement protein of groundnut rosette virus. *Virology* **260**: 98-108
- Ryabov EV, Robinson DJ und Taliansky M (2001)** Umbravirus-encoded proteins both stabilize heterologous viral RNA and mediate its systemic movement in some plant species. *Virology* **288**: 391-400

- Salter MG, Salter MG, Paine JA, Riddell KV, Jepson I, Greenland AJ, Caddick MX und Tomsett AB (1998)** Characterisation of the ethanol-inducible alc gene expression system for transgenic plants. *Plant J.* **16:** 127-132
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Santa Cruz (1999)** Perspective: phloem transport of viruses and macromolecules - what goes in must come out. *Trends Microbiol.* **7:** 237-241
- Savenkov EI und Valkonen JP (2001a)** Coat protein gene-mediated resistance to Potato virus A in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *J. Gen. Virol.* **82:** 2275-2278
- Savenkov EI und Valkonen JP (2001b)** Potyviral helper-component proteinase expressed in transgenic plants enhances titers of Potato leaf roll virus but does not alleviate its phloem limitation. *Virology* **283:** 285-293
- Schiestel RH und Gietz RD (1989)** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Gen.* **16:** 339-346
- Schobert C, Grossmann P, Gottschalk M, Komor E, Pecsvaradi A und Zurnieden U (1995)** Sieve-tube exudate from *Ricinus communis* L. seedlings contains ubiquitin and chaperones. *Planta* **196:** 205-210
- Schobert C, Lucas WJ, Franceschi VR und Frommer WB (2000)** Intercellular transport and phloem loading of sucrose, oligosaccharides and amino acids. In: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism* (Leegood RC, Sharkey TD und von Caemmerer S, eds) pp. 249-274, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Schreiber U, Endo T, Mi H und Asada K (1986)** Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* **10:** 51-62.
- Schmitz J, Stussi-Garaud C, Tacke E, Prüfer D, Rohde W und Rohfritsch O (1997)** *In situ* localisation of the putative movement protein (pr17) from the potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* **235:** 311-322
- Shalitin D und Wolf S (2000)** Cucumber mosaic virus infection affects sugar transport in melon plants. *Plant Physiol.* **123:** 597-604
- Shalitin D, Wang Y, Omid A, Gal-On A und Wolf S (2002)** Cucumber mosaic virus movement protein affects sugar metabolism and transport in tobacco and melon plants. *Plant Cell Environ.* **25:** 989-997
- Siemering KR, Golbik R, Sever R und Haseloff, J (1996)** Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* **6:** 1653-1663
- Simón-Buela L und Garcia-Arenal F (1999)** Virus particles of cucumber green mosaic tobamovirus move systemically in the phloem of infected cucumber plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12:** 277-291.
- Smith NA, Singh SP, Wang NB, Stoutjesdijk PA, Green AG und Waterhouse PM (2000)** Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407:**319-320
- Soellick T, Uhrig JF, Bucher GL, Kellmann JW und Schreier PH (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
- Sokolova M, Prüfer D, Tacke E und Rohde W (1997)** The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett* **400:** 201-205

- Stitt M (1996)** Plasmodesmata play an essential role in sucrose export from leaves: A step toward an integration of metabolic biochemistry and cell biology. *Plant Cell* **8**: 565-571
- Stitt M, Mc Lilley R, Gerhardt R und Heldt HW (1989)** Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol.* **174**: 518-552
- Sturm A und Tang GQ (1999)** The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* **4**: 401-407
- Sullivan CS und Pipas JM (2001)** The virus-chaperone connection. *Virology* **287**: 1-8
- Sweetman JP, Chu C, Qu N, Greenland AJ, Sonnewald U und Jepson I (2002)** Ethanol vapor is an efficient inducer of the alc gene expression system in model and crop plant species. *Plant Physiol.* **129**: 943-948
- Tacke E, Prüfer D, Schmitz J und Rohde W (1991)** The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic-acid binding protein. *J Gen. Virol.* **72**: 2035-2038
- Tacke E, Schmitz J, Prüfer D und Rohde W (1993)** Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic  $\alpha$ -helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* **197**: 274-282
- Tacke E, Salamini F und Rohde W (1996)** Genetic engineering of potato for broad spectrum protection against virus infection. *Nat. Biotechnol.* **14**: 1597-1601
- Talianski M und Barker H (1999)** Movement of luteoviruses in infected plants. In: *The Luteoviridae* (Smith HG und Barker H, eds) pp. 69-81, Wallingford: CAB International
- Tanaka R, Oster U, Kruse E, Rudiger W und Grimm B (1999)** Reduced activity of geranylgeranyl reductase leads to loss of chlorophyll and tocopherol and to partially geranylgeranylated chlorophyll in transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for geranylgeranyl reductase. *Plant Physiol.* **120**: 695-704
- Técsi LI, Maule AJ, Smith AM und Leegood RC (1994a)** Metabolic changes in cotyledons of *Cucurbita pepo* infected by cucumber mosaic virus. *J. Exp. Bot.* **45**: 1541-1551
- Técsi LI, Maule AJ, Smith AM und Leegood RC (1994b)** Complex, localized changes in CO<sub>2</sub> assimilation associated with the susceptible interaction between cucumber mosaic virus and a cucurbit host. *Plant J.* **5**: 837-847
- Técsi LI, Smith AM, Maule AJ und Leegood RC (1996)** A spatial analysis of physiological changes associated with infection of cotyledons of marrow plants with cucumber mosaic virus. *Plant Physiol.* **111**: 975-985
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000)** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Thompson GA und Schulz A (1999)** Macromolecular trafficking in the phloem. *Trends Plant Sci.* **4**: 354-360
- Tilney LG, Cooke TJ, Connelly PS und Tilney MS (1991)** The structure of plasmodesmata as revealed by plasmolysis, detergent extraction, and protease digestion. *J. Cell Biol.* **112**: 739-747
- Turgeon R (1989)** The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 119-138
- Turner A, Wells B und Roberts K (1994)** Plasmodesmata of maize root tips: structure and composition. *J. Cell Sci.* **107**: 3351-3361
- Ueki S und Citovsky V (2001)** RNA commutes to work: regulation of plant gene expression by systemically transported RNA molecules. *Bioessays* **23**: 1087-1090
- Urcuqui-Inchima S, Haenni AL und Bernardi F. (2001)** Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res* **74**: 157-75

