

**Wechselwirkungen zwischen Genprodukten des  
Kartoffelblattrollvirus (PLRV) und Wirtsfaktoren der Kartoffel  
(*Solanum tuberosum*)**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
**Brigitte Katrin Paap**  
aus Preetz

Köln 2002

**Berichterstatter: Prof. Dr. U.-I. Flügge**

**Prof. Dr. F. Salamini**

**Tag der Disputation: 22. Mai 2002**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Virusinfektionen bei Kartoffelpflanzen und die Bedeutung des Kartoffel Blattrollvirus (PLRV)</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Luteoviren</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Die Struktur des PLRV</b>	<b>2</b>
<b>1.4 Das P0 Protein</b>	<b>4</b>
<b>1.5 Vermittlung von Gewebespezifität von Viren</b>	<b>5</b>
<b>1.6 Der virale Zell-zu-Zell-Transport</b>	<b>5</b>
<b>1.7 Die Eigenschaften des 17kDa Proteins</b>	<b>7</b>
<b>1.8 Untersuchungen in 17kDa-transgenen Pflanzen</b>	<b>8</b>
<b>1.9 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b>	<b>9</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>11</b>
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und „Kits“	11
2.1.2 Radioisotope	11
2.1.3 Größenstandards	11
2.1.4 Filme und Membranen	11
2.1.5 Pflanzenmaterial	11
2.1.6 Bakterien- und Hefestämme	12
2.1.7 Vektoren	13
2.1.8 Oligonukleotide und -peptide	13
2.1.9 Antikörper	13
<b>2.2 Methoden</b>	<b>15</b>
2.2.1 Anzucht und Transformation von <i>E. coli</i>	15
2.2.1.1 Anzucht von <i>E. coli</i> und Anlage von Stammkulturen	15
2.2.1.2 Herstellung und Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen	15
2.2.1.3 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien (Rubidiumchlorid-Methode)	16
2.2.2 Arbeiten mit Bäckerhefe	17
2.2.2.1 Anzucht von Hefe und Herstellung von Stammkulturen	17
2.2.2.2 Herstellung und Transformation von kompetenten Hefezellen	18
2.2.3 Protein-/Protein-Interaktionsstudien mit Hilfe des TwoHybrid-Systems	18
2.2.3.1 Herstellung einer TwoHybrid-cDNA-Plasmid-Bank	19
2.2.3.2 Sichtung einer TwoHybrid-cDNA-Plasmid-Bank	19
2.2.3.3 $\beta$ -Galaktosidase-Test	19

2.2.4	Molekularbiologische Methoden	20
2.2.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	20
2.2.4.2	Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen für PCR-Analysen	20
2.2.4.3	DNA-Agarosegelelektrophorese	21
2.2.4.4	Elution von DNA aus Agarosegelen	21
2.2.4.5	Extraktion und Präzipitation von Nukleinsäuren	21
2.2.4.6	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	21
2.2.4.7	Enzymatische Reaktionen mit der DNA	21
2.2.4.8	Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	22
2.2.4.9	Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden	23
2.2.4.10	<i>In vitro</i> Mutagenesen	23
2.2.4.10.1	Mutagenesen mit dem „Altered Sites <sup>®</sup> II <i>in vitro</i> mutagenesis system“ (Promega)	24
2.2.4.10.2	Mutagenesen über rekombinante PCR	24
2.2.4.11	Herstellung von Teillängen-Konstrukten	25
2.2.4.12	DNA-Sequenzierungen	25
2.2.5	Isolierung und Untersuchung von RNA	25
2.2.5.1	<i>In vitro</i> Transkription	25
2.2.5.2	Isolierung von RNA aus Pflanzen	26
2.2.5.3	Northern-Blot	26
2.2.6	Isolierung und Untersuchung von Proteinen	28
2.2.6.1	<i>In vitro</i> -Translation	28
2.2.6.2	Gesamtproteinextraktion aus Pflanzen	28
2.2.6.3	Herstellung von Membranproteinfraktionen	28
2.2.6.4	Herstellung von Zellwandproteinfraktionen	29
2.2.6.5	Fällung von Proteinen	29
2.2.6.5.1	Acetonfällung:	29
2.2.6.5.2	TCA-Fällung:	30
2.2.6.6	Überexpression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	30
2.2.6.7	Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.2.6.8	SDS-PAGE	31
2.2.6.9	Färbung von Proteingelen	31
2.2.6.9.1	Coomassie-Färbung	31
2.2.6.9.2	Silberfärbung	31
2.2.6.10	Western-Blot-Analysen	32
2.2.6.10.1	Transfer auf Nitrozellulose	32
2.2.6.10.2	Immundetektion	32
2.2.7	Proteinbindungsstudien	33
2.2.7.1	„Overlay Assays“	33
2.2.7.2	"Pull down Assays"	33
2.2.8	<i>In vitro</i> Phosphorylierungsstudien	34
2.2.9	Stabile Pflanzentransformation	34
2.2.9.1	Herstellung und Transformation elektrokompenter Agrobakterien	35
2.2.9.2	Transformation von <i>Solanum tuberosum</i>	35
2.2.10	Zuckerbestimmung	37
2.2.11	PLRV-Resistenztest	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Studien über das von ORF0 kodierte Protein (P0)</b>	<b>38</b>
3.1.1	Lassen sich funktionelle Domänen im P0 abgrenzen?	38

3.1.1.1	Computeranalysen vom P0 Protein und P0 Proteinkonstrukte für die Transformation von Kartoffelpflanzen	38
3.1.1.2	Herstellung und Untersuchung transgener Kartoffelpflanzen	39
3.1.2	Interaktionen zwischen P0 Protein und Wirtsproteinen	41
3.1.3	Interagieren P0 und 17kDa Protein miteinander?	42
3.1.3.1	Bindung von P0 an GST-17kDa-C Protein in „Overlay“- und „Pull down Assays“	43
3.1.3.2	Ist die Bindung von P0 an das GST-17kDa-C Protein spezifisch?	44
3.1.3.2.1	Beschreibung der Translationsprodukte und des GST-17kDa-C Proteins	44
3.1.3.3	Kontrollassays	46
<b>3.2</b>	<b>Studien über die Phosphorylierung vom 17kDa Protein</b>	<b>49</b>
3.2.1	Erzeugung von mutierten 17kDa Protein	49
3.2.1.1	Phosphorylierungsmotive im 17kDa Protein	49
3.2.1.2	Herstellung von S→A mutierten 17kDa Protein	50
3.2.1.3	Expression von GST-17kDa-C Proteinen in <i>E. coli</i>	51
3.2.2	<i>In vitro</i> Phosphorylierungsstudien	53
3.2.2.1	Phosphorylierungen von GST-17kDa-C Protein S→A-Austauschmutanten	53
3.2.2.2	Phosphorylierungen von GST-17kDa-Teillängenproteinen	55
3.2.2.3	Phosphorylierung von einem 17kDa Peptid	57
3.2.2.4	Phosphorylierung eines S <sup>71</sup> →D veränderten 17kDa Proteins	57
3.2.3	Phosphorylierungen mit verschiedenen Zellfraktionen	59
3.2.4	Charakteristika der Phosphorylierung im Serin <sup>71</sup>	61
3.2.5	Beeinflusst die Phosphorylierung des 17kDa Proteins die RNA-Bindung?	62
3.2.6	Herstellung von transgenen, 17kDa Protein exprimierenden Kartoffelpflanzen	63
3.2.7	Analyse transgener Kartoffelpflanzen	65
3.2.7.1	Zelluläre Lokalisierung des 17kDa Proteins	65
3.2.7.2	Phosphorylierungsstatus des 17kDa Proteins in transgenen Kartoffelpflanzen	67
3.2.7.3	Resistenztest	68
3.2.7.4	Zuckerbestimmungen	70
3.2.8	Interaktionen zwischen 17kDa Protein und Wirtsproteinen	71
3.2.8.1	„Overlay Assays“	72
3.2.8.2	„Pull down Assays“	73
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>Studien über das P0 Protein</b>	<b>75</b>
4.1.1	Expression von P0 Teilproteinen in transgenen Kartoffelpflanzen	75
4.1.2	Interaktion vom P0 Protein mit Wirtsproteinen	76
4.1.3	Interaktion zwischen 17kDa Protein und P0 Protein	77
<b>4.2</b>	<b>Die Phosphorylierung des 17kDa Proteins</b>	<b>78</b>
4.2.1	Phosphorylierungsmotive im 17kDa Protein	78
4.2.2	Identifizierung von <i>in vitro</i> genutzten Phosphorylierungsmotiven	78
4.2.3	Charakteristika der Phosphorylierung im Serin <sup>71</sup>	79
4.2.4	<i>In vitro</i> Phosphorylierungen des 17kDa Proteins durch verschiedene Zellfraktionen	79
4.2.5	Einfluss der Phosphorylierung im Serin <sup>71</sup> auf die RNA-Bindung	80
4.2.6	Einfluss der Phosphorylierung des Serin <sup>71</sup> auf die zelluläre Lokalisation des 17kDa Proteins	81
4.2.7	Einfluss der Phosphorylierung des Serin <sup>71</sup> auf den Zuckerhaushalt in 17kDa-transgenen Pflanzen	81
4.2.8	Einfluss der Phosphorylierung des Serin <sup>71</sup> auf Resistenzvermittlung in 17kDa-transgenen Pflanzen	81

4.2.9	Phosphorylierungsstatus des 17kDa Proteins <i>in planta</i>	82
4.2.10	Interaktion von 17kDa Proteinen mit Wirtsproteinen	83
4.2.11	Ausblick	83
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>95</b>
<b>6.1</b>	<b>Verwendete Oligonukleotide</b>	<b>95</b>
6.1.1	Oligos für PCR und Sequenzierungen	95
6.1.2	Oligos für Mutagenesen und Klonierungen von Teillängenkonstrukten	95
<b>6.2</b>	<b>Hergestellte P0 Proteinkonstrukte und transgene Pflanzenlinien, die diese Konstrukte exprimieren</b>	<b>98</b>
<b>6.3</b>	<b>Für Phosphorylierungsexperimente hergestellte 17kDa Proteinkonstrukte und ihre Phosphorylierbarkeit</b>	<b>99</b>
<b>6.4</b>	<b>PLRV-Resistenztests</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>102</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>Abstract</b>	<b>104</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μmol	Mikromol
A	Adenosin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
C	Cytosin
Ci	Curie
C-Terminus/-al	(am) Carboxyterminus einer Aminosäuresequenz
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)M,N,N',N'-Tetraacetat
fw	vorwärts gerichtet
g	Gramm
G	Guanin
GA <sub>3</sub>	Gibbellerinsäure
GUS	β-Glukoronidase
Hepes	N-2-Hydroxylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Peroxidase aus Meerrettich

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	KiloDalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Nährmedium nach Luria Bertani
m	mikro
M	molar
mA	Milliampere
MES	2-(n-Morpholino)ethansulfonsäure
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	nano
NAA	1-Naphtalen-Essigsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nmol	Nanomolar
N-Terminus/-al	(am) Aminoterminus einer Aminosäuresequenz
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglykol
Pmol	picomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rw	rückwärts gerichtet
Sarkosyl	N-Lauroylsarkosyl
SDS	Natriumdodecylphosphat
SSC	Natriumchlorid-/Natriumcitratpuffer



Std.	Stunden
T	Thymidin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transferribonukleinsäure
TTP	Thymidin-5'-Triphosphat
U	Units ( $\mu\text{Mol}/\text{min}$ )
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
w/v	Verhältnis von Gewicht zu Volumen
w/w	Gewichtsverhältnis
x g	Erdbeschleunigung

Die Aminosäureabkürzungen sind mit dem international gebräuchlichen Einbuchstabensymbolen abgekürzt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Virusinfektionen bei Kartoffelpflanzen und die Bedeutung des Kartoffel Blattrollvirus (PLRV)

Zu den bedeutendsten Viren, die Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*) befallen, gehören die Potyviren (z.B. Potyvirus X) und das Kartoffelblattrollvirus (potato leafroll virus, PLRV) (Rich, 1983). Virusinfektionen können großen Schaden anrichten, da sie sich sowohl systemisch in der infizierten Pflanze als auch durch deren Insektenvektoren innerhalb einer Population sehr schnell ausbreiten können. Die vegetative Vermehrung der Kartoffeln über deren Knollen ermöglicht die Persistenz der Viren. Außerdem machen sich Primärinfektionen oft nicht bemerkbar, so dass es in den Folgegenerationen zu schweren Sekundärinfektionen kommt, die zu hohen Ertragseinbußen führen. In Falle einer Infektion mit dem PLRV können sich Ertragseinbußen von bis zu 87% ergeben (Spaar, 1985).

