

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).

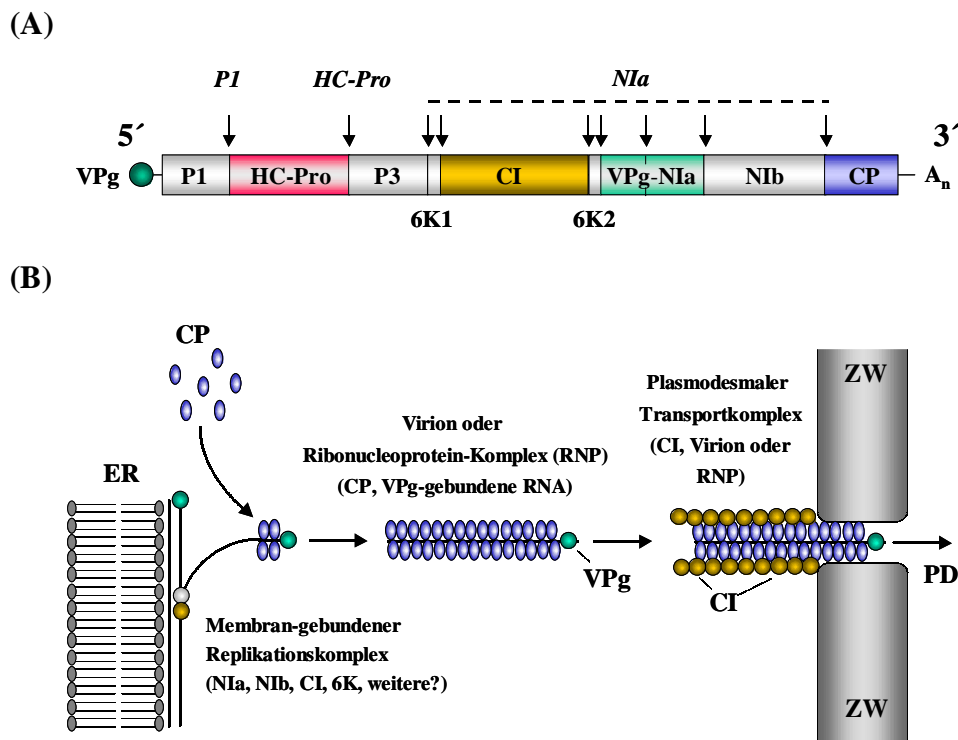


Abb. 1: Schematische Darstellung der Genomstruktur (A) nach Urcuqui-Inchima *et al.* (2001) sowie des postulierten Zell-zu-Zell-Transportes von Potyviren (B) nach Carrington *et al.* (1998).

(A) Potyviren haben ein einzelsträngiges RNA-Genom von etwa 10 kb Länge. Die RNA ist am 3'-Ende polyadenyliert (A_n) 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).

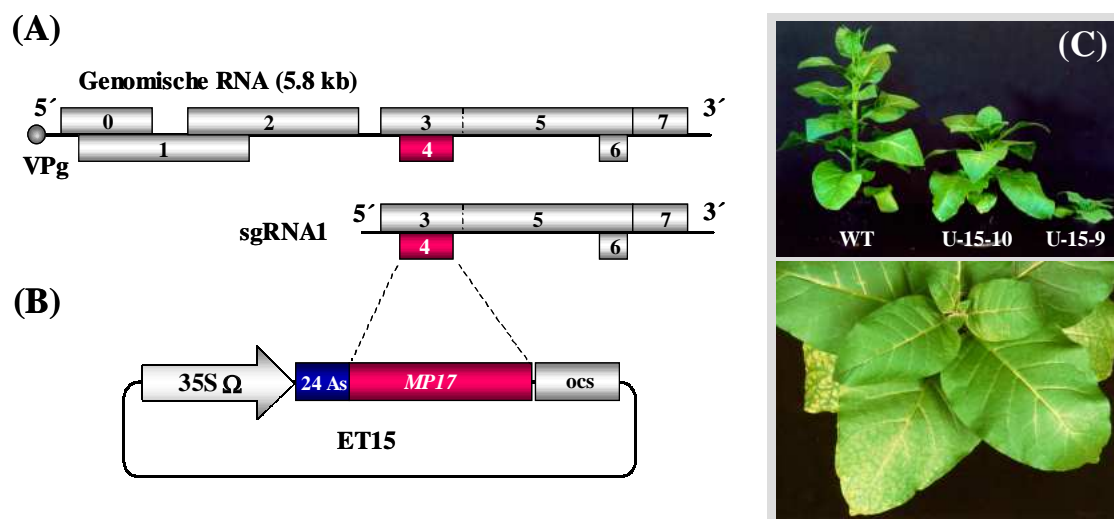


Abb. 2: (A) Schematische Darstellung der Organisation des PLRV-Genoms. Die etwa 5,8 kb große genomische Einzelstrang (+) RNA kodiert für 8 große offene Leseraster (ORFs), ist nicht polyadenyliert und wird am 5'-Ende durch ein „Genome-linked“ Protein geschützt. Die ORFs sind in zwei Blöcken organisiert, 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.

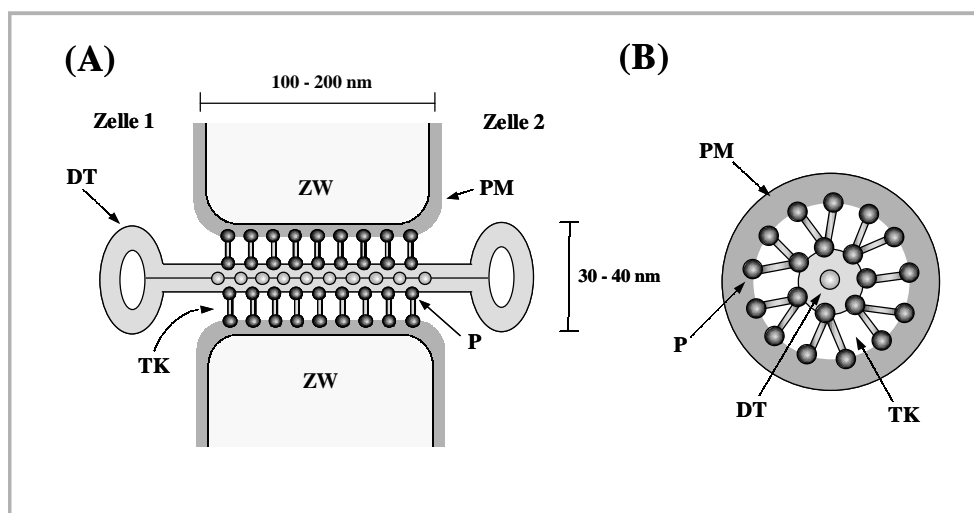


Abb. 3: Schematische Darstellung eines die Zellwand (ZW) durchspannenden PD im longitudinalen (A) und transversalen (B) Querschnitt. Der Molekültransport erfolgt durch den cytoplasmatischen Transportkanal (TK) zwischen der Plasmamembran (PM) und dem aus dem ER abgeleiteten Desmotubulus (DT). Verbunden 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 Wuchsetardierung 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.