- Vaquero C, Turner AP, Demangeat G, Sanz A, Serra MT, Roberts K und Garcia-Luque I (1994)** The 3a protein from cucumber mosaic virus increases the gating capacity of plasmodesmata in transgenic tobacco plants. *J Gen. Virol.* **141**: 987-999
- van Bel AJE (1993)** Strategies of phloem loading in source leaves. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **44**: 253-281.
- van Kooten O und Snell JFH (1990)** The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* **25**: 147-150
- Vervliet G, Holsters M, Tecuhy H, van Montagu M und Schell J (1975)** Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *J. Gen. Virol.* **26**: 33-48
- Voinnet O (2001)** RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* **17**: 449-459.
- von Barga S, Salchert K, Paape M, Piechulla B und Kellmann JW (2001)** Interactions between the tomato spotted wilt virus movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 1083-1093
- von Schaewen A, Stitt M, Schmidt R, Sonnewald U und Willmitzer L (1990)** Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and Arabidopsis plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants *EMBO J.* **9**: 3033-3044
- Waiemann E, Lucas WJ, Citovsky V und Zambryski P (1994)** Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1433-1437
- Waiemann, E, Turner A, Peart J, Roberts K und Zambryski P (1997)** Ultrastructural analysis of leaf trichome plasmodesmata reveals major differences from mesophyll plasmodesmata. *Planta* **203**: 75-84
- Waiemann E, Chen MH, Bachmaier R, Ghoshroy S und Citovsky V (2000)** Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *EMBO J.* **19**:4875-4884
- Wang D und Maule AJ (1995)** Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication. *Science* **267**: 229-231
- Wang HL, Wang Y, Giesman-Cookmeyer D, Lommel SA und Lucas WJ (1998)** Mutations in viral movement protein alter systemic infection and identify an intercellular barrier to entry into the phloem long-distance transport system. *Virology* **245**: 75-89
- Wang J und Wilkinson MF (2000)** Site-directed mutagenesis of large (13-kb) plasmids in a single-PCR procedure. *Biotechniques* **29**: 976-978
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG und Waterhouse PM (2001)** Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* **27**: 581-590
- White RF und Antoniw JF (1991)** Virus-induced resistance responses in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **9**: 443-455
- White RG, Badelt K, Overall RL und Vesik M (1994)** Actin associated with plasmodesmata. *Protoplasma* **180**: 169-184

- Whitham SA, Anderberg RJ, Chisholm ST und Carrington JC (2000)** *Arabidopsis* RTM2 gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell* **12**: 569-582
- Wittmann S, Chatel H, Fortin MG und Laliberté JF (1997)** Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**: 84-92
- Wolf S, Deom CM, Beachy RN und Lucas WJ (1989)** Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* **246**: 377-379
- Wolf S, Deom CM, Beachy RN und Lucas WJ (1991)** Plasmodesmatal functioning is probed using transgenic tobacco plants that express a virus movement protein. *Plant Cell* **3**: 593-604
- Wu X, Weigel D und Wigge PA (2002)** Signaling in plants by intercellular RNA and protein movement. *Genes Dev* **16**: 151-158
- Xoconostle-Cázares B, Xiang Y, Ruiz-Medrano R, Wang HL, Monzer J, Yoo BC, McFarland KC, Franceschi VR und Lucas WJ (1999)** Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* **283**: 94-98.
- Xoconostle-Cázares B, Ruiz-Medrano R und Lucas WJ (2000)** Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b<sub>5</sub> reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. *Plant J.* **24**: 735-47
- Yahalom A, Warmbrodt RD, Laird DW, Traub O, Revel JP, Willecke K und Epel BL (1991)** Maize mesocotyl plasmodesmata proteins cross-react with connexin gap junction protein antibodies. *Plant Cell* **3**: 407-417
- Yalpani N, Silverman P, Wilson TM, Kleier DA und Raskin I (1991)** Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* **3**: 809-818
- Yalpani N, Leon J, Lawton MA und Raskin I (1993)** Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* **103**: 315-321
- Yanisch-Perron C, Vieira J und Messing J (1985)** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119
- Yeast Protocol Handbook (1999)** Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA
- Yu TS, Kofler H, Hausler RE, Hille D, Flugge UI, Zeeman SC, Smith AM, Kossmann J, Lloyd J, Ritte G, Steup M, Lue WL, Chen J und Weber A (2001)** The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell* **13**: 1907-18
- Zambryski P und Crawford K (2000)** Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **16**: 393-421
- Zeeman SC, Umemoto T, Lue WL, Au-Yeung P, Martin C, Smith AM und Chen J (1998a)** A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen. *Plant Cell* **10**: 1699-1712
- Zeeman SC, Northrop F, Smith AM und Rees T (1998b)** A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. *Plant J.* **15**: 357-365

- 
- Zhao R, Dielen V, Kinet JM und Boutry M (2000)** Cosuppression of a plasma membrane H(+)-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility. *Plant Cell* **12**: 535-546
- Zimmermann R (1998)** The role of molecular chaperones in protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *Biol. Chem.* **379**: 275-282
- Zuo J und Chua NH (2000)** Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Curr Opin. Biotechnol.* **11**: 146-151

## 8 ANHANG

### I. Sequenzen

#### I.1 DNA-Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäure-Sequenz des Klons *NtCPIP1* aus *Nicotiana tabacum*.

```

gcaaaagagcgagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagaaa 60
atgggcgttgattactacaaaatactcaaagtgtcacgcaatgagagtggaagaagatttg 120
  M G V D Y Y K I L K V S R N A S E E D L 20
aaaaaatcgtacaagcgattggcgatgaaatggcatccggataagaacagtgagaaaagaa 180
  K K S Y K R L A M K W H P D K N S E K E 40
gcagaagcgaaattcaagcagatatcggaggcctatgatgtgctaagtgatccacagaag 240
  A E A K F K Q I S E A Y D V L S D P Q K 60
cgtcagatctatgatataacggcgatgaggcggttgaaatcgggtcaattcgatccctcg 300
  R Q I Y D I Y G D E A L K S G Q F D P S 80
tcacctatgaatggtaatgggagaggatttaagttcgattcgcgtgatgcggaagatatt 360
  S P M N G N G R G F K F D S R D A E D I 100
tttgcggaatTTTTTGGTGGATCGGATGGGTATAGTAGGAGTCTACTGGTGGTACTGTA 420
  F A E F F G G S D G Y S R S P T G G T V 120
cggattaggaagccggcgccgggtggagaacaagttgccatgtagcttgagggaattgtac 480
  R I R K P A P V E N K L P C S L E E L Y 140
aagggttctaagaggaagatgaagatttcaaggattgttcttgatgtcactggtaagcct 540
  K G S K R K M K I S R I V L D V T G K P 160
acaacaattgaagaggtcttggcaatacacattaaacctggttggaagaaaggcacaaaa 600
  T T I E E V L A I H I K P G W K K G T K 180
atcactttccagagaaaagggaaacatgaacctggagctgcacctggatcttattttt 660
  I T F P E K G N H E P G A A P G D L I F 200
gtaatcgatgaaaagccacatgatgtcttcaagagagatggaaatgatctagtgatcaat 720
  V I D E K P H D V F K R D G N D L V I N 220
cagaaaatctcattagtagatgctctctctgggaagattatcaacttggctactttggat 780
  Q K I S L V D A L S G K I I N L A T L D 240
ggaagggaaactcacgataccaatcacagatgttgtaagccaggacatgagcagataatc 840
  G R E L T I P I T D V V K P G H E Q I I 260
gcagatgaaggaatgccaatatcaaaagaacccgggaagaaaggaaatttgaggatcaag 900
  A D E G M P I S K E P G K K G N L R I K 280
tttgaggttaagttcccgtcaaggcttagttcagatcagaaattggatcagaagagtg 960
  F E V K F P S R L S S D Q K L D I R R V 300
ctgggcaggactgttgactaatccagtgttaacttaagggtatcactaacactgactgat 1020
  L G R T V D - 305
tgtggaagtgcgaatggaatgtaaatacttggaaagtttatgctagacaggagaattgtgc 1080
  atagtaggattattgttttgacgatgcctctcaaagtttagttttatttagcgcataaa 1140
aggagcactctagcagctatgccagctgcctatgtaattctcatgttgatattaacac 1200
  cttaggtagtttactaagtttaagtgtttgatttggaggtagatgctatacttcaagtaa 1260
ttggagtcgggaatagcttgctatcttgttctgggttgtgaatttcaactgtgggctgtgg 1320
  tagactggtaatgaataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1371