Die Bekämpfung des Virus erfolgt hauptsächlich über den prophylaktischen Einsatz unspezifischer Insektizide gegen die Insekten, welche die Viren übertragen.

Gegen einige Kartoffelviren, z.B. dem Potyvirus X und Potyvirus Y, sind natürliche Resistenzen beschrieben worden (Barker und Waterhouse, 1999). Nur wenige natürliche Resistenzen sind jedoch gegen PLRV bekannt, deren Mechanismen zudem bislang nicht aufgeklärt werden konnten (Smith und Barker, 1999). Durch stabile Transformation viraler Genen (z.B. des PLRV Hüllproteins oder des modifizierten Transportproteins in die Wirtspflanzen) gelang es erhöhte Toleranzen gegen Virusinfektionen, verminderte Ausbreitung der Viren in den Pflanzen oder verminderte Sekundärinfektionen in den Folgegenerationen zu erzielt werden (Kawchuk *et al.*, 1990 und 1991; van der Wilk *et al.*, 1991, Barker *et al.*, 1992, Tacke *et al.*, 1993b). Die Integration des PLRV Hüllprotein-Gens ins Kartoffelgenom führte unabhängig von der Bildung des Proteins zu Resistenz gegen eine Sekundärinfektion (Barker *et al.*, 1992). Auch erzeugte das Einführen von „Antisense“-Konstrukten ins Pflanzengenom Resistenzen (Kawchuk *et al.*, 1991, van der Wilk *et al.*, 1991). Daraus wurde geschlossen, dass eher die Produktion von PLRV-RNA als die des Hüllproteins die Resistenz auslöst.

Bessere Kenntnisse über die Mechanismen der Virusvermehrung, seiner Verbreitung in der Pflanze sowie Erkenntnisse über die Wirtserkennung und Entwicklung der Krankheitssymptome bei infizierten Pflanzen könnten dazu beitragen, mit Hilfe von biotechnologische Methoden virusresistente Kartoffelpflanzen zu erzeugen.

## 1.2 Die Luteoviren

Das Kartoffel-Blattrollvirus (Potato leafroll virus, PLRV) gehört zur Familie der Luteoviren. Der Name stammt vom lateinischen *luteus* (gelb), weil die Infektion zu einer Vergilbung bei den erkrankten Pflanzen führt. Zusätzlich kann es zur Rotfärbung und zum Einrollen der Blätter kommen wie im Falle der vom PLRV-induzierten Blattrollkrankheit. Die gesamte Pflanze ist bei einer PLRV-Infektion im Vergleich zur gesunden Pflanze gestaucht. Außerdem haben PLRV infizierte Pflanzen weniger und kleinere Knollen und entwickeln Phloem-Nekrosen (Rich, 1983).

Luteoviren werden hauptsächlich von Blattläusen übertragen. So ist beim PLRV die „Grüne Pfirsichblattlaus“ (*Myzus persicae*) für die Übertragung der Viruspartikel auf die Pflanze, hauptsächlich *Solanaceae* (und hier vor allem Kartoffelpflanzen), verantwortlich (Jolly *et al.*, 1994). Die Ausbreitung der Luteoviren in der Wirtspflanze ist auf das Phloem beschränkt (Waterhouse *et al.*, 1988). Hierbei werden lediglich die Geleitzellen und die umliegenden Phloemparenchymzellen vom Virus befallen, was die Untersuchung der PLRV-Infektion erschwert.

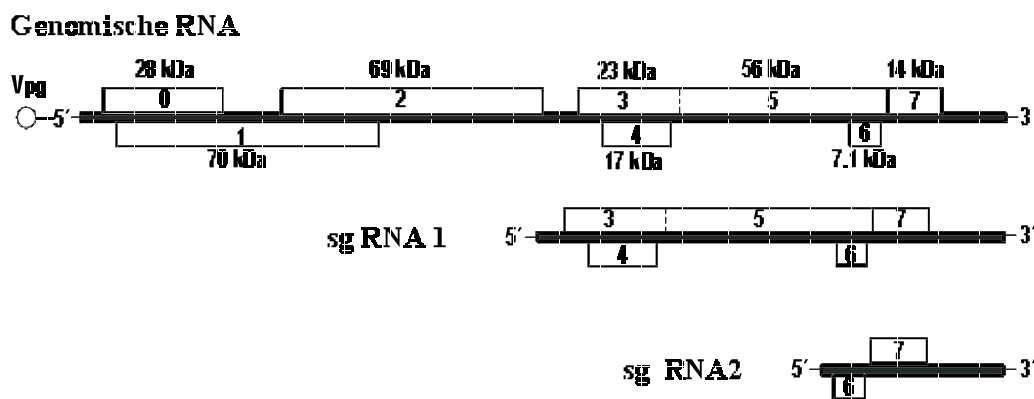
Die Familie der Luteoviren wird in die Untergruppen Luteoviren, Poleroviren und Enamoviren unterteilt (D'Arcy *et al.*, 1997). Das PLRV gehört zu den Poleroviren, für die es auch namensgebend war. Vertreter der Poleroviren sind neben dem PLRV unter anderem auch das Beet western yellows virus (BWYV) und das Cucurbite aphide-borne yellows virus (CABYV). Luteoviren im engeren Sinn und Poleroviren unterscheiden sich in der Anordnung der offenen Leseraster (ORF) 1 und 2 (Mayo und Ziegler-Graff, 1996). Im Gegensatz zu den Luteoviren wird das 5'-Ende der genomischen RNA von Poleroviren durch ein kleines Protein, das sogenannte „Viral Protein genome-linked“ (VPg), geschützt (Mayo *et al.*, 1982). Außerdem besitzen die Poleroviren den offenen Leserahmen ORF0, der das P0 Protein kodiert. Dieser Leserahmen fehlt bei den Luteoviren.

## 1.3 Die Struktur des PLRV

Die ikosahedrischen Viruspartikel des PLRV mit einem Durchmesser von ca. 23 nm enthalten eine ca. 5,8 kb große genomische Einzelstrang-RNA in +-Orientierung ((+)-ss-gRNA), die nicht polyadenyliert ist und am 5' Ende von einem so genannten „Viral Protein genome-linked“ (VPg) geschützt wird (Mayo *et al.* 1982). Abbildung 1 zeigt die Organisation des PLRV-Genoms, welches für acht große offene Leseraster kodiert. Die ORFs sind in zwei Blöcken arrangiert. Der erste Genblock, bestehend aus ORF0, ORF1 und ORF2, wird direkt von der genomischen RNA (gRNA) translatiert.

ORF0 kodiert für das 28 kDa große P0 Protein, über das hier noch ausführlicher berichtet werden soll.

Außerdem werden von diesem Genblock die für die Replikation notwendigen Proteine translatiert. ORF1 kodiert die virale Helikase. Das 70 kDa große P1 Protein das vom ORF1 kodiert wird, dient außerdem als Vorläuferprotein für die Bildung des VPg und seines proteolytischen Spaltproduktes P1-C25 (Mayo, *et al.*, 1982; van der Wilk, *et al.*, 1997b; Prüfer *et al.*, 1999). Die Replikase ist das Fusionsprotein das durch einen -1-Leserasterwechsel vom das ORF1/2-Transleseraster translatiert wird (Prüfer *et al.*, 1992).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der genomischen RNA und subgenomischen RNAs (sg RNA 1 und 2) des PLRV**

Die Expression der offenen Leseraster ORF3, ORF4 und ORF5 erfolgt von einer 2,3 kb subgenomischen RNA1 (sgRNA1), deren Transkriptionsstart innerhalb der intercistronischem Region der gRNA liegt (Tacke *et al.*, 1990).

ORF3 kodiert für das 23 kDa großen Hüllprotein, aus dem die Hülle der Viruspartikel aufgebaut ist (Miller und Mayo, 1991; Tacke *et al.*, 1993). Die PLRV-Partikel sind an der Blattlausvermittelten Transmission des Virus beteiligt (Syller *et al.*, 1997). Das Hüllprotein wird außerdem wahrscheinlich für den Langstreckentransport des Virus benötigt.

ORF4 kodiert für das 17 kDa Protein. Dieses Protein fungiert als Transportprotein für die Verbreitung der genomischen RNA von Zelle zu Zelle (Kurzstreckentransport). Hierauf soll später noch ausführlicher eingegangen werden.

ORF5 besitzt kein eigenes Initiationskodon. Durch Unterdrückung des ORF3 UAG-Stoppkodons wird in geringen Mengen ein ORF3/5-Durchleseprotein (engl. readthrough protein) gebildet, welches eine strukturelle Komponente des Viruspartikels ist (Bahner *et al.*, 1995; Tacke *et al.*, 1990). Das ORF3/5-Durchleseprotein ist in der Transmission des Virus

involviert und sorgt für die Stabilität der Viruspartikel in der Blattlaus (Hogenhout *et al.*, 2000).

Eine subgenomische RNA2 (sgRNA 2) kodiert für die Leseraster ORF6 und ORF7 (Ashoub *et al.*, 1998). Die Funktion deren Genprodukte ist bislang nicht bekannt. Für das ORF7-Genprodukt konnten RNA-bindende Eigenschaften nachgewiesen werden (Ashoub *et al.*, 1998; Ashoub, 1999).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen Untersuchungen an den durch ORF0 und ORF4 kodierten Proteine.

## **1.4 Das P0 Protein**

Die P0 Proteine weisen untereinander eine hohe Diversität auf. Auch lassen sich in den Datenbanken keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen aufspüren. Der N-Terminus des P0 Proteins ist hydrophob und weist im Falle des PLRV-P0 Proteins Charakteristika für Assoziierung mit Zellmembranen auf (Mayo *et al.*, 1989). Über die Funktion des P0 Proteins ist nur sehr wenig bekannt. Weder bei der Bildung des Viruspartikels noch bei der Replikation des Virus spielt das P0 Protein vom BWYV eine Rolle (Veidt *et al.*, 1992, Reutenauer *et al.*, 1993).

Wird das P0 Protein vom PLRV in transgenen Kartoffelpflanzen exprimiert, so entwickeln diese Pflanzen einen Phänotyp, der den Symptomen bei einer PLRV-Infektion entspricht (Mayo *et al.*, 1997). Wurden die P0 Proteine der Poleroviren PLRV, BWYV und CABYV in transgenen Kartoffelpflanzen exprimiert, so zeigten nur die mit dem PLRV-P0 Protein transformierten Pflanzen diesen „Krankheitsphänotyp“, während die transgenen Pflanzen, welche die P0 Proteine der anderen Viren exprimierten keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp ausprägten. Wurden die cDNAs, die für die P0 Proteine derselben Viren kodieren, in *Nicotiana benthamiana* transformiert, so kam es in diesen transgenen Pflanzen zu keinem Phänotyp, der vom Wildtyp abwich (Prüfer, unveröffentlicht). Das P0 Protein spielt vermutlich eine Rolle in der Vermittlung von Wirtsspezifität der Viren. Die genaue Funktion vom P0 Protein blieb bislang jedoch ungeklärt. Pflanzliche oder virale Interaktionspartner konnten bislang nicht identifiziert werden, die einen Aufschluss auf die genauere Funktion des P0 Proteins geben könnten. Auch konnten bislang keine funktionellen Domänen innerhalb des P0 Proteins abgegrenzt werden. Es sollten deshalb verschiedene N-terminal und C-terminal Deletionsmutanten vom P0 Protein in Kartoffelpflanzen exprimiert werden. Dies könnte Aufschluss, darauf geben, ob und welche Bereiche innerhalb von P0 Protein

notwendig sind, diesen Krankheitsphänotyp in den transgenen Pflanzen zu induzieren, bzw. ob hierzu doch das gesamte Protein notwendig ist.

