

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 schient 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 Virussymptomen 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 Phloemsaftes 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 Resistenzerhöhung 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.

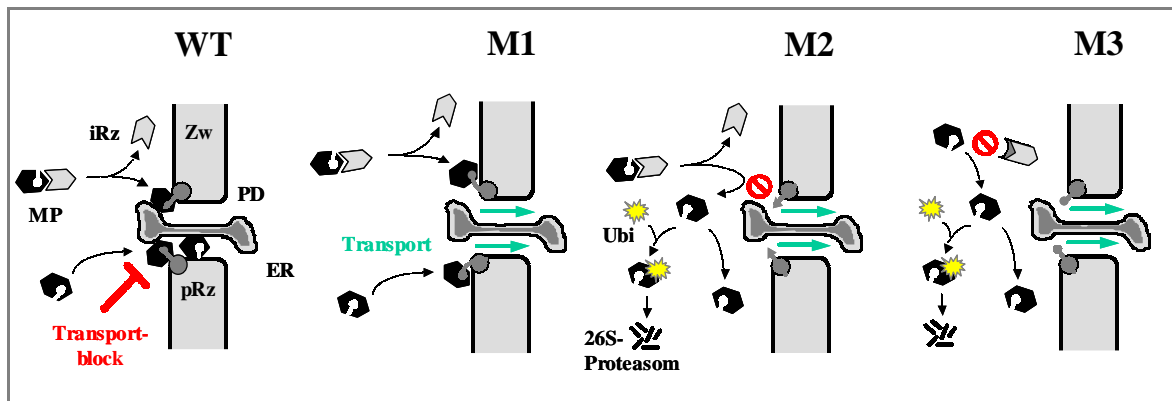


Abb. 54: Schematische Darstellung möglicher Mutationen des putativen plasmodesmalen (pRz) oder intrazellulären MP17-Rezeptors (iRz), die zur Aufhebung des Transportblockes in den Wachstums-retardierten MP17:GFP transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (WT) führen. Eine veränderte Positionierung des MP17 an 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 γ -Tocopherol als auch γ -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 α -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 α -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 CO₂-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) β -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 St*SXD1*-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).