```

## I.2 DNA-Sequenz der kodierenden Region und daraus abgeleitete Aminosäure-Sequenz des Klons *NtCPIP2a* aus *Nicotiana tabacum*.

```

atgggacttgattactataacgtactaaaagtatctcggaatgcaagtgaagaagattta 60
M G L D Y Y N V L K V S R N A S E E D L 20
aagagatcgtacaagcgattagctatgaaatggcatccagataagaacagtcagaacaaa 120
K R S Y K R L A M K W H P D K N S Q N K 40
aaagaagcagaagcaaaattcaagcagatcttctgaagcgtatgatgtgcttagtgatcct 180
K E A E A K F K Q I S E A Y D V L S D P 60
aagaagcgtcagatctatgacgtgtacgggtgatgatgcattgaaatccgggtcaatttgcc 240
Q K R Q I Y D V Y G D D A L K S G Q F A 80
tcggcgtcgcgactagtgctggttagtaacgccagaggggttaggttcaatacgcgtgat 300
S A S P T S A G S N A R G F R F N T R D 100
gcgaggctatTTTTGctgagTTTTcggtggatcgggttagtaattccgggtgccggagtc 360
A E A I F A E F F G G S G S N S G A G V 120
ggtcgaagggcggcggcggtggagaataaactgccgtgtagcttggaggagctttacaaa 420
G R K A A P V E N K L P C S L E E L Y K 140
ggttctagaagaaaaatgaagatctcacggattcttctggatgactctggtaagcctaca 480
G S R R K M K I S R I L L D D S G K P T 160
actgttgaagaggtccttagcgatacacatcaagcctgggttgaagaaaggcacaaaaatc 540
T V E E V L A I H I K P G W K K G T K I 180
actttcccagagaaaggaaactatgagcctggagctactcctgggtgatcttatttttggtg 600
T F P E K G N Y E P G A T P G D L I F V 200
atagatgaaaagccgcgatgctgtcttcaagagggatggaaatgatctggagatcaatcag 660
I D E K P H A V F K R D G N D L E I N Q 220
aaaatttctttactagatgctcttactgggaaaactataagcttgatcactttggatgga 720
K I S L L D A L T G K T I S L I T L D G 240
cgggaactcacataccaatcacagatattgttaaaccaggacatgagcatataatccca 780
R E L T I P I T D I V K P G H E H I I P 260
aatgaaggaatgccaatatcaaaggaacgtggcaagaaaggaaatttgaagatcaagttt 840
N E G M P I S K E R G K K G N L K I K F 280
gacattaaattcccatcaaggctaagtgcagatcagaaatctgatatcaggaggggtactg 900
D I K F P S R L S A D Q K S D I R R V L 300
tgcaggagcgtgactaa 918
C R S A D - 305

```

## I.3 DNA-Sequenz der kodierenden Region und daraus abgeleitete Aminosäure-Sequenz des Klons *NtCPIP2b* aus *Nicotiana tabacum*.

```

atgggacttgattactatgacgtactgaaagtatctcggaatgcaagtgaagaagattta 60
M G L D Y Y D V L K V S R N A S E E D L 20
aagagatcgtataagcgattagcgatgaaatggcatccagataagaacagtcagaacaaa 120
K R S Y K R L A M K W H P D K N S Q N K 40
aaggaagctgaagcgaaattcaagcagatcttctgaagcgtatgatgtgcttagtgatcct 180
K E A E A K F K Q I S E A Y D V L S D P 60
cagaagcgtcagatctatgacgtgtacgggtgatgatgcattgaaatccgggtcaatttgct 240
Q K R Q I Y D V Y G D D A L K S G Q F A 80
tcggcgtcgcgactagtgctggttagtaacggcagaggttaggttcaatacgcgtgac 300
S A S P T S A G S N G R G F R F N T R D 100
gcgaggctatTTTTGctgagTTTTcggtggatcggatagtaattccgctgccggagta 360
A E A I F A E F F G G S D S N S A A G V 120
ggtcgaagggcggcaccgggtggagaataaactgccgtgtagcttggaggagctttacaaa 420
G R K A A P V E N K L P C S L E E L Y K 140
ggatctagaagggaaaatgaagatctcacggattcttcttgatgactctggtaagcctaca 480
G S R R K M K I S R I L L D D S G K P T 160

```



```

actgttgaagaggtcctagcgatacacatcaaaccaggttgaagaaaggcacaataatc 540
T V E E V L A I H I K P G W K K G T K I 180
actttcccagagaaaggaactatgaacctggagctactcctggatccttattttgtg 600
T F P E K G N Y E P G A T P G D L I F V 200
atagatgaaaagccacatgctgtcttcaagagggatggaaatgatctagtgatcaatcag 660
I D E K P H A V F K R D G N D L V I N Q 220
aaaatatctttactagatgctcttactgggaaaactataagcttgatcactttggatgga 720
K I S L L D A L T G K T I S L I T L D G 240
cgggaactcacaataccaatcacagatggttgttaaaccaggacatgagcatataatccca 780
R E L T I P I T D V V K P G H E H I I P 260
aatgaaggaatgccaatatcaaaggaacgtggcaagaaaggaaatttgaagatcaagttt 840
N E G M P I S K E R G K K G N L K I K F 280
gacattaaattcccacttaggctaagtgcagatcagaaatctgatatcaggagggtactg 900
D I K F P S R L S A D Q K S D I R R V L 300
tgcaggaactctgactaa 918
C R N S D - 305