## **1.5 Vermittlung von Gewebespezifität von Viren**

Wie oben erwähnt, ist PLRV spezifisch im Phloem der Wirtspflanzen lokalisiert (Waterhouse *et al.*, 1989). Die Begrenzung auf dieses Gewebe kann dadurch begründet sein, dass der Zell-zu-Zell-Transport aufgrund von Interaktionen von plasmodesmalen Rezeptoren mit den viralen Transportproteinen nur an Plasmodesmata bestimmter Zelltypen stattfinden kann. Möglicherweise bestimmt das Transportprotein durch Wechselwirkung mit plasmodesmalen Proteinen, welche Gewebe oder welche Pflanze von den Viren befallen werden können. Hierfür spricht die spezifische Lokalisation von Transportproteinen an bestimmten Plasmodesmata, z.B. des 17kDa Proteins vom PLRV an den Plasmodesmata zwischen Geleitzellen und Siebröhren (Schmitz *et al.*, 1997) und virusresistenten, transgenen Pflanzen, deren Resistenz in Abhängigkeit von der Bildung von dysfunktionalen Transportprotein erfolgt (Tacke *et al.*, 1996). Beschränkung des PLRV auf das Phloem kann durch die gleichzeitige Infektion der Pflanzen mit PLRV und dem Umbravirus „Pea enamovirus“ aufgehoben werden. Hierfür wird die Umgehung des „posttranscriptional genesilencing“ (PTGS) durch ein Umbravirusprotein verantwortlich gemacht, das die PLRV Proteine außerhalb des Phloems nicht hemmen können (Ryabov *et al.*, 2001). Das PTGS stellt einen Mechanismus der Pflanze dar, Virusinfektionen entgegenzuwirken, indem die Expression wirtsfremder RNA inhibiert wird (Radcliff *et al.*, 1997; Voinnet *et al.*, 1999). Dabei werden doppelsträngige RNAs erkannt und zu 25-30 nt großen Stücken prozessiert. Diese sind in der Lage, den Abbau der korrespondierenden RNA zu bewirken (Chandler und Vaucheret, 2001; Hamilton und Baulcombe, 1999; Anandalakshmi *et al.*, 2000). Bei Viren sind Proteine identifiziert worden, welche das PTGS inhibieren, so dass sich die Viren in den Pflanzen verbreiten und vermehren können (Li *et al.*, 1999; Llave *et al.*, 2000; Anandalakshimi *et al.*, 1998; Anandalakshimi *et al.*, 2000).

## **1.6 Der virale Zell-zu-Zell-Transport**

Die Verbreitung des Virus in der Pflanze erfolgt generell auf zwei Wegen. In einen Langstreckentransport verbreitet sich das Virus über die Siebelemente, dem Assimilatstrom folgend in der ganzen Pflanze (Leisner und Howell, 1993). Der Kurzstreckentransport von Zelle zu Zelle ist ein aktiver Transport via Plasmodesmata. Die Plasmodesmata sind symplastische Verbindungen zwischen den Zellen, über die der kontrollierte Transport von

Metaboliten, Ionen, Hormonen, Proteinen und Protein-Ribonukleinsäurekomplexen stattfindet (Lucas, 1998, Lazarowitz und Beachy, 1999; Kragler *et al.*, 2000). Den Plasmodesmata zwischen Geleitzellen und Siebelementen kommt hierbei eine Schlüsselfunktion bei der kontrollierten Beladung und Entladung der Siebelemente und somit beim Transport von Makromolekülen im Phloem zu (van Bell, 1993; Oparka und Turgeon, 1999; Lucas, 1999). In der Regel haben die Plasmodesmata ein bestimmtes Ausschlussvolumen von ca. 1 kDa, so dass kleinere Moleküle die Plasmodesmata durch Diffusion passieren können (Terry und Robards, 1987; Ding *et al.*, 1992). Größere Moleküle oder Molekülkomplexe wie z.B. Protein-/Ribonukleinsäurekomplexen sind durch Interaktion mit plasmodesmalen Rezeptoren in der Lage, die Plasmodesmata zu weiten, um hindurch zu gelangen (Lucas und Gilbertson, 1994; Ding *et al.*, 1995; Waigman *et al.*, 1994 und 2000). Viren nutzen bei ihrem Zell-zu-Zell-Transport die pflanzlichen Transportmechanismen, mit denen RNA, Proteine und Protein-Ribonukleinsäurekomplexe in der Pflanze verbreitet werden. So konnte z.B. ein Pflanzenprotein mit Homologie zu viralen Transportproteinen isoliert werden, welches in der Lage ist, seine eigene RNA von den Geleitzellen in die Siebelemente zu transportieren (Xoconostle-Cázares *et al.*, 1994; Kragler *et al.*, 2000). Auch der Transkriptionsfaktor Knotted 1 wird über die Plasmodesmata von Zelle zu Zelle transportiert (Kragler *et al.*, 1998; Kragler *et al.*, 2000). Von den Geleitzellen werden z.B. P-Proteine und die RNA von dem Saccharosetransporter SUT 1 transportiert (Clark *et al.*, 1997; Kuhn *et al.*, 1997).

Für den Zell-zu-Zell-Transport von Viren sind drei grundsätzliche Strategien beschrieben worden. Bei Tospovirus, Comovirus, Caulimovirus und Nepovirus bilden virale Proteine Tubulstrukturen durch die Plasmodesmata, durch die dann das Virus in Form von Viruspartikeln hindurchgeschleust wird. Geminiviren besitzen zwei Transportproteine, eines, das den intrazellulären Transport der viralen DNA bewerkstelligt, und ein anderes, das die virale DNA über die Plasmodesmata von Zelle zu Zelle transportiert (Lazarowitz und Beachy, 1999; Morra und Petty, 2000). Als Modell für den interzellulären Transport von RNA in Form von Protein-Ribonukleinsäurekomplexen dient der interzelluläre Transport des TMV. Von den Orten der viralen Replikation und viralen Proteinbiosynthese wird die virale RNA entlang von Mikrotubulstrukturen in Form von Protein-RNA-Partikeln zu den Plasmodesmata geleitet. Der Transport ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus des Transportprotein vom TMV und der Interaktion mit einer Pektinmethylesterase. Durch Interaktion mit einem möglichem plasmodesmalen Rezeptor ist das Transportprotein des TMV abhängig vom Phosphorylierungsstatus des Proteins in der Lage, die Plasmodesmata zu weiten, so dass dann die Protein-RNA-Partikel hindurchwandern und so die nächste Zelle infizieren können

(Lazarowitz und Beachy, 1999; Citovsky, 1999). Interaktionen des Transportproteins vom PLRV mit pflanzlichen Faktoren, die die Stationen im Zell-zu-Zell-Transport des PLRV sind bislang nicht beschrieben worden.

## 1.7 Die Eigenschaften des 17kDa Proteins

Das 17kDa Protein lässt sich aufgrund der Ladungsverteilung innerhalb des Proteins in zwei Bereiche unterteilen: einen sauren N-terminalen und einen basischen C-terminalen Abschnitt. Über eine amphipatische  $\alpha$ -Helix im N-terminalen Bereich des Proteins kann eine Dimerisierung des 17kDa Proteins erfolgen. Sowohl in PLRV-infizierten und in 17kDa Protein exprimierenden, transgenen Kartoffelpflanzen konnte das 17kDa Protein als Dimer nachgewiesen werden (Tacke *et al.*, 1993). Der C-terminalen Bereich des 17kDa Proteins bindet in unspezifischer Weise einzelsträngige Nukleinsäuren (Tacke *et al.*, 1991).

In PLRV-infizierten und in 17kDa Protein exprimierenden, transgenen Kartoffelpflanzen konnte das 17kDa Protein in Membranfraktionen nachgewiesen werden (Tacke *et al.*, 1993). Durch Immunogold-Detektionen in Gewebeschnitten von PLRV-infizierten und 17kDa-transgenen Kartoffelblättern konnte gezeigt werden, dass das 17kDa Protein an Membranstrukturen lokalisiert ist. Insbesondere zeigte sich eine verstärkte Konzentration vom 17kDa Protein an den verzweigten Plasmodesmata zwischen den Geleitzellen und den Siebröhren (Schmitz *et al.*, 1997). Alle diese Eigenschaften weisen das 17kDa Protein als das virale Transportprotein aus, welches für die Verbreitung des Virus von Zell zu Zelle verantwortlich ist.

Tacke *et al.*, 1993 zeigten, dass das 17kDa Protein *in planta* überwiegend als Phosphoprotein vorliegt. *In vitro*-Phosphorylierungsexperimente (Sokolova *et al.* 1997) ergaben, dass das 17kDa Protein im C-terminalen Teil von einer Serin-/Threonin-Kinase mit Charakteristika einer Proteinkinase des Typ C (PKC) phosphoryliert wird, die in Membranpräparationen aus Kartoffelblättern enthalten ist. Die Phosphorylierung ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, erfolgt phospholipidabhängig und kann durch EGTA und einen spezifischen PKC-Inhibitor gehemmt werden. Inhibitoren anderer Serin-/Threonin-Kinasen hemmen die Phosphorylierung nicht. Darüber hinaus ließ sich das 17kDa Protein auch von einer aus Rattenhirn isolierten PKC phosphorylieren (Sokolova *et al.*, 1997). Welche Serin- oder Threoninreste im 17kDa Protein phosphoryliert werden, ist bislang nicht bekannt.

Phosphorylierungen von viralen Transportproteinen *in vivo* und *in vitro* sind in der Literatur hinlänglich bekannt, z.B. für das Transportprotein vom Tomato-Mosaikvirus (Kawakami *et al.*, 1999; Matsushita *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung an einem Serin ist essentiell für die



Assoziation dieses Transportproteins an Membranstrukturen und die Stabilität des Protein *in vivo* (Kawakami *et al.*, 1999). Am besten untersucht ist aber die Phosphorylierung vom Transportproteins MP30 des Tabak-Mosaikvirus (TMV) (Citovsky *et al.*, 1993; Haley *et al.*, 1995; Waigman *et al.* 2000). Die Kinase, welche die C-terminal gelegenen Serinreste und den Threoninrest phosphoryliert, ist mit den Zellwänden assoziiert (Citovsky *et al.*, 1993). Zusätzlich konnte das TMV-MP30 in Protoplasten an anderen Serinresten phosphoryliert werden. Es wird vermutet, dass das Protein in unterschiedlichen Domänen durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert wird (Haley *et al.*, 1995). Über die Funktion, die der Phosphorylierungsstatus im TMV-MP30 erfüllt, gibt es folgende Berichte: Es konnte kein Einfluss auf die Bindungseigenschaften von einzelsträngigen Nukleinsäuren festgestellt werden (Citovsky *et al.*, 1993; Waigman *et al.* 2000). Einen wichtigen positiven regulatorischen Einfluss hat der Phosphorylierungsstatus vom TM-MP30 auf die Fähigkeit des Proteins die Plasmodesmata zu weiten und so den Zell-zu-Zell-Transport des Virus zu ermöglichen (Waigman *et al.*, 2000). Durch Ausbildung eines Protein-RNA-Komplexes zwischen Transportprotein und viraler RNA wirkt das Transportprotein als unspezifischer Repressor der Translation (Karpova *et al.*, 1997). Phosphorylierung hebt die Repression der Translation auf und macht die RNA im Komplex für RNAsen von außen angreifbar (Karpova *et al.*, 1999). Ein Einfluss auf die Spezifität der RNA-Bindung durch die Phosphorylierung des C-terminalen Proteinteiles wurde von Haley *et al.* (1995) diskutiert.

