

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 μE 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 H₂O 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^qZΔM15, Tn10 (Tet^r)^c</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987 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^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)^c</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> XLOLR	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)^c Su⁻ λ^r</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	<i>nal^S str^S rif^S thi⁻ lac⁻ ara⁺ gal⁺ mtl⁻ f recA⁺ uvr⁺ lon⁺</i>	Qiagen
<i>E. coli</i> TOP10F'	<i>F'(tet^r) mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rspL (Str^R) 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^r2 LYS2::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3 URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993

Tab. 2-2: Verwendete Vektoren.

Bezeichnung	Verwendung/Resistenz	Herkunft/Referenz
BinAR	binärer Vektor, Kan ^r	Höfgen und Willmitzer, 1990
p35S- <i>alcR</i>	binärer Vektor, <i>alc</i> -System, Kan ^r	Caddick <i>et al.</i> , 1998
pUC- <i>alcA</i>	Klonierungsvektor <i>alc</i> -System, Amp ^r	Caddick <i>et al.</i> , 1998
pUC-RNAi	Klonierungsvektor hpRNA-Konstrukt mit <i>StGA20</i> -Oxidase Intron, Amp ^r	von Chencai Chu; Peking Chen <i>et al.</i> , eingereicht
pBlueskript SK ⁻	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Amp ^r	Stratagene
pCR-Blunt	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Amp ^r	Invitrogen
pCR2.1	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Kan ^r	Invitrogen
pGEM-T	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Amp ^r	Promega
pUC18, pUC19	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Amp ^r	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pQE11	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Amp ^r	Qiagen
pAD-GAL4	GAL4 AD-Vektor, Amp ^r	Stratagene
pGBT9	GAL4 BD-Vektor, Amp ^r	Clontech
pGBKT7	GAL4 BD-Vektor, Kan ^r	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 [α - 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_[30]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 H₂O 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_[30]V[G/C/A]) und 2,5 µl DEPC-behandeltem H₂O 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 λ -ZAP II cDNA-Bank aus Tabak-Blattmaterial (Herbers *et al.*, 1995) zur Isolierung des Vollängen cDNA-Klons und putativen Isoformen von *NtCPI1* 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 cm²) von Tabak-, Kartoffel-, und *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in 2x SDS-Probenpuffer [50 mM Tris-HCl, 5%

(v/v) β -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 OD₆₀₀ 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⁻/Leu⁻/His⁻) 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⁻/Leu⁻ 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 β -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 Proteinen wurden zunächst die entsprechenden Plasmide in den Reporterstamm Y190 transformiert und die Transformanten für 3-4 Tage bei 30°C auf SD Trp⁻/Leu⁻ selektiert. Danach wurden die Zellen auf SD Trp⁻/Leu⁻/His⁻ Medium 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 cm²) 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 H₂O 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^N (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 mm² großen Mesophyllbereich vorsichtig abgezogen und das freigelegte Gewebe sofort mit H₂O 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 CO_2 -Konzentration in der Messküvette auf 400 ppm und die Temperatur auf 20°C eingestellt wurde. Für die Bestimmung von Lichtsättigungskurven des 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