```

#### I.4 DNA-Sequenz und daraus abgeleitete Aminosäure-Sequenz des Capsid Proteins (CP) eines *Potato virus Y* (Stamm N) Feldisolates (vgl. Herbers *et al.*, 1996a)

```

gcaaatgcacacaattgatgcaggaggaagctctaagaaagatgcaaaccaagagcaaagt 60
A N D T I D A G G S S K K D A N Q E Q S 20
agcattcaaccaaattcccaacaagagaaaggaagacgtgaatggtggaacatctgga 120
S I Q P N P N K R K E K D V N V G T S G 40
actcacactgtgccacgaattaaagctatcacgtccaaaatgagaatgcccaagagtaag 180
T H T V P R I K A I T S K M R M P K S K 60
Ggtgcaactgtactaaatttagaacatttactcgagtatgctccacagcaaattgacatc 240
G A T V L N L E H L L E Y A P Q Q I D I 80
tcaaatactcgagcaactcaatcacagtttgatacatggatgaagcagtacaacttgca 300
S N T R A T Q S Q F D T W Y E A V Q L A 100
tacgacataggagaaactgaaatgccaaactgtgatgaatgggcttatggtttggatgca 360
Y D I G E T E M P T V M N G L M V W C I 120
gaaaatggaacctcgccaaatatcaatggagtttgggttatgatggatggagatgaacaa 420
E N G T S P N I N G V W V M M D G D E Q 140
atcgaatacccaactaaaaccaatcgttgagaatgcaaaaccaacttaggcaaatcatg 480
I E Y P L K P I V E N A K P T L R Q I M 160
gcacatttctcagatggtgcagaagcgtacatagaaatgcgcaacaaaaaggaaccatac 540
A H F S D V A E A Y I E M R N K K E P Y 180
atgccacgatatggttttagttcgtaatctgcgcgatggaagtttggctcgctatgctttt 600
M P R Y G L V R N L R D G S L A R Y A F 200
gacttttatgaagtacatcacgaacaccagtgagggctagagaggcacacattcaaagt 660
D F Y E V T S R T P V R A R E A H I Q M 220
aaggccgcagcttttaaatcagctcaatctcgacttttcggattggatggtggcatcagt 720
K A A A L K S A Q S R L F G L D G G I S 240
acacaagagggaaaacacagagaggcacaccaccgaggatgtttctccaagtatgcatact 780
T Q E E N T E R H T T E D V S P S M H T 260
ctacttggagtcaagaacatg 801
L L G V K N M 267

```

## I.5 DNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäure-Sequenz des Klons *StSXD1* aus *Solanum tuberosum*.

```

gttgccgctcctcaaaaactctacaatcccacctttgatccaaaatcaaccatggagagc 60
                                                                M E S 3
ttttatagtgtttccgccattttctccaatttcgaaaaatgttggattttctaggattagg 120
  F Y S V S A I S P I S K N V G F S R I R 23
accgaatttgcaacttcaattgcaaatggggaactttttttgaataattattcatctact 180
  T E F A T S I A N G E L F L N N Y S S T 43
atcctgaaggtgcagctctcaaaaatcaagacatgcattttgtagtcaaagctgattcatct 240
  I L K V Q S Q K S R H A F V V K A D S S 63
gttgacaccacaaagaaggaaaacagggagcctgtgaaaccgctttactcttctacgcct 300
  V D T T K K E N R E P V K P L Y S S T P 83
tctaatcgtcctcttcgaactcctcatagcgggtatcattttgatggaagtaccaggaaa 360
  S N R P L R T P H S G Y H F D G S T R K 103
ttctttgaagggttggttctttaaggtatcaattccagagtgccagacagagtttctgcttc 423
  F F E G W F F K V S I P E C R Q S F C F 123
atgtattctgtagagagtcctttcatttaccagaataaagcagctttgaggagctgcaa 480
  M Y S V E S P S F T K K L S S F E E L Q 143
tatggtcctcgggttactggtgtgggagctcaaattcttgggtgcagatgacaagtacatt 540
  Y G P R F T G V G A Q I L G A D D K Y I 163
tgtcaatatagtgaagagcttcaaaccttctggggaagttaggcatgaactgatgcttgggt 600
  C Q Y S E E S S N F W G S R H E L M L G 183
aacacctttgttgcccaaaaatagtgtcaaaccccccaataaggaagttcgccctcaggag 660
  N T F V A Q N S A K P P N K E V R P Q E 203
ttcaatcaccgcgctcacagaggggtttcaagtcaccccactttggcatcaaggatctatt 720
  F N H R V T E G F Q V T P L W H Q G S I 223
cgagatgacgggaggacagattatactgaaattgtgaaaactgctagctgggagtatagc 780
  R D D G R T D Y T E I V K T A S W E Y S 243
acacggcccatttatggatggggcgatgttaactcaaagcagaagtccacggcaggatgg 840
  T R P I Y G W G D V N S K Q K S T A G W 263
cctgctgcttttccagatatttgagccacattggcaagtttgcatggcagctggactttca 900
  P A A F P V F E P H W Q V C M A A G L S 283
acaggctggatagagtgggatgggtcagcgggtttgagtttcaaatgccccttcttactcc 960
  T G W I E W D G Q R F E F Q N A P S Y S 303
gaaaagaactgggtggttcccttcccaagaagtgggttttgggtccagtgagtgatgt 1020
  E K N W G S F P R K W F W V Q C S V F 323
gaaggtgcaattggagatggttggcttggactgctggtggtggtggttaaggcgacttccggga 1080
  E G A I G D V A L T A G G G L R R L P G 343
ttgaatgagacttttgaaagtgttgctctgataggaattcactatggaggtatcttctat 1140
  L N E T F E S V A L I G I H Y G G I F Y 363
gaatttgttccatggaatgctagtggttagttgggaaatcactccctggggtaaattggcat 1200
  E F V P W N A S V S W E I T P W G K W H 383
atatctgctggagaatgagacacatatggtattactagaagcaacaacagaagatcctgga 1260
  I S A E N E T H M V L L E A T T E D P G 403
accacattgctgggctcctacagaagagatgggactcgctcctgctgctgtagagacacttgt 1320
  T T L R A P T E E M G L A P A C R D T C 423
ttcgggtgagctaagactgcagttgtgggaacggaagagtaatgggagtaaaggagaggtt 1380
  F G E L R L Q L W E R K S N G S K G E V 443
attttgatgttacaagcaatatggcaggtctagaagttgggggagggccatggttcaac 1440
  I L D V T S N M A G L E V G G G P W F N 463
acatgggagggaaaagcagagatgccggaaattgttactcgagctatcaatgttctctgtg 1500
  T W E G K A E M P E I V T R A I N V P V 483
gatttgatggcatattcagctgtggttcccttctcacttctcaaacctcctggcctttgagca 1560
  D L D G I F S C V P S L L K P P G L - 501
aaaggcaaaaaggagcaactttatggcaaaactagttatagaatgagaatcattatact 1620
tgattacattttgtaaatagcctcatcttgcctattgacttgtctcaggttgcacctaa 1680
cagtatttttatggaaaatcttattgctagtatagcagaa 1720