Es ist bislang nicht bekannt, ob beim 17kDa Protein des PLRV eine einfache Phosphorylierung oder eine Multiphosphorylierung des Proteins vorliegt, noch wie viele Kinasen in verschiedenen Zellkompartimenten hieran beteiligt sein könnten. Auch ist nicht bekannt, welchen Einfluss der Phosphorylierungsstatus des Proteins auf seine Funktion hat.

## **1.8 Untersuchungen in 17kDa-transgenen Pflanzen**

Tacke *et al.* zeigten 1996, dass die Expression eines N-terminal verlängerten 17kDa Proteins in transgenen Kartoffeln zu einer Resistenz nicht nur gegen PLRV-Infektionen, sondern auch gegen einige andere Viren führt. Man nahm an, dass die N-terminale Extension des 17kDa Protein die Dimerisierung verhindert. Durch Konkurrenz des dysfunktionalen Proteins mit dem von der durch die PLRV-Infektion eingebrachten 17kDa Protein wird die Verbreitung des Virus unterbunden. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei der Expression von dysfunktionalem Transportprotein (TMV-MP30) des Tabakmosaikvirus in transgenen Tabakpflanzen gemacht werden. Auch hier kam es zu einer Breitbandresistenz gegen zahlreiche Viren (Cooper *et al.*, 1995, Lapidot *et al.*, 1993). TMV-MP30 exprimierende

Tabakpflanzen wiesen außerdem eine höhere Ausschlussgrenze der Plasmodesmata auf (Wolf *et al.*, 1989). In den TMV-MP30 exprimierende Tabakpflanzen war der Gehalt an Glukose, Fruktose und Stärke in den „Source“-Blättern im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Lucas *et al.* 1993; Lucas *et al.*, 1996; Olesinski *et al.*, 1996). Die Expression von N-terminal verlängertem 17kDa Protein in Tabakpflanzen führte zu einem erheblich gestauchten Phänotyp mit teilweise nekrotischen unteren Blättern. Dieser Phänotyp ging einher mit einer Akkumulation von löslichen Zuckern sowie von Stärke in den „Source“-Blättern. Der Abtransport von Zucker aus den Blättern war gestört, wobei der Phosphorylierungsstatus des 17kDa Proteins möglicherweise eine Rolle spielen könnte (Herbers *et al.*, 1997).

## **1.9 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen die Untersuchungen von den viralen Proteinen P0 Protein und 17kDa Protein in Kartoffel.

Bislang ist unklar, ob bestimmte Domänen des P0 Proteins oder das gesamte Protein für die wirtsspezifische Ausbildung von Krankheitssymptomen in P0-transgenen Kartoffelpflanzen nötig sind. Hierfür sollen transgene Kartoffelpflanzen hergestellt werden, welche verschiedene Teillängenkonstrukte vom P0 Protein exprimieren.

Bislang sind keine Proteine bekannt, welche mit dem P0 Protein in Wechselwirkung treten. Solche Wechselwirkungen könnten Aufschluss auf die Funktion des P0 Proteins geben. Daher soll untersucht werden, ob es Wechselwirkungen zwischen P0 Protein und Wirtsproteinen gibt.

Bei der Vermittlung von Wirts- und Gewebespezifität durch das P0 Protein könnte eine Beteiligung des P0 Protein beim Zell-zu-Zell-Transport möglich sein. Hierfür könnte es eine Wechselwirkung mit dem PLRV-Transportprotein 17kDa geben. Dies soll in dieser Arbeit überprüft werden.

Es ist bislang nicht bekannt, ob beim 17kDa Protein vom PLRV eine einfache Phosphorylierung oder eine Multiphosphorylierung des Proteins vorliegt. Mit Hilfe von *in vitro* Phosphorylierungsexperimente an mutanten 17kDa Proteinen sollen die von der membranassoziierten Proteinkinase genutzten Phosphorylierungsmotive identifiziert werden.

Außerdem soll untersucht werden, ob das 17kDa Protein von (einer) Kinase(-n) verschiedener Zellkompartimente phosphoryliert wird.

Der Phosphorylierungsstatus des Proteins könnte einen Einfluss auf seine RNA-Bindungseigenschaften haben. Dies soll hier untersucht werden.

Um das Phosphorylierungsmuster vom 17kDa Protein *in planta* zu untersuchen, sollen transgene Kartoffelpflanzen erzeugt werden, die das native 17kDa Protein und ein

phosphorylierungsdefizientes 17 kDa Protein exprimieren. Darüber hinaus soll festgestellt werden, ob die Änderung im Phosphorylierungsmuster vom 17kDa Protein, Auswirkungen auf die Lokalisation des Proteins, den Zuckerhaushalt hat oder die Toleranz bzw. Sensitivität der Pflanzen gegenüber einer PLRV-Infektion beeinflusst.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und „Kits“

Alle Chemikalien wurden von namhaften Herstellern und Firmen bezogen, wie Bio-Rad (München), Difco (Detroit, USA), Sigma (München), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Uppsala, Schweden), Biomol (Hamburg), Duchefa (Haarlem, Niederlande).

Restriktionsenzyme, RNA- und DNA-Polymerasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische „Kits“ stammten von den Firmen Amersham Pharmacia (Braunschweig), Biozym (Hessisch Oldendorf), Roche (Mannheim), Qiagen (Hilden), Gibco BRL (Eggenstein), MBI-Fermentas (Walldorf), Promega (Heidelberg) und Stratagene (Heidelberg).

#### 2.1.2 Radioisotope

Für die radioaktive Markierung von Nukleinsäuren wurde [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP verwendet. Die Markierung von *in vitro* erzeugten Proteinen erfolgte über den Einbau vom  $^{35}$ S-Methionin. Proteinphosphorylierungsexperimente wurden mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP durchgeführt. Alle Radioisotope wurden von der Firma Amersham Pharmacia (Braunschweig) bezogen.

#### 2.1.3 Größenstandards

Als DNA-Größenstandard in der Agarosegel-Elektrophorese wurde die 1kb DNA-Leiter verwendet und als Proteinmarker diente der vorgefärbte Proteinmolekulargewichts-Standard - beides von Gibco BRL (Eggenstein).

#### 2.1.4 Filme und Membranen

Hybond N<sup>+</sup> Membranen für den Transfer von Nukleinsäuren und Röntgenfilme wurden von Amersham Pharmacia (Braunschweig) bezogen. PVDF- und Nitrozellulosemembranen stammten von der Firma Schleicher & Schüll (Dassel). Filterpapiere wurden von Roth (Karlsruhe) bezogen.

#### 2.1.5 Pflanzenmaterial

*Solanum tuberosum* cv. Désirée

*Solanum tuberosum* cv. Linda (PLRV-infiziert)

*Nicotiana benthamiana* L.

## 2.1.6 Bakterien- und Hefestämme

### *E. coli*-Stämme:

Bakterienstamm	Genotyp	Verwendung	Quelle
BL21 (DE)	F' hsdS gal (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> )	Proteinexpression	Studier <i>et al.</i> , 1990
BL21 Codon Plus (DE3) RP	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> gal endA Hte [argU proL Cam <sup>r</sup> ]	Proteinexpression	Stratagene
DH5α	supE44 ΔlacU169 (Φ80, lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Plasmidamplifizierung	Gibco-BRL
DH10b	F' mcrA Δ(mvr-has RMA-mcrBC9 Φ 80dlacZ ΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 eraD139 yD(ara,leu) 7697galU galKλ <sup>-</sup> rpsL nupG	Plasmidamplifizierung	Gibco-BRL
ES 1301 <i>mutS</i>	lacZ53 mutS201::Tn5 thyA36 rha-5 metB1 deoC IN (rrnD-rrnE)	Mutagenesen	Promega
JM109	endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) relA1 supE44 λ (lac-proAB) (F traD36) proAB lacI <sup>q</sup> ZM15	Plasmidamplifizierung, Mutagenesen	Hanahan, 1985

**Tabelle 1: Liste der verwendeten *E. coli*-Stämme**

### Agrobakterien:

*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4044 (pAL 4404), Genotyp u.a.: Sm<sup>r</sup> (Rif<sup>r</sup>), Verwendung: Pflanzentransformation, von: Hoekema *et al.*(1983)

### Bakteriophage:

Helferphage R408 (Promega)

### Hefe:

*Saccharomyces cerevisiae* YRG-2: Genotyp: Mata<sup>α</sup> ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 gal4-542 gal80-538 LYS2::AUS (Gal1)-TATA (Gal1)-HIS3 URA3::UAS(GAL4 17mer(x3)-TATA (CYC1)-lacZ; Verwendung: TwoHybrid System (Stratagene)

## 2.1.7 Vektoren

Vektor	Verwendung	vermittelte Resistenz	Quelle
pAlter -1	Mutagenese	Terazyclin/Ampicillin	Promega
pAD-Gal4	TwoHybrid System	Amicillin in <i>E. coli</i> , Leucin-Autotrophie in <i>S. cerevisiae</i>	Stratagene
pBD-Gal4 Cam	TwoHybrid System	Chloramphenicol in <i>E. coli</i> , Tryptophan-Autotrophie <i>S. cerevisiae</i>	Stratagene
pBIN 19	Pflanzentransformation	Kanamycin	Bevan (1984)
pRT101	Pflanzentransformation	Ampicillin	Töpfer <i>et al.</i> (1987)
pSP73 und 65	cDNA-Klonierung, <i>in vitro</i> Transkription	Ampicillin	Promega
pGem-T-easy	Klonierung von PCR-Produkten	Ampicillin	Promega
pBluescript II SK+/-	cDNA-Klonierung/ <i>in vitro</i> Transkription	Ampicillin	Stratagene
pGEX 5X -1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	Ampicillin	Promega
pBD-17kDa-C	„Ausgangskonstrukt“ für diese Arbeit für ORF4	Chloramphenicol in <i>E. coli</i>	A. Mensen, unveröffentlicht
pBD-17kDa	„Ausgangskonstrukt“ für diese Arbeit für ORF4	Chloramphenicol in <i>E. coli</i>	A. Mensen, unveröffentlicht
pBD-ORF0	„Ausgangskonstrukt“ für diese Arbeit für ORF0	Chloramphenicol in <i>E. coli</i>	D.Prüfer, unveröffentlicht
pSP64-ORF1	Für <i>in vitro</i> Transkription und Translation von ORF1	Ampicillin	M. Kierdorf (1999)

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Plasmide**

## 2.1.8 Oligonukleotide und -peptide

Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und von Metabion (Martinsried) synthetisiert. Das 17kDa-S<sup>71</sup>-Peptid wurde von der Firma BioGenes (Berlin) hergestellt.

## 2.1.9 Antikörper

### 1. Antikörper:

#### **anti-17kDa-Antikörper:**

polyklonale anti-PLRV-17kDa-Antikörper aus Kaninchen (Bio Genes, Berlin)

optimale Arbeitskonzentration Western-Blots: 1: 10000

**anti-Phosphoserin-Antikörper:**

monoklonaler Anti-Phosphoserin-Antikörper Klon PSR aus Maus (Sigma, Deisenhofen),  
optimale Konzentration für Western-Blots: 1:500

**2. Antikörper:**

anti-Kaninchen-Antikörper-HRP-Konjugat (Bio-Rad, München)

anti-Maus-Antikörper-HRP-Konjugat (Bio-Rad, München)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anzucht und Transformation von *E. coli*

#### 2.2.1.1 Anzucht von *E. coli* und Anlage von Stammkulturen

Für die Anzucht von *E. coli* Bakterien wurden 5-50 ml LB-Flüssigmedium mit einer Bakterienkolonie oder 50 µl Stammkultur angeimpft und unter Schütteln (225 rpm/min.<sup>-1</sup>) über Nacht inkubiert. Zur Selektion auf Plasmid-DNA wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugefügt (siehe Kapitel 2.1.7, Tabelle 2). Zur Anlage von Bakterienstammkulturen wurden 850 µl der Bakterienkultur mit 150 µl Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70 °C gelagert.

LB-Medium:     1% (w/v) Bacto-Trypton  
                  1% (w/v) NaCl  
                  0,5 % (w/v) Hefeextrakt, pH 7,5

Für Festmedium wurde 1,5% Agar zugesetzt.

#### 2.2.1.2 Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli* Bakterienzellen erfolgte nach dem Protokoll von Dower *et al.* (1988).

Hierbei wurden 5 ml einer Bakterienübernachtkultur in 500 ml LB-Flüssigmedium überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 bis 0.8 bei 37°C im Kulturenschüttler inkubiert. Nach einer 30 min. Kühlung der Kulturen auf Eis, wurden die Bakterien durch 10 min. Zentrifugieren bei 4°C und 5000 x g pelletiert. Das Bakterienpellet wurde dreimal mit 500 ml eisgekühltem, sterilem, bidestilliertem Wasser gewaschen und wie zuvor durch Zentrifugation pelletiert, um aus dem Medium verbliebene Salze zu entfernen. Nach einem abschließendem Wasch- und Zentrifugationsschritt in eisgekühltem, sterilem 10 % (v/v) Glycerin, wurde das Bakterienpellet in 1 ml 10 %(v/v) Glycerin aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Die so hergestellten kompetenten Zellen wurden durch Elektroporation mit Plasmiden transformiert. Durch kurzes Anlegen eines elektrischen Hochspannungsfeldes kommt es zu einer erhöhten Porosität in der Bakterienzellwand, so dass DNA in die Zelle aufgenommen werden kann (Shikegawa *et al.*, 1988).

40 µl auf Eis aufgetauter Zellen wurden zusammen mit 1µl Vektor-DNA oder Ligationsansatz vermischt, in Elektroporationsküvetten mit 0,2 cm Elektrodenabstand der Firma Bio-Rad



(München) überführt und bei 25  $\mu$ F, 2,5 kV und 200  $\Omega$  in einem „Gene Pulser“ von Bio-Rad (München) transformiert.

Nach einer einstündigen Erholungsphase der transformierten Zellen in LB-Medium bei 37 °C wurden Aliquots auf LB-Platten mit zur Selektion auf das verwendete Plasmid geeignetem Antibiotikum (Kapitel 2.1.7, Tabelle 2) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.2.1.3 Herstellung und Transformation kompetenter *E.coli*-Bakterien (Rubidiumchlorid-Methode)**

Alternativ zur oben beschriebenen Methode der Elektroporation wurde das folgende Protokoll zur Herstellung und Transformation kompetenter *E. Coli*- Zellen, von Promega modifiziert nach Hanahan (1985), verwendet.

Hierbei wurde eine Bakterienvorkultur im Verhältnis 1:100 in LB-Medium + 20 mM MgSO<sub>4</sub> überimpft und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 bei 37°C im Kulturschüttler herangezogen. Nach Pelletieren der Zellen bei 5000 x g, 45°C für 5 min., wurden die Bakterien in einem Viertel Volumen, eiskaltem Tfb 1 10 min. auf Eis inkubiert, wie oben erneut pelletiert und in Tfb 2 in 1/25 des Volumens resuspendiert. Nach einer 15 min. bis einstündigen Inkubation auf Eis, wurde die Suspension der kompetenten Bakterien aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 gelagert.

Zur Transformation wurden 100 $\mu$ l der kompetenten Zellen mit 10  $\mu$ l eines Ligationsansatzes vermischt und 30 min. auf Eis inkubiert, nach einem 45-50 sek. Hitzeschock bei 42°C erneut für 2 min. auf Eis aufgekühlt und in 1 ml LB-Medium 30 min. bis eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion transformierter Bakterien wurden Aliquots dieser Ansätze auf LB-Platten mit Antibiotikum über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Rekombinante Bakterienklone wurden über PCR-Analyse von 1 $\mu$ l in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendierten Bakterienkolonien und anschließender Agarosegelelektrophorese überprüft.

Tfb 1: 30 mM Kaliumacetat  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
50 mM Mn Cl<sub>2</sub>  
100 mM RbCl, pH 5,8 (eingestellt mit Essigsäure),

Tfb 2: 100 mM MOPS oder PIPES/ KOH (pH 6,5 )  
75 mM Ca Cl<sub>2</sub> 10 mM RbCl  
15%(v/v) Glycerin

Beide Lösungen wurden sterilfiltriert.

## 2.2.2 Arbeiten mit Bäckerhefe

### 2.2.2.1 Anzucht von Hefe und Herstellung von Stammkulturen

Einzelne Hefekolonien wurden in 5ml YPAD-Medium ein bis zwei Tage bei 30°C im Kulturschüttler angezogen. Transformierte Hefezellen wurden zur Selektion auf die transformierten Plasmide in SD-Medium ohne die entsprechende Markeramino-säure (siehe Kapitel 2.1.7, Tabelle 2) für zwei bis drei Tage bei 30°C kultiviert.

Zur Anlage von Stammkulturen wurden 750µl der Hefeflüssigkulturen mit 250µl 80% Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

<u>YPAD-Medium:</u>	20 g/l	Difco Pepton, pH 5,8
10 g/l	Hefeextrakt	
	40 mg/l	Adeninsulphat
2 %(w/v)	Glukose	
<u>SD-Medium:</u>	6,7 g/l	„Difco yeast nitrogen base without aminoacids“, pH 5,8
	182,2 g/l	Sorbit
	2 %(w/v)	Glukose
	100 ml/l	10 x “Drop out”
	25 mM	3-Amino-1,3,4-Triazol

Den Festmedien wurden jeweils 1,5 % Agar zugefügt.

#### „Drop out“:

300 mg/l L-Isoleucin	200 mg/l L-Methionin
1500 mg/l L-Valin	500 mg/l L-Phenylalanin
200 mg/l Adenin-Hemisulphat	2000 mg/l L-Threonin
200 mg/l L-Arginin HCl	200 mg/l L-Tryptophan
200 mg/l L-Histidin HCl Monohydrat	300 mg/l L-Tyrosin
1000 mg/l L-Leucin	200 mg/l Uracil
300 mg/l L-Lysin HCL	1000 mg/l L-Glutamat
1000 mg/l L-Aspartat	400 mg/l L-Serin

Zur Selektion transformierter Hefezellen auf bestimmte Plasmide (Kapitel 2.1.7, Tabelle 2) oder in der Interaktionssichtung (Kapitel 2.2.3) wurden die entsprechenden Aminosäuren aus der „Drop out“-Lösung weggelassen.

### 2.2.2.2 Herstellung und Transformation von kompetenten Hefezellen

Kompetente Hefezellen wurden nach Gietz *et al.* (1992) hergestellt und transformiert. Mit 200 µl einer gesättigten Hefevorkultur wurden 200 ml YPAD-Medium angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 1,0 bei 30°C im Kulturschüttler angezogen. Die Hefen wurden bei 5000 x g, 5 min. bei Raumtemperatur pelletiert, in 50 ml Wasser gewaschen und erneut pelletiert. Hieran schloss sich ein Waschschriff mit 20 ml 1 x LiAc/Te. Nach abermaligen Pelletieren der Zellen wurden diese in 100 µl 1 x LiOAC/TE resuspendiert. Zur Transformation wurden 1 µg Plasmid-DNA mit 25 µg denaturierter Heringssperm-DNA, 300 µl 1 x PEG/LiOAC/TE und 40 µl Hefesuspension für 30 min. bei 30°C und 15 min bei 42°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Die transformierten Hefen wurden eine Minute bei 13000 x G, 4°C pelletiert, in 300 µl TE aufgenommen, auf zur Selektion geeignetes SD-Medium ausgestrichen und 2 bis 3 Tage bei 30°C inkubiert.

10 x LiOAC:            1 M     Lithiumacetat, pH 7,5

10 x TE:                0,1 M    Tris-HCL, pH 7,5

10 x PEG:            50 %(w/v)    PEG 4000

### 2.2.3 Protein-/Protein-Interaktionsstudien mit Hilfe des TwoHybrid-Systems

Das Two-Hybrid System ist ein *in vivo* System in Hefe zur Detektion von Protein-/Protein-Interaktionen. Es beruht auf der Grundlage, dass sich der Gal4-Transkriptionsaktivator in eine Bindungsdomäne, die an eine regulatorische DNA-Sequenz (AUS-Sequenz) bindet und eine Aktivierungsdomäne (die Transkriptionsfaktoren bindet) unterteilen lässt (Ma und Ptashne, 1987). Die AUS-Sequenzen vor zwei Reportergenen gesetzt und ins Hefegenom integriert: Das HIS3-Gen, welches für ein essentielles Enzym der Histidin-Biosynthese kodiert, und das LacZ, welches für eine Untereinheit der β-Galaktosidase kodiert. Bindungs (BD)- und Aktivierungsdomäne (AD) wurden in zwei unterschiedliche Vektoren kloniert (pBD und pAD). Kloniert man für die zu untersuchenden Proteine kodierende cDNAs hinter diese Domänen, so werden in Hefe von Hybridproteine aus BD-/AD-Anteil und zu untersuchenden Protein gebildet. Interagieren BD- und AD- Fusionsproteine miteinander, so wird ein funktioneller Gal4-Aktivator rekonstituiert, der die Bildung der Reportergene induziert. Die Interaktion der Proteine wird durch Nachweis der Reportergene über Histidinautotrophie der Hefen und einer Blaufärbung im β-Galaktosidase-Test nachgewiesen.

### 2.2.3.1 Herstellung einer TwoHybrid-cDNA-Plasmid-Bank

Zur Herstellung einer TwoHybrid-cDNA-Plasmid-Bank wurden 1 µg von Blatt-RNA revers transkribierte, mit *Eco* RI- (5') und *Xho* I- (3') Linkern versehene cDNA in 200ng *Eco* RI-/*Xho* I-geschnittenes pAD-Plasmid ligiert und in elektrokompetenter DH5α-Zellen transformiert. 10 µl des insgesamt 20ml Transformationsansatzes wurde zur Bestimmung der Transformationseffizienz auf LB-Agar mit Ampicillin über Nacht bei 37°C inkubiert. Hierbei wurden  $6 \times 10^8$  cfu/ml ermittelt. Der restliche Transformationsansatz wurde in dreimal 500 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37°C im Kulturschüttler inkubiert. Aus diesen Flüssigkulturen wurde die Plasmid-DNA isoliert und als für die TwoHybrid-Interaktionssichtungen in Hefe verwendet.

### 2.2.3.2 Sichtung einer TwoHybrid-cDNA-Plasmid-Bank

Je 150 µg der TwoHybrid-cDNA-Plasmid-Bank wurden in 1ml-Transformationsansätzen in „Köder“-Plasmid-haltige (pBD-17k, pBD-17k-C, pBD-P0) Hefezellen transformiert. Ein 10 µl Aliquots wurden auf SD-Leu-Trp-Agar inkubiert. Ausgehend von der Anzahl der Kolonien auf diesen Platten wurde die Zahl der Hefekolonien der gesamten Hefetransformationsansätze hochgerechnet. Der verbliebene Transformationsansatz wurde in Aliquots auf SD-Leu-Trp-His-Platten für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Die auf diesen Platten gewachsenen Hefekolonien wurden erneut auf SD-Leu-Trp-His-Platten ausgestrichen und wie oben inkubiert. Hieraus resultierenden Kolonien wurden β-Galaktosidase-Tests unterworfen. Von Hefekolonien, die in diesen Tests positiv waren, wurde die Plasmid-DNA isoliert und in Retransformationsansätzen zusammen mit den „Köder“-Plasmiden bzw. leerem pBD-Plasmid erneut auf eine mögliche Interaktion der aus den cDNAs abgeleiteten Proteine mit den „Köder“-Proteinen getestet.