```

II. Sequenzvergleich von SXD1-Proteinen

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| StSXD1 | M E S F Y S V S A I S P I S K N V G F S R I R T E F A T S I A N G E L F L N N Y S S T I L K V Q S Q K S R H A F V V K A     | 60  |
| AtSXD1 | M E I R S L I V S M N P N L S S F E L S R P - - - - - V S P L T R S L V P F R S S T K L V P R S I S R V                     | 46  |
| ZmSXD1 | - - - - - M N L A V A A A L P S - - - - - V T P R T G V V L P R S S R R H C F R G V V P R                                   | 35  |
| TeSXD1 | - - - - -   | 0   |
| NoSXD1 | - - - - -   | 0   |
| SySXD1 | - - - - -   | 0   |
|        |   |     |
| StSXD1 | D S S V D T T K - K E N R E P V K P L Y S S T P S N R R L R T P H S G Y H F D G S T R K F F E G W F F K V S I P E C R Q     | 119 |
| AtSXD1 | S A S I S T P N S E T D K I S V K P V Y V P T S P N R E L R T P H S G Y H F D G T P R K F F E G W Y F R V S I P E K R E     | 106 |
| ZmSXD1 | A A S S S V S S F T S P S A A A A P I Y T P P Q D R S L R T P H S G Y H F D G T A R P F F E G W Y F K V S I P E C R Q       | 95  |
| TeSXD1 | - - - - - M K I Y P L Q T P H S G Y H W D G S D R R F F E G W Y Y R V T L P E K Q   | 37  |
| NoSXD1 | - - - - - M R S P T M F K T L Q T P H S G Y H W D G S S R R F F E G W Y Y R V T L P D C G Q                                 | 41  |
| SySXD1 | - - - - - M K F P P H S G Y H W Q G Q S - P F F E G W Y V R L L L P Q S G E   | 32  |
|        |   |     |
| StSXD1 | S F C F M Y S V E S P S F T K K L S S F E E L Q Y G P R F T G V G A Q I L G - - - - - A D D K Y I C Q Y S E E S S           | 171 |
| AtSXD1 | S F C F M Y S V E N P A F R Q S L S P L E V A L Y G P R F T G V G A Q I L G - - - - - A N D K Y L C Q Y E Q D S H           | 158 |
| ZmSXD1 | S F C F M Y S V E N P L F R D G M S D L D K L L Y R P R F T G V G A Q I L G - - - - - A D D K Y I C Q F S E K S N           | 147 |
| TeSXD1 | T F A F M Y S I E D P - - - - - I G - G Q P Y S G G A Q I L G - - - - - P N D E Y L C R T F P D V K                         | 77  |
| NoSXD1 | T F A F M Y S I E D P - - - - - I G - G K A Y S G G A A Q V L G - - - - - A D D E Y I C R T F P D V N                       | 81  |
| SySXD1 | S F A F M Y S I E N P - - - - - A S - D H H Y G G E A V Q I L G P A T K K Q E N Q E D Q L V W R T F P S V K                 | 80  |
|        |   |     |
| StSXD1 | N F W G S R H E L M L G N T F V A Q N S A K P N K E V R P Q E F N H R V T E G F Q V T P L W H Q G S I R D D G R T D Y       | 231 |
| AtSXD1 | N F W G D R H E L V L G N T F S A V P G A K A P N K E V E E E F N R R V S E G F Q A T P F W H Q G H I C D D G R T D Y       | 218 |
| ZmSXD1 | N F W G S R H E L M L G N T F I S N K E S T P P Q G E V P P Q D F S R R V L E G L Q V T P I W H Q G F I R D D G R S N Y     | 207 |
| TeSXD1 | K F W A T P E V L E L G - - H W G Q T N L T S P V G Y L D P Q L F E D Q I K E G Y Q A T A N W H Q G V L W D F R R N N Y     | 135 |
| NoSXD1 | K F W A S P D V L A L G - - H W G E T N L N T K P I Y L L P A E F E R H V Q Q G Y Q A T A T I N Q G I I A D P A T G N Y     | 139 |
| SySXD1 | K F W A S P R Q F A L G - - H W G K C R D N R Q A K P L L S E E F F A T V K E G Y Q I H Q N Q H Q G Q I I H G D R H - -     | 136 |
|        |   |     |
| StSXD1 | T E I V K T A S W E Y S T R P I Y G W G D V N S K Q K S T A G W P A A F P V F E P H W Q V C M A A G L S T G W I E W D G     | 291 |
| AtSXD1 | A E T V K S A R W E Y S T R P V Y G W G D V G A K Q K S T A G W P A A F P V F E P H W Q I C M A G G L S T G W I E W G G     | 278 |
| ZmSXD1 | V P N V Q T A R W E Y S T R P V Y G W G D V K S K Q L S T A G W L A A F P F F E P H W Q I C M A R G L S T G W I E W D G     | 267 |
| TeSXD1 | - - - - - C R W Q Y K T Q P I Y G W G N P A I Q Q S T A G W L S F L Q I F E P G W Q I L M A H G L A T G W I E W N G         | 189 |
| NoSXD1 | - - - - - C R W R Y E I Q P I Y G W G N Q D G I Q Q S T A G W L S F L Q I F E P G W Q I L M A H G L A T G W I D W N G       | 193 |
| SySXD1 | - - - - - C R W Q F T V E P E V T W G S E N R F P R A T A G W L S F L P L F D P G W Q I L L A Q G R A H G W L K W Q R       | 190 |
|        |   |     |
| StSXD1 | Q R F E F Q N A P S Y S E K N W G G S F P R K W F W V Q C S V F E G A I G D V A L T A G G G L R R L P G L N E T F E S V     | 351 |
| AtSXD1 | E R F E F R D A P S Y S E K N W G G G F P R K W F W V Q C N V F E G A T G E V A L T A G G G L R Q L P G L T E T Y E N A     | 338 |
| ZmSXD1 | E R F E F E N A P S Y S E K N W G G G F P R K W Y W I Q C N V F P G A S G E V S L T A A G G L R K I - G L G D T Y E S P     | 326 |
| TeSXD1 | R I Y K F T N A P A Y S E K N W G A F P K K W F W L N C N S F Y D V S - D L T L T A G G G K R - - - G V L W W M E K V       | 245 |
| NoSXD1 | K I Y Q F Q N A P A Y G E K N W G G A F P E K W F W L N C N S F D G E P - D L A L T A G G G R R - - - G V L W W M E S V     | 249 |
| SySXD1 | E Q Y E F D H A L V Y A E K N W G H S F P S R W F W L Q A N Y F P D H P - G L S V T A A G G E R - - - I V L G R P E E V     | 246 |
|        |   |     |
| StSXD1 | A L I G I H Y G G I F Y E F V P W N A S V S W E I T P W G K W H I S A E N E T H M V L L E A T T E D P G T T L R A P T E     | 411 |
| AtSXD1 | A L V C V H Y D G K M Y E F V P W N G V V R W E M S P W G Y W Y I T A E N E N H V V E L E A R T N E A G T P L R A P T I     | 398 |
| ZmSXD1 | S L I G I H Y E G Q F F E F V P W T G T V S W D I E I G L W G L W K M S G E N K T H L V E I E A T T A E S G T A L R A P T I | 386 |
| TeSXD1 | A M I G I H Y Q G K F Y E F V P W N S K V Y W Q I Q P W G E W Q M Q A K N D L F E V E L T A T T N H S G T L R A P S E       | 305 |
| NoSXD1 | A M I G L H Y Q G K F Y E F V P W N S K V E W N I Q P W G R W Q M K A K N L D Y E V E L T G T T H L P G T D L R A P T V     | 309 |
| SySXD1 | A L I G L H H Q G N F Y E F G P G H G T V T W Q V A P W G R W Q L K A S N D R Y W V K L S G K T D K K G S L V H T P T A     | 306 |
|        |   |     |
| StSXD1 | E M G L A P A C R D T C F G E L R L Q L W E R K S N G S K G E V I L D V T S N M A G L E V G G G P W F N T W E G - K A E     | 470 |
| AtSXD1 | E V G L A T A C R D S C Y G E L K L Q I W E R L Y D G S K G K V I L E T K S S M A A V E I G G G P W F G T W X G D T S N     | 458 |
| ZmSXD1 | E A G L V P A C K D T C Y G D L R L Q L W E K K Y D G S K G E M I L D A T S N M A A L E V G G G P W F N G W K G - T T V     | 445 |
| TeSXD1 | Q - G L I F L C R D T M R G H L T L K L K E V R - - D S H S K L I L E A R S D L C G L E V G G G S W E Q A W V K             | 358 |
| NoSXD1 | Q - G L Q Y C C R D T M Q G K L D V E L R Q I R - - G K N P L V L K A H S Y L C G L E I G G D S W S N S W Q S S             | 363 |
| SySXD1 | Q - G L Q L N C R D T T R G Y L Y L Q L G S V G - - - H G - L I I V Q G E T D T A G L E V G G - D W G L T E E N - - -       | 355 |
|        |   |     |
| StSXD1 | M P E I V T R A I N V P V D L D G I F S C V P S L L K P P G L   | 501 |
| AtSXD1 | T P E L L K Q A L Q V P L D L E S A L G L V P - F F K P P G L   | 488 |
| ZmSXD1 | V N E V V N N I V G T P V D V E S L L - P I P - F L K P P G L   | 474 |
| TeSXD1 |   | 358 |
| NoSXD1 |   | 363 |
| SySXD1 | L S K K T - - - - - V P F   | 363 |