### 2.2.3.3 β-Galaktosidase-Test

Hierfür wurden die Hefekolonien auf Nylonmembran transferiert und durch einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen aufgebrochen. Die Membranen wurden dann auf X-Gal-Z-Puffer getränktem Filterpapier bis zur Blaufärbung positiver Kolonien inkubiert.

<u>Z-Puffer:</u>	10,7 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	5,5 g/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, pH 7,0
	0,75 g/l	KCl
	246 mg/l	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O

X-Gal-Z-Puffer:        9,8 ml Z-Puffer  
                              27 µl β-Mercaptoethanol  
                              167 µl X-Gal-Lösung [20 mg/ml DMF]

## **2.2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

#### **Plasmid-Minipräparation:**

Aus 5 ml Bakterienkulturen wurde die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Birnboim und Doyle, 1979) isoliert, über Phenol-/Chloroform-Extraktion gereinigt, mit Ethanol gefällt und in 65 µl H<sub>2</sub>O mit 50 µg/ml RNAse A resuspendiert.

#### **Plasmid-Midipräparation:**

Hochreine Plasmid-DNA aus 50 ml Kulturen wurden mit dem NUCLEOBOND<sup>®</sup> AX 100 Kit von Macherey und Nagel (Düren) nach Herstellerprotokoll gewonnen.

Die Analyse der Plasmid-DNA erfolgte durch PCR oder Restriktion der DNA und jeweils anschließender Agarosegelelektrophorese oder durch Sequenzierung mit anschließendem Sequenzvergleich.

### **2.2.4.2 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen für PCR-Analysen**

Aus transgenen Pflanzen wurde genomische DNA zum Nachweis integrierter T-DNA nach der Methode von Edwards *et al.* (1991) isoliert. Frisches Blattmaterial wurde im Eppendorfgesäß kurz mit einem Mikropistill mazeriert und mit 400 µl Extraktionspuffer gemischt. Nach kurzer Zentrifugation (1 min., 14000 x g) wurden 300 µl des Überstandes mit einem Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Das Präzipitat wurde 5 min. bei 14 000 x g abzentrifugiert, das Pellet unter Vakuum getrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst.

Extraktionspuffer:        200 mM    Tris-HCl pH 7,5  
                                      250 mM    NaCl  
                                      25 mM    EDTA  
                                      0,5 % (w/v)    SDS

TE:                            10 mM    Tris-HCl pH 8,0  
                                      1 mM    EDTA

### **2.2.4.3 DNA-Agarosegelelektrophorese**

DNA-Fragmente wurden nach ihrer Größe durch horizontale Gelelektrophorese in 0,7% -2 % Agarose in TAE-Puffer nach Sambrook *et al.* (1989) aufgetrennt. Zum Sichtbarmachen der DNA unter UV-Licht wurde dem Agarosegel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt.

TAE-Puffer : 40 mM            Tris-Acetat, pH 8,0  
                  1 mM            EDTA

### **2.2.4.4 Elution von DNA aus Agarosegelen**

Die unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnittenen DNA-Fragmente wurden mit dem QIAEX II Agarose Gel Extraction-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

### **2.2.4.5 Extraktion und Präzipitation von Nukleinsäuren**

Die Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren zur Reinigung von Proteinen und anderen Bestandteile und die alkoholische Fällung von Nukleinsäuren erfolgte nach den „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.* 1994).

Zur Extraktion von DNA aus PCR- Ansätzen oder nach Restriktionen oder Modifizierenden Reaktionen wurde auch das DNA-Extraction-Kit von MBI Fermentas (Walldorf) nach Herstellerangaben benutzt.

### **2.2.4.6 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von geringen DNA-Mengen wurde durch Vergleich mit dem DNA-Standard im Agarosegel abgeschätzt. Eine genauere Bestimmung von DNA- oder RNA-Mengen wurde photometrisch ermittelt. Die Konzentration wurde wie folgt berechnet:

DNA [µg/µl]:  $OD_{260} \times 50$

RNA [µg/µl]:  $OD_{260} \times 40$

### **2.2.4.7 Enzymatische Reaktionen mit der DNA**

Enzymatische Reaktionen mit der DNA wurden mit Enzymen von Roche oder Fermentas nach Empfehlung der Hersteller durchgeführt. In der folgenden Liste sind die verwendeten Enzyme mit der zugehörigen Reaktion aufgelistet.

<b>Enzym</b>	<b>Verwendung</b>
DNA-Endorestriktionsenzyme	Spezifisches Schneiden von DNA
T4-DNA-Ligase	Zusammenfügen doppelstränger DNA, Einfügen von DNA-Fragmenten in Vektoren
CIAP (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)	Entfernung von 5'-Phosphatresten von linearisierten Vektoren, um Religation der geschnittenen Vektoren zu verhindern
„Klenow-Enzym“	Auffüllen bzw. Abdauen von überhängenden DNA-Enden.; Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten
T4-DNA-Polymerase	Auffüllen bzw. Abdauen von überhängenden DNA-Enden
T4-DNA-Kinase	Phosphorylierung von DNA-Fragmenten und Oligonukleotiden; radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

**Tabelle 3: eingesetzte DNA-modifizierende Enzyme und ihre Verwendungen**

#### **2.2.4.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten**

PCR wurde zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen, zur Mutagenese und zur Kontrolle von Bakterienkolonien, isolierten Plasmiden oder transgenen Pflanzen verwendet.

Hierbei wurde die Taq-Polymerase (Roche, Mannheim) nach den Herstellerempfehlungen verwendet.

Ein PCR Ansatz enthielt:

- 1/10 Vol. 10 x PCR-Puffer vom Hersteller
- 0,2 mM dNTPs
- 0,25 mM MgCl<sub>2</sub>
- jeweils 2 µM vorwärts und rückwärts „Primer“
- 1-2 µl DNA-Lösung oder Bakteriensuspension.

Für PCR-Reaktion ausgehend von Bakteriensuspensionen und genomischer Pflanzen-DNA wurde jeweils zur Denaturierung 5% DMSO eingesetzt.

Für die Reaktionen im Thermozykler wurde folgendes Standardprotokoll den optimalen Bedingungen angepasst.

einmal:	94°C, 2 bis 5 min.
20 – 30 Schleifen:	94°C, 30 sek.
	X°C, 30 sek.
	72°C, Y sek.
einmal:	72°C, 30 sek.

X = Hybridisierungstemperatur während der Anlagerung der „Primer“ an die DNA-Matrize

$$X \text{ } ^\circ\text{C} = 2 \text{ } ^\circ\text{C}(\text{A}+\text{T}) + 4 \text{ } ^\circ\text{C}(\text{C}+\text{G}) - 5^\circ\text{C}$$

Y = Elongationsdauer ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes (in der Regel: 1 min. pro 1000 bp).

#### **2.2.4.9 Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden**

Die Synthese radioaktiv markierter DNA-Sonden fand nach der von Feinberg & Vogelstein (1983) entwickelten Methode des „random primed labelling“ wie folgt statt:

100 ng	DNA
100 pmol	„random primer“ (Roche, Mannheim)
5 µl	2,5 mM dATP, dGTP, dTTP
5 µl	$\alpha$ - <sup>32</sup> P dCTP
1 x	Klenowpuffer (Roche)
4 U	Klenow-Polymerase in 20µl Gesamtvolumen

Die Synthese fand 20 min. bei 37°C statt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden anschließend über Gelfiltration durch eine G-50 Sephadex-Säule abgetrennt. Die Bestimmung der Effizienz der Markierung erfolgte mit 1 µl der gereinigten Sonde in 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiscint von Roth, Karlsruhe) im Szintillationszähler (Beckmann, München).

#### **2.2.4.10 *In vitro* Mutagenesen**

Um bestimmte Aminosäureabfolgen innerhalb von Proteinen zu verändern, wurde auf DNA-Ebene die entsprechende DNA-Sequenz verändert. Kodierte ein DNA-Fragment in verschiedenen Leserastern für verschiedene Proteine, wurde darauf geachtet, dass der



Leserahmen für das zu verändernde Protein geändert wurde, die Kodierung des anderen Leserahmens aber nicht betroffen wurde. Für die Mutagenesen wurden verschiedene Methoden verwendet.

#### **2.2.4.10.1 Mutagenesen mit dem „Altered Sites<sup>®</sup> II *in vitro* mutagenesis system“ (Promega)**

Hierfür wurde das zu verändernde DNA-Fragment zunächst in den Vektor pAlter -1 kloniert. Aus dem doppelsträngigen Plasmidkonstrukt wurde entweder durch Infektion transformierter JM109 Zellen mit dem Helferphagen R408 einzelsträngige Plasmid-DNA generiert und anschließend aus den Kulturen isoliert. Alternativ hierzu wurde das isolierte, doppelsträngige Plasmid auch durch alkalische Denaturierung in Einstränge verwandelt. Es wurde jeweils nach den mitgelieferten Protokollen des Herstellers verfahren.

Anschließend wurde an die DNA-Einzelstränge ein Oligonukleotid gebunden, welches die Mutation trägt, ein Oligonukleotid, welches das zerstörte Ampicillin-Resistenzgen im Vektor wiederherstellt und eines, welches das Tetrazyklin-Resistenzgen zerstört. Die beiden letzteren „Oligos“ dienen der späteren Selektion der mutierten Konstrukte. Der zu mutagenesierende Plasmidstrang wurde mit Hilfe von T4-Polymerase und T4-DNA-Ligase synthetisiert und nach Transformation in den DNA-reparaturdefizienten Bakterienstamm ES 1301 amplifiziert. Um anschließend größere Plasmidmengen zu erreichen, wurde das mutagenesierte Plasmid in dem *E. coli* Stamm JM 109, der Plasmide sehr effizient amplifiziert, vermehrt. Diese Methode hat den Vorteil, dass mehrere Mutationen gleichzeitig oder in mehreren Runden, bei jeweiligem Wechsel der Resistenzmarker in ein Konstrukt eingefügt werden kann. Außerdem sind Synthesefehler im Vergleich zur PCR selten, was sich gerade bei langen DNA-Fragmenten auswirkt.

#### **2.2.4.10.2 Mutagenesen über rekombinante PCR**

Sehr viel schneller und einfacher als das zuvor beschriebene Protokoll ist das Einfügen von Mutationen über rekombinante PCR. Hierbei wurden drei PCR-Reaktionen miteinander verknüpft. Ausgehend von dem zu verändernden DNA-Fragment wurde in der ersten Reaktion das 5'-Ende mit Hilfe von einem 5'-gelegenen „Vorwärts-Primer“ und einem „Mutagenese-Primer“ in Rückwärtsleserichtung und in der zweiten Reaktion das 3'-Ende mit dem „Mutagenese-Primer“ in Vorwärtsleserichtung und einem 3'-positionierten „Rückwärtsprimer“ amplifiziert. Von den hieraus resultierenden DNA-Fragmenten wurde in einer abschließenden PCR-Reaktion mit dem 5'-Vorwärtsprimer und dem 3'-Rückwärtsprimer das mutagenesierte DNA-Fragment in Gesamtlänge synthetisiert.

#### **2.2.4.11 Herstellung von Teillängen-Konstrukten**

Um DNA-Konstrukte herzustellen, die nur ein Teilprotein kodieren wurden drei Techniken alternativ zueinander verwendet. Zum einen wurden mit dem „Altered Sites<sup>®</sup> II *in vitro* mutagenesis system“ (Promega,) doppelte Stoppkodons an gewünschter Stelle eingefügt. Zum anderen wurde einfach nur das gewünschte DNA-Stück über PCR amplifiziert und subkloniert.

Sehr kurze Fragmente von bis zu 150 Bp wurden über „Primerannealing“, hergestellt. Hierbei wurden die phosphorylierten Oligonukleotide zunächst 5 min. bei 80 °C denaturiert. Bei langsamen Abkühlen auf 45°C (1°C/min.) und schnelleren Abkühlen auf 37°C (3°C/min.) hybridisierten die Oligonukleotide miteinander. Überlappten die Oligonukleotide nicht vollständig, wurden die jeweils fehlenden Strangteile mit T4-Polymerase aufgefüllt. Bei Einsatz von drei oder mehr Oligonukleotiden wurde der Reaktion zusätzlich T4-Ligase zugesetzt. Anschließend wurden die Fragmente in die gewünschten Vektoren kloniert.

#### **2.2.4.12 DNA-Sequenzierungen**

Sequenzierungen von cDNA-Fragmenten und Plasmiden wurden von der ADIS-Einheit des MPIZ durchgeführt.

### **2.2.5 Isolierung und Untersuchung von RNA**

#### **2.2.5.1 *In vitro* Transkription**

Für *in vitro* Transkriptionen wurden die DNA-Fragmente in die Plasmide pBluescript II SK+/- (Stratagene, Heidelberg), pSP73 oder pSP65 (Promega, Heidelberg) kloniert.

Vor der Transkription wurden die Plasmide nach dem eingefügtem Fragment geschnitten.

*In vitro*-Transkriptionsansatz:

- 5 µl 10 x Transkriptionspuffer
- 7,5 µl 3,3 mM ATP, UTP, CTP
- 5 µl 0,5 mM GTP
- 5 µl 0,5 mM <sup>7</sup>GpppG-cap
- 5 µl linearisierte Plasmid-DNA (1µg/µl)
- 15 U RNA-Polymerase (je nach Promotor: SP6, T3oder T7-RNA-Polymerase)
- ad 50 µl H<sub>2</sub>O

### **2.2.5.2 Isolierung von RNA aus Pflanzen**

Aus bis zu 100 mg frischem Blattmaterial wurde Gesamt-RNA mit dem TRIZOL<sup>®</sup>-Reagenz (Gibco BRL, Eggenstein) isoliert. Hierbei wurde das Herstellerprotokoll befolgt. Die resultierende RNA-Menge ist ausreichend für einen Northern-Blot oder kann nach zusätzlicher Entfernung von genomischen DNA-Resten für RT-PCR-Analysen eingesetzt werden. Gleichzeitig können aus den Proben auch Proteine isoliert werden.

Größere Mengen an polysomaler RNA wurden nach Leiser *et al.* (1992) aus Pflanzen isoliert. 2 g in flüssigem Stickstoff gemörserten Blattmaterial wurden gründlich mit 10 ml RNA-Extraktionspuffer gemischt und anschließend einmal mit einem Volumen Phenol und zweimal mit 1 Volumen. Phenol/Chloroform geklärt. Die Nukleinsäuren wurden mit 2 Volumen Ethanol (-20°C) gefällt und bei 5000 x g 10 min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann auf Eis in 1,5 ml 3 M Natriumacetat, pH 5,0 gelöst. Die polysomale RNA ließ sich bei 13 000 x g, 10 min. 4°C pelletieren. Das Pellet wurde in 100 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf Eis gelöst, die RNA erneut mit Ethanol gefällt, in 70% Ethanol gewaschen und schließlich in 75 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst.

RNA-Extraktionspuffer:     200 mM Tris-HCl pH 9,0  
                                  400 mM KCl  
                                  35 mM MgCl<sub>2</sub>  
                                  200 mM Saccharose  
                                  12,5 mM EDTA

### **2.2.5.3 Northern-Blot**

20 µg RNA wurde bei 55°C in 50% Formamid, 2,2 M Formaldehyd und 1x MOPS denaturiert und auf einem 1% Agarosegel (1% Agarose, 2,2 M Formaldehyd) mit 1x MOPS als Laufpuffer aufgetrennt und anschließend mit Wasser eine Stunde unter Schütteln gespült. Anschließend wurde die RNA entweder über kapillare Saugkraft mit 20 x SSC über Nacht oder im Vakuumblotter für zwei Stunden mit 20 x SSC auf „Hybond N+ Membran“ (Amersham) geblotet. Nach kurzer Trocknung wurde die RNA mit UV-Licht (UV Stratalinker 2400, Stratagene) auf der Membran fixiert.

Die Filter wurden nach einer einstündigen Vorhybridisierung in Hybridisierungslösung mit radioaktiver DNA-Sonde in Hybridisierungslösung bei 42°C über Nacht hybridisiert.

Die Filter wurden anschließend wie folgt gewaschen: 1x 2 min., 42°C mit 2 X SSC + 0,1% SDS, 1 x 10 min., 68°C mit 2 X SSC+ 1% SDS, 2 x 15 min. mit 1 X SSC + 0,1% SDS, und 1 x 15 min. mit 0,2 X SSC + 0,1% SDS

Die radioaktiven Banden wurden auf Röntgenfilm oder mit dem Phosphoimager dokumentiert.

10 x MOPS:            0,4 M MOPS pH 7,0  
                              0,1M Natriumacetat  
                              0,02 M EDTA

100 x Denhardt's:    2 % (w/v) Ficoll  
                              2 % (w/v) PVP  
                              2 % (w/v) BSA

20 x SSC:             3 M NaCl  
                              0,3 M Natrium Citrat, pH 7,0

Hybridisierungslösung: 50 % Formamid  
                              5 x SSC  
                              5 x Denhardt's  
                              0,1 % SDS  
                              10 µg/ml Lachssperm-DNA.

Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Ansätze mit DNase I behandelt, die RNA Phenol/Chloroform extrahiert, Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in einem 10 µl Wasser aufgenommen.

## 2.2.6 Isolierung und Untersuchung von Proteinen

### 2.2.6.1 *In vitro*-Translation

100 ng RNA wurde zwei Stunden bei 25°C wie folgt *in vitro* translatiert:

- 25 µl Weizenkeim-Extrakt
- 4 µl Aminosäuremix ohne Methionin
- 1 µl 100 mM Kaliumacetat
- 2 µl <sup>35</sup>S-Methionin

ad 50 µl ddH<sub>2</sub>O

Um die Reaktion zu kontrollieren, wurde 1 µl der Reaktionen auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend nach Hames (1981) wie folgt fluorografiert.

Nach dem Lauf wurde das Proteingel mindestens eine Stunde in 10 %(v/v) Essigsäure, 40 %(v/v) Methanol fixiert und anschließend 3 x 15 min. mit 100 % DMSO entwässert. Nach einstündiger Inkubation wurde das Gel 30 min. gewässert, vakuumgetrocknet und die radioaktiven Banden auf Röntgenfilm dokumentiert.

### 2.2.6.2 Gesamtproteinextraktion aus Pflanzen

Die Extraktion von Proteinen aus Pflanzenteilen erfolgte modifiziert nach Dehesh *et al.* (1986). Dabei wurden 100 bis 200 mg in flüssigem Stickstoff gemörserteres Pflanzenmaterial gut mit 1 ml 2 x SDS-PAGE-Probenpuffer gemischt, 5 min. gekocht und anschließend unter starkem Schütteln auf Raumtemperatur eine Stunde lang abgekühlt. Die Proben wurden anschließend aus einem SDS-PAGE aufgetrennt oder bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.6.3 Herstellung von Membranproteinfraktionen

Die Herstellung von Gesamtmembranfraktionen erfolgte wie bei Sokolova *et al.* (1997) beschrieben. Fünf Gramm Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und in zwei Volumen H-Puffer (1) homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine 10 min. Zentrifugation bei 3000 x g, 4°C abzentrifugiert und verworfen. Anschließend wurden die Membranen durch eine einstündige Zentrifugation bei 15 000 x g, 4°C sedimentiert, in flüssigem Stickstoff in kleinen Aliquots schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -70°C aufbewahrt.

H-Puffer (1): 50 mM MES-NaOH pH 7,0  
250 mM Saccharose  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM EDTA  
0,5 mM DTT  
1 µl Pefabloc SC [10 µg/µl] (Sigma-Aldrich)

#### **2.2.6.4 Herstellung von Zellwandproteinfraktionen**

Pflanzenzellwandfraktionen wurden wie von Citovsky *et al.* (1993) beschrieben isoliert. In flüssigem Stickstoff gemörstertes Pflanzenmaterial wurde in einem Volumen Puffer H (2) bei 4°C homogenisiert. Nach Zentrifugation mit 1000 x g für 5 min. bei 4°C, wurde das Zellwandpellet dreimal in 10 Volumen Puffer H (2) + 2 % Triton X-100 homogenisiert und abzentrifugiert. Anschließend folgten sechs Waschschrte mit Puffer H (2) + Triton X-100 und zwei Waschrte in Puffer H (2) ohne Detergenz. Das resultierende unlösliche Material wurde in 0,5 Vol. Puffer H (2) resuspendiert, in kleinen Aliquots in Stickstoff schockgefroren, langsam aufgetaut und 20 min. bei 20 000 x g, 4°C zentrifugiert. Die gelösten Proteine im Überstand wurden bei -70°C aufbewahrt.

Puffer H (2): 0,1 M HEPES pH 7,4  
5 mM DTT  
10 mM EDTA  
1 mM PMSF  
1 µl/ml Pefabloc SC [10 µg/µl] (Sigma)

#### **2.2.6.5 Fällung von Proteinen**

##### **2.2.6.5.1 Acetonfällung:**

Die zu fällenden Proben wurden mit zwei Volumen 100% Aceton versetzt, 30 min. bei -20°C gefällt und anschließend 10 min. bei 10 000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde zweimal mit 70 % Aceton gewaschen, getrocknet und anschließend in 6M Harnstoff + 0,5% Essigsäure aufgenommen.

#### **2.2.6.5.2 TCA-Fällung:**

Hierbei wurden den Proteinlösungen bis zu einer Endkonzentration von 10 % (w/v) TCA zugesetzt. Nach 30 min. Inkubation auf Eis wurden die Proteine durch Zentrifugation (15 000 x g, 10 min, 4 °C) sedimentiert und anschließend in SDS-PAGE-Probenpuffer + 0,5 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gelöst.

#### **2.2.6.6 Überexpression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli***

Hierfür wurden die als GST-Fusionsproteine in *E. coli* zu exprimierenden cDNA-Fragmente in pGEX 5X-1 kloniert, so dass N-terminale GST-Fusionen entstehen. Zur Überexpression wurden die Konstrukte in BL21 (DE) oder BL21 Codon Plus (DE3) transformiert und auf LB+Amp-Platten ausgestrichen. Die Überexpression und Aufreinigung wurde nach Frangioni und Neel (1993) durchgeführt. Eine 5 ml-Übernachtskultur wurde in 100 ml LB + Ampicillin überführt und 1,5 h bei 37 °C im Kulturschüttler angezogen. Anschließend wurde die Proteinexpression mit 0,1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und die Zellen weitere zwei Stunden herangezogen. Anschließend wurden die Zellen durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 5000 x g geerntet und in 10 ml 1 x STE gewaschen.

Die Zellen wurden nach erneuter Zentrifugation in 5 ml 1 x STE +100 µg/ml Lysozym resuspendiert und 15 min. auf Eis inkubiert und den Ansätzen N-Laurylsarkosin in einer Endkonzentration von 1,5 % zugefügt. Die Zellen wurden dann 1 min. sonifiziert (Geräteeinstellung: 120 W/ Zyklus 50 %, Branson sonifier 250, Heinmann Ultraschall- und Labortechnik). Zellbruchstücke und unlösliche Proteine wurden sedimentiert (15 min., 10 000 x g, 4°C). Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde mit Triton X-100 zu einer Endkonzentration von 2 % versetzt und die Proteinproben mit 500 µl Glutathion-Sepharose (in PBS) 30 min. bei 4°C unter starkem Schütteln inkubiert. Im Anschluß daran wurden die an die Sepharose gekoppelten GST-Fusionsproteine fünfmal in 10 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proteine dreimal mit je 1 ml Elutionspuffer bei 4 °C, 15 min. eluiert. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen durch Proteinbestimmung und SDS-PAGE mit anschließender Färbung analysiert.