Aminosäurevergleich von StSXD1 aus *Solanum tuberosum* mit orthologen Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* (AtSXD1, Genbank Acc.-Nr. AF302188) und Mais (ZmSXD1, AF302187) sowie aus den photosynthetischen Mikroorganismen *Trichodesmium erythraeum* (TeSXD1, ZP\_00073283), *Nostoc sp* (NoSXD1, BAB77769) und *Synechocystis sp.* (SySXD1; Acc.-Nr. BAA17775). Aminosäuren, die mit der Konsensussequenz übereinstimmen sind schwarz unterlegt. Der Aminosäurevergleich erfolgte mit der ClustalW-Methode im MegAlign-Programm (DnaStar Inc., Wisconsin, USA).

### III. Oligonukleotide

| <i>Bezeichnung</i> | <i>Sequenz</i>  | <i>Verwendung</i>                    |
|--------------------|---|--------------------------------------|
| D44                | 5'-AT GAA TTC GCA AAT GAC ACA ATT GAT GC-3'               | 5'-Primer PVY CP für pGBT9           |
| D45                | 5'-AT GTC GAC CAT GTT CTT GAC TCC AAG TAG-3'              | 3'-Primer PVY CP für pGBT9           |
| D83                | 5'-AT GGA TCC AAA CA ATG GCA ATG TCA ATG GTG GTG TAC-3'   | 5'-Primer MP17 für pUC- <i>alcA</i>  |
| D84                | 5'-AT GGA TCC TTA TCA TCC GCG CTT GAT AAG-3'              | 3'-Primer MP17 für pUC- <i>alcA</i>  |
| D85                | 5'-AT GGA TCC TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GC'-3'          | 3'-Primer mGFP5 für pUC- <i>alcA</i> |
| D117               | 5'-GAA TTC AGT GGC ACT GTG GAT GCT GGT GCT G-3'           | 5'-Primer TEV CP für pGBT9           |
| D118               | 5'-GGA TCC TCA CTG GCG GAC CCC TAA TAG TGT G-3'           | 3'-Primer TEV CP für pGBT9           |
| D126               | 5'-TGC ATT GAA AAT GGA ACC TGG CCA AAT ATC AAT GGA GTT-3' | fwd*-Primer für S125W Substitution   |
| D127               | 5'-AAC TCC ATT GAT ATT TGG CCA GGT TCC ATT TTC AAT GCA-3' | rev**-Primer für S125W Substitution  |
| D128               | 5'-AAT GCA AAA CCA ACA CTT GAC CAA ATC ATG GCA CAT TTC-3' | fwd-Primer für R157D Substitution    |
| D129               | 5'-GAA ATG TGC CAT GAT TTG GTC AAG TGT TGG TTT TGC ATT-3' | rev-Primer für R157D Substitution    |
| D130               | 5'-TTG GCT CGC TAT GCT TTT AGG TTT TAT GAA GTC ACA TCA-3' | fwd-Primer für D201R Substitution    |
| D131               | 5'-TGA TGT GAC TTC ATA AAA CCT AAA AGC ATA GCG AGC CAA-3' | rev-Primer für D201R Substitution    |
| D134               | 5'-GAA TTC AAG GAA AAG GAC GTG AAT GTT GG-3'              | 5'-Primer PVY CPΔ29N für pGBT9       |
| D135               | 5'-GTC GAC GTG CCT CTC TGT GTT TTC CTC TTG-3'             | 3'-Primer PVY CPΔ18C für pGBT9       |
| D153               | 5'-GGA TCC CAG AAA ATC TCA TTA GTA GAT GC-3'              | 5'-Primer NtCPIP1 für pUC-RNAi       |
| D154               | 5'-GTC GAC ATT CAT TAC CAG TCT ACC ACA GC-3'              | 3'-Primer NtCPIP1 für pUC-RNAi       |
| D172               | 5'-GGA TCC TCA CGC AAT GCG AGT GAA GAA G-3'               | 5'-Primer NtCPIP1 für RT-PCR         |
| D184               | 5'-GGA TCC GGG AGC TCA AAT TCT TGG TGC AGA TG-3'          | 5'-Primer StSXD1 für pUC-RNAi        |
| D185               | 5'-GTC GAC AAT GTG GTT CCA TGA TCT TTT GAA G-3'           | 3'-Primer StSXD1 für pUC-RNAi        |
| D202               | 5'-ATGGCAGACGGTGAGGATATTCA-3'                             | 5'-Primer Actin AC1 für RT-PCR       |
| D203               | 5'-GCCTTTGCAATCCACATCTGTTG-3'                             | 3'-Primer Actin AC2 für RT-PCR       |
| D227               | 5'-GAA TTC TCT CGG AAT GCA AGT GAA GAA G-3'               | 5'-Primer NtCPIP2a/bΔ11 für pAD-GAL4 |
| D230               | 5'-GTC GAC TTA GTC AGC GCT CCT GCA CAG TAC-3'             | 3'-Primer NtCPIP2a für pAD-GAL4      |
| D231               | 5'-GTC GAC TTA GTC AGA GTT CCT GCA CAG TAC-3'             | 3'-Primer NtCPIP2b für pAD-GAL4      |
| D235               | 5'-AT CAT ATG AGT GAT ACA GTA GAT GCT GGG-3'              | 5'-Primer TVMV CP für pGBKT7         |
| D236               | 5'-AT CAT ATG GCA GGT GAA ACG CTT GAC GCA GAC -3'         | 5'-Primer TuMV CP für pGBKT7         |
| D237               | 5'- AT GTC GAC TTA CAC CCC CTT AAC ACC CAG AAG-3'         | 3'-Primer TVMV CP für pGBKT7         |
| D238               | 5'-AT GTC GAC TCA TAA CCC CTG AAC GCC CAG C-3'            | 3'-Primer TuMV CP für pGBKT7         |
| D239               | 5'-CAT ATG GCC GAA ACT CTT GAT GCA AGC G-3'               | 5'-Primer PVA CP für pGBKT7          |
| D240               | 5'-GAA TTC GCC GAA ACT CTT GAT GCA AGC G-3'               | 5'-Primer PVA CP für pGBKT7          |
| D261               | 5'-GAA TTC TCA CGC AAT GCG AGT GAA GAA G-3'               | 5'-Primer NtCPIP1Δ11N für pAD-GAL4   |
| D262               | 5'-GAA TTC ATA TAC GGC GAT GAG GCG TTG-3'                 | 5'-Primer NtCPIP1Δ65N für pAD-GAL4   |
| D263               | 5'-GAA TTC ACT GGT GGT ACT GTA CGG ATT AGG-3'             | 5'-Primer NtCPIP1Δ115N für pAD-GAL4  |
| D264               | 5'-GTC GAC TTA GTC AAC AGT CCT GCC CAG CAC-3'             | 3'-Primer NtCPIP1 für pAD-GAL4       |
| D265               | 5'-GTC GAC ATG TCC TGG CTT AAC AAC ATC TGT G-3'           | 3'-Primer NtCPIP1Δ50C für pAD-GAL4   |
| D266               | 5'-GTC GAC TGG CTT TTC ATC GAT TAC AAA AAT-3'             | 3'-Primer NtCPIP1Δ100C für pAD-GAL4  |
| D278               | 5'-AGT TGC CGC TCC TCA AAA ACT CTA CAW TCC-3'             | 5'-Primer StSXD1 für pCR2.1          |
| D279               | 5'-TTC TGC TAT ACT AGC AAT AAG ATT TTC CAT-3'             | 3'-Primer StSXD1 für pCR2.1          |
| D280               | 5'-CGA ACT CCT CAT AGC GGG TAT C'-3'                      | fwd-Sequenzierprimer StSXD1          |
| D281               | 5'-AAT CGC CGC GTC ACA GAG GGT-3'                         | fwd-Sequenzierprimer StSXD1          |
| D282               | 5'-GGT GCA ATT GGA GAT GTT GCT-3'                         | fwd-Sequenzierprimer StSXD1          |
| D283               | 5'-CTG CAG TTG TGG GAA CGG AAG-3'                         | fwd-Sequenzierprimer StSXD1          |
| D284               | 5'-TCG AGT AAC AAT TTC CGG CAT-3'                         | rev-Sequenzierprimer StSXD1          |
| D285               | 5'- AGC AAC ATC TCC AAT TGC ACC-3'                        | rev-Sequenzierprimer StSXD1          |

|                            |   |   |
|----------------------------|---|---|
| <b>D286</b>                | 5'-ACC CTC TGT GAC GCG GCG ATT-3'   | rev-Sequenzierprimer StSXD1               |
| <b>D287</b>                | 5'-G ATA CCC GCT ATG AGG AGT TCG-3'                                       | rev-Sequenzierprimer StSXD1               |
| <b>D290</b>                | 5'-GGG ATC CGG ACT CCT CAT AGC GGG TAT CAT TTT G-3'                       | 5'-Primer StSXD1ΔTP für pQE11             |
| <b>D291</b>                | 5'-GTC GAC TCA AAG GCC AGG AGG TTT GAG AAG TGA AG-3'                      | 3'-Primer StSXD1ΔTP für pQE11             |
| <b>D292</b>                | 5'-GGG ATC CCC ATG GAG AGC TTT TAT AGT GTT TCC GC-3'                      | 5'-Primer StSXD1 für pQE11                |
| <b>D302</b>                | 5'-GAA TTC AAG TTC GAT TCG CGT GAT GCG GAA GAT -3'                        | 5'-Primer NtCPIP1Δ90N für pAD-GAL4        |
| <b>D303</b>                | 5'-GTC GAC AAA CTT GAT CCT CAA ATT TCC TTT CTT C-3'                       | 3'-Primer NtCPIP1Δ25C für pAD-GAL4        |
| <b>StSXD1-5'RACE</b>       | 5'-CTC TGT GAC GCG GCG ATT GAA CTC CTG AGG-3'                             | 5'-RACE Primer StSXD1                     |
| <b>StSXD1-3'RACE</b>       | 5'-GGA TTA AGG CGA CTT CCG GGA TTG AAT GAG-3'                             | 3'-RACE Primer StSXD1                     |
| <b>SMARTII 3'-RACE CDS</b> | 5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3''                            | Primer Smart RACE-Kit, Clontech           |
| <b>5'-RACE CDS</b>         | 5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA C(T) <sub>30</sub> N <sub>1</sub> N-3' | Primer Smart RACE-Kit, Clontech           |
| <b>UPM</b>                 | 5'-(T) <sub>25</sub> N <sub>1</sub> N-3'                                  | Primer Smart RACE-Kit, Clontech           |
| <b>NUP</b>                 | 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'                                       | Universal-Primer, Erststrangsynthese      |
| <b>Oligo-dT</b>            | 5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'                                      | Nested Universal-Primer                   |
|                            | 5'-(T) <sub>30</sub> N <sub>1</sub> -3'                                   | Oligo-dT-Primer für Reverse Transkription |

\*fwd, "forward"; \*\*rev, "reverse"; N<sub>1</sub> = A, G, oder C; N = A, C, G, oder T

## Publikationsliste

### Publikationen

- 2001** – D. Hofius, K. Herbers, M. Melzer, A. Omid, E. Tacke, S. Wolf und U. Sonnewald. Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the potato leafroll virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 28, 529-544.
- 2002** – F. Börnke, S. Biemelt, D. Hofius, M. Hajirezaei, S. Lepsky und U. Sonnewald. Gentechnik in der Pflanzenzüchtung – Stand und Perspektiven. *Vortr. Pflanzenzüchtung* 54, 153-161.
- 2003** – D. Hofius und U. Sonnewald. Vitamin E biosynthesis: Biochemistry meets cell biology. *Trends Plant Sci.* 8, 6-8.
- 2003** – S. Chen, D. Hofius, U. Sonnewald und F. Börnke. Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double-stranded RNA. *Plant J.* 36, 731-740.

### Posterbeiträge

- 2000** – D. Hofius, K. Herbers, M. Melzer, A. Omid, E. Tacke, S. Wolf und U. Sonnewald. Kohlenhydratmetabolismus in Abhängigkeit vom Expressionsniveau eines luteoviralen Movement Proteins in transgenen Tabakpflanzen. – 13. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Wermelskirchen-Dabringhausen, 08.-11.03.2000.
- 2000** – D. Hofius, K. Herbers, M. Melzer, A. Omid, E. Tacke, S. Wolf und U. Sonnewald. Luteoviral movement protein expression in transgenic plants: direct and indirect effects on assimilate partitioning. – EMBO Workshop `Plant Virus Invasion and Host Defence´, Kreta, Griechenland, 28.05-01.06.2000.
- 2001** – D. Hofius und U. Sonnewald. Dissecting the pleiotropic effect of PLRV movement protein on carbohydrate metabolism by ethanol-inducible expression in transgenic plants. – Plasmodesma 2001, Kapstadt, Südafrika, 19.-24.08.2001
- 2002** – D. Hofius, F. Börnke und U. Sonnewald. Identification of DnaJ-like chaperone as a capsid protein-binding host factor for potyvirus infection. – Institutstag, IPK Gatersleben, 17.10.2002.

### Patente

- 2002** – D. Hofius, F. Börnke und U. Sonnewald. Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit erhöhter Virusresistenz durch “Silencing” pflanzlicher DnaJ-ähnlicher Proteine (Patentanmeldung DE 102 32 978.8).

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Uwe Sonnewald für die Überlassung des Themas, die vielen stimulierenden Diskussionen, die große Unterstützung bei der Entwicklung und Umsetzung eigener Ideen sowie für das Vertrauen bei der Anfertigung diverser Manuskripte. Danken möchte ich auch für die großzügige Bereitstellung von Reisemitteln für die Teilnahme an verschiedenen Tagungen und insbesondere für die Möglichkeit eines zweimonatigen Forschungsaufenthaltes in Israel.

Frau Prof. Dr. Ulla Bonas und Herrn Prof. Dr. Ulf-Ingo Flüge danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekulare Pflanzenphysiologie“ bedanke ich mich für die anregende und angenehme Arbeitsatmosphäre, die unzähligen Hilfestellungen und Ratschläge im Laboralltag sowie die gemeinsamen Stunden außerhalb des Labors. Mein besonderer Dank gilt Anita Winger für die exzellente technische Unterstützung, die Bereitschaft zu außerplanmäßigen „Infektions“- und Ernteeinsätzen, sowie für die nötige Gelassenheit gegenüber meinen ergebnisabhängigen „Stimmungen“. Danken möchte ich auch meinem jahrelangen „Bench“- und Büronachbarn Dr. Frederik Börnke für seinen ansteckenden wissenschaftlichen Enthusiasmus und viele experimentelle Ideen, für die kritische Korrektur verschiedener Manuskripte und nicht zuletzt die häufige Bereitstellung eines „fahrbaren Untersatzes“. Nicole Wahle danke ich für die Hilfe bei allen organisatorischen Dingen und die vielen aufbauenden Frühstücks- und Kaffeerunden.

Dr. Henning Tschiersch danke ich herzlich für die Zusammenarbeit bei den „stressigen“ Experimenten in der Klimakammer und der Durchführung von Chlorophyllfluoreszenz- und Photosynthesemessungen. Dr. Michael Geiger (Sungene, Gatersleben) gilt mein besonderer Dank für die Tocopherol- und Cyclasemessungen und den Gedankenaustausch über den pflanzlichen Vitamin E-Stoffwechsel während der morgendlichen Fahrten nach Gatersleben.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Michael Melzer und Dr. Twan Rutten für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten und bei Bernhard Claus für die wertvolle Hilfe am konfokalen Laserscanning-Mikroskop bedanken.

Andrea Knospe und Sibylle Freist danke ich für die fürsorgliche Betreuung der Pflanzen in Gewebekultur, und stellvertretend für die Mitarbeiter der Gärtnerei gilt mein Dank Martina Maier, Katrin Eikenroth, und Enk Geyer für die Pflege der Pflanzen im Gewächshaus.

Besonders danke ich Prof. Dr. Shmuel Wolf für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe an der „Hebrew University of Jerusalem“ in Rehovot, Ayelet Omid für die kompetente Einführung in die Mikroinjektionsanalyse und Dr. Dror Shalitin für den regen Austausch über virale Movement Proteine. Danken möchte ich abschließend den Menschen, die mir am nächsten stehen und mich auf dem Weg bis hierher immer unterstützt haben, meinen Eltern, meiner Familie, Hans-Hartwig Jochum und vor allem Cecilia Nilsson, die mir über die Jahre trotz der Distanz zwischen Deutschland und Schweden Halt und Ziel gegeben hat.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

|               |               |
|---------------|---------------|
| Name          | Daniel Hofius |
| Geburtsdatum  | 8. Juni 1970  |
| Geburtsort    | Siegen        |
| Familienstand | ledig         |

## Schulbildung

|           |  |
|-----------|--|
| 1976-1980 | Grundschule in Bad Salzuflen                         |
| 1980-1985 | Gymnasium des Schulzentrums Lohfeld in Bad Salzuflen |
| 1985-1989 | Ev. Gymnasium in Siegen-Weidenau mit Abitur          |

## Zivildienst

|                 |   |
|-----------------|---|
| 09/1989-11/1990 | Pflegedienst im Ev. Krankenhaus Bethesda in Freudenberg |
|-----------------|---|

## Studium

|                 |  |
|-----------------|--|
| 07/1991-09/1991 | Landwirtschaftliche Vorstudienpraxis auf dem Breitwiesenhof in Ühlingen  |
| 10/1991         | Beginn des Diplomstudiengangs Agrarbiologie an der Universität Hohenheim, Stuttgart<br>(Stipendiat des Ev. Studienwerks e.V. Villigst)   |
| 07/1993         | Abschluss des Vordiploms   |
| 08/1993-08/1994 | Auslandsaufenthalt in Israel. Sprachkurs an der „Hebrew University of Jerusalem“ und Praktikum am „Institute for Applied Research“ der „Ben-Gurion-University of the Negev“ in Beer Sheva (Auslandsstipendium des Ev. Studienwerks e.V. Villigst)  |
| 10/1996-03/1998 | Praktikum und Diplomarbeit am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in der Arbeitsgruppe von Prof. Uwe Sonnewald unter Anleitung von Dr. Karin Herbers. Thema: Untersuchungen zum Einfluss des PLRV Movement Proteins auf den Kohlenhydratstoffwechsel in transgenen Tabakpflanzen. |
| 04/1998         | Abschluss des Hauptdiploms in den Fächern Pflanzenernährung, Pflanzenphysiologie, Obst- und Gemüsebau sowie Pflanzenschutz (Gesamtnote: sehr gut)  |



## **Dissertation**

seit 05/1998

wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) und Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation

10/1998-12/1998

Arbeitsaufenthalt an der „Hebrew University of Jerusalem“ in Rehovot, Israel, in der Arbeitsgruppe von Prof. Shmuel Wolf

Gatersleben, im März 2003

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass ich den Doktorgrad nicht besitze und mich auch früher nicht um den Doktorgrad beworben habe.

Gatersleben, im März 2003

Daniel Hofius