10 x PBS:     1,37 M NaCl  
                  27 mM KCl  
                  43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
                  14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10 x STE: 100 mM Tris-HCl pH 8,0  
1,5 M NaCl  
10 mM EDTA

Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0  
15 mM reduziertes Glutathion

### **2.2.6.7 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte photometrisch nach einer veränderten Methode nach Lowry *et al.* (1951) unter Anwendung des „BIO-RAD Protein Assay Kit“ von Bio-Rad (München).

### **2.2.6.8 SDS-PAGE**

Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht über diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Protokoll von Lämmli (1970) aufgetrennt. Hierfür wurden 12,5 bis 15 % Polyacrylamidgele verwendet.

### **2.2.6.9 Färbung von Proteingelen**

#### **2.2.6.9.1 Coomassie-Färbung**

Nach abgeschlossener Gelelektrophorese wurden die Proteingele in 0,5 % (w/v) Coomassie-Brillantblau (Serva-Blue G250, Serva), 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol (oder technisches Ethanol) 30 min. mit leichtem Schütteln gefärbt. Das Gel wurde dann mit 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol (oder technisches Ethanol) entfärbt.

#### **2.2.6.9.2 Silberfärbung**

Geringere Proteinmengen wurden durch Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) unter Modifizierung (Rabilloud und Charmont, 2000) durchgeführt. Nach 3 x 30 min. Fixierung der Gele mit 5 % Essigsäure, 30 % Ethanol und 4 x 10 min. Waschen in Wasser wurden die Gele 1 min. mit 0,8 mM Natriumthiosulfat sensibilisiert und anschließend 2 x 1 min. mit Wasser gespült. Dann wurden die Gele 30 min. lang in 12 mM Silbernitrat imprägniert. Nach kurzem Spülen mit Wasser wurden die Gele bis zur Sichtbarkeit der Proteinbanden in 3 % (w/v) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 250 µl/l Formalin (37% Stammlösung), 125 µl/l 10 % (w/v) Natriumthiosulfat entwickelt. Die Färbung wurde in 10 % Essigsäure, 40 % Methanol gestoppt.



## 2.2.6.10 Western-Blot-Analysen

### 2.2.6.10.1 Transfer auf Nitrozellulose

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine in einer Blotkammer (Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, USA) auf Nitrozellulosemembran überführt. Der Transfer fand zwei Stunden bei 4°C in 1 x Blotpuffer (Towbin *et al.*, 1979) mit 350 mA statt. Der Transfer wurde durch reversible Färbung mit Ponceau S (Serva Heidelberg) überprüft. Die Blots wurden mit Wasser entfärbt.

10 x Blotpuffer:        1,5 M Glycin  
                              2,0 M Tris

### 2.2.6.10.2 Immundetektion

Die Filter wurden eine Stunde in bei Raumtemperatur in Blockierungslösung blockiert und 1 x 10 min. in TBST gewaschen. Anschließend wurden die Filter eine Stunde mit Antikörper in optimaler Konzentration in Blockierungslösung bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach 3 x 10 min. Waschen in TBST wurden die Blots mit Peroxidasegekoppelten Anti-Kaninchen oder Maus- Antikörperkonjugat in Blockierungslösung [1: 10000] inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurden die Banden über die Peroxidaseaktivität mit Hilfe des „ECL Western Blotting Detection System“ (Amersham-Buchler, Braunschweig) nach Herstellerangaben auf Röntgenfilm detektiert.

10 x TBS:                1 M Tris-HCl pH 8,0  
                              1,5 M NaCl

Blockierungslösung: 1 x TBS  
                              0,5 %(w/v) Tween 20  
                              5 %(w/v) Magermilchpulver

TBST:                    1 x TBST  
                              0,5 %(w/v) Tween 20

## 2.2.7 Proteinbindungsstudien

### 2.2.7.1 „Overlay Assays“

Untersuchung von Protein/Proteininteraktionen als auch von Interaktion von Proteinen mit Nukleinsäuren wurde wie bei Gramstat *et al.* (1990) durchgeführt. Dafür wurden zunächst Proteine auf dem SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Blot wurde anschließend 2 x 30 min. in 6 M Harnstoff + 0,1 % Tween 20 unter leichtem Schütteln inkubiert, um die Proteine vollständig zu denaturieren und das SDS zu entfernen. Anschließend wurden die Proteine auf dem Blot durch 4 x 15 min. Inkubation in Puffer A renaturiert.

Für Interaktionsstudien der geblotten Proteine mit anderen Proteinen wurde <sup>35</sup>S-markiertes Translationsprodukt in Puffer A zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Sollte die Bindung der geblotteten Proteine mit Nukleinsäuren untersucht werden, fand die Inkubation mit <sup>32</sup>P- markierter, durch *in vitro* Transkription synthetisierte RNA oder mit <sup>32</sup>P- markierten Oligonukleotiden in Puffer A für zwei Stunden bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde der Blot 2 x 30 min. in Puffer B gewaschen. Radioaktivmarkierte Banden wurden über Röntgenfilm dokumentiert.

Puffer A: 10 mM Tris-HCl pH 7,8  
1 mM EDTA  
50 mM NaCl \*  
0,2g/l BSA  
0,2g/l Ficoll  
0,2g/l PVP

Puffer B: 10 mM Tris-HCl pH 7,8  
1 mM EDTA  
200 mM NaCl\*

\* Konzentration wurde zum Teil erhöht, um unspezifische Bindungen zu verringern.

### 2.2.7.2 "Pull down Assays"

Protein-/Protein-Interaktionen wurden *in vitro* auch über „Pull down Assays“, wie bei Kierdorf (1999), untersucht. Hierbei wurden 5 µg an Glutathion-Sepharose gekoppelte, gereinigte GST-Fusionsproteine in TSA + 0,1 % Triton X-100 gewaschen und 1 min. mit 500 x g, 4°C präzipitiert und wieder in 200 µl TSA + 0,1 % Triton X-100 aufgenommen. Die

Ansätze wurden mit 10 µl S<sup>35</sup>-markierten Translationsprodukten zwei Stunden bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden durch folgende Waschschriffe entfernt: 4 x 1 ml TSA + 0,1 % Triton X-100, 4 x 1 ml TSA-Puffer, 2 x Waschpuffer. Dabei wurden die Sepharosepartikel jeweils 1 min. bei 500 x g, 4°C herunterzentrifugiert und die Überstände möglichst vollständig entfernt. Am Ende wurde das Sediment in 60 µl 2x SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen, die Proteine 5 min. bei 100 °C solubilisiert und anschließend ein Aliquot auf einem 12,5 bis 15 % SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel fluografiert, getrocknet und anschließend auf Röntgenfilm exponiert.

TSA: 0,01 M Tris-HCl pH 8,0  
0,14 M NaCl\*

Waschpuffer: 0,05 M Tris-HCl pH 6,8

\*Konzentration wurde zum Teil erhöht, um unspezifische Bindungen zu verringern.

### **2.2.8 *In vitro* Phosphorylierungsstudien**

*In vitro*-Phosphorylierungsexperimente wurden wie bei Sokolova *et al.* (1997) beschrieben durchgeführt. Dabei wurden 5-10 µg GST-Fusionsproteine mit 10 µg Pflanzenproteinpräparationen (meist Zellmembranfraktionen) 30 min. bei 37°C in 1 x Phosphorylierungspuffer in Anwesenheit von 0,5 µl [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von einem Viertel Volumen. 4 x SDS-PAGE-Probenpuffer gestoppt und auf SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden vakuumgetrocknet und anschließend auf Röntgenfilm exponiert.

2 x Phosphorylierungspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
200µM Natriumpyrophosphat  
2 mM NaF  
1 µl/ml Pefabloc SC [10 µg/µl] (Sigma)

### **2.2.9 Stabile Pflanzentransformation**

Zur Klonierung von cDNA-Fragmenten für die stabile Transformation in Pflanzen wurden die cDNA-Fragmente zunächst über geeignete Schnittstellen in den Vektor pRT101 so eingefügt, dass sie zwischen CaMV 35S Promotor und Terminator lagen. Anschließend wurden die

Kassetten, bestehend aus 35S Promotor, cDNA-Fragment und 35S Terminator, über flankierende *Hind* III-Schnittstellen in den Vektor pBIN19 gebracht.

Die stabile Transformation von pBIN19-Konstrukten in Kartoffelblätter und Regeneration von transgenen Pflanzen erfolgte nach Horsch *et al.* (1985).

### **2.2.9.1 Herstellung und Transformation elektrokompetenter Agrobakterien**

Zunächst wurden die pBIN19-Konstrukte in *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4044 transformiert.

Hierfür wurde eine 5 ml Vorkultur der Agrobakterien in 400 ml YEB + Rifampicin [100µg/ml] + Streptomycin [300µg/ml] überimpft und bei 28°C auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 angezogen. Nach Herunterzentrifugieren des Bakterienpellets bei 5000 x g für 10 min wurde das Pellet dreimal mit Wasser und einmal mit 10% Glycerin gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation bei 5000 x g für 10 min wurde das Bakterienpellet in 10% Glycerin resuspendiert, in Aliquots in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -70°C gelagert.

Zur Transformation wurden 2 bis 10 ng DNA mit 40 µl Zellen gemischt und in einer Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand der Firma Bio-Rad (München) überführt und bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω in einem „Gene Pulser“ von Bio-Rad (München) transformiert. Die transformierten Zellen wurden 3 Std. bei 28°C regeneriert und anschließend in Aliquots auf Platten mit YEB + Rifampicin [100µg/ml] + Streptomycin [300µg/ml] + Kanamycin [25µg/ml] 2 bis 3 Tage bei 28°C inkubiert.

YEB: 5 g/l Fleischextrakt (Gibco)

5 g/l Saccharose

1g/l Hefeextrakt

5 g/l Pepton

2ml/l 1 M MgSO<sub>4</sub>, pH 7,0

### **2.2.9.2 Transformation von *Solanum tuberosum***

Zur Transformation von Kartoffelblattstücken wurde zunächst eine 40ml YEB+ Rifampicin [100µg/ml] + Streptomycin [300µg/ml] + Kanamycin [25µg/ml] mit 2ml Bakterienvorkultur angeimpft und über Nacht bei 28°C im Kulturschüttler herangezogen. Nach Sammeln der Agrobakterien bei 5000 x g für 15 min wurde das Pellet in 5ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> gewaschen und anschließend in ca. 70 ml MS I Flüssigmedium resuspendiert. In dieser Agrobakteriensuspension wurden Stücke von sterilen Kartoffelblättern für 30 min bis eine Std. bei 28°C im Dunkeln und anschließend auf Platten mit MS I Festmedium für zwei Tage

bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Blattstücke 10 bis 30 min in MS I Flüssigmedium mit 500 mg/l Claforan gewaschen und auf Platten mit MS II Festmedium + 100 mg/l Kanamycin + 500 mg/l Claforan für eine Woche bei 25°C im Lichtkulturraum inkubiert. Das Medium wurde wöchentlich gewechselt. Zunächst kam es zur Kallusbildung aus transformierten Zellen. Die Kalli wurden vereinzelt und weiter auf MS II Festmedium + 100 mg/l Kanamycin + 500 mg/l Claforan angezogen. Aus diesen Kalli gebildete Sprosse wurden abgeschnitten und zur Bewurzelung auf MS III +100 mg/l Kanamycin + 500 mg/l Claforan gesetzt. Das Medium wurde dann alle zwei bis drei Wochen gewechselt.

MS I: 4,3 g/l „Murashige und Skoog basal salt mixture“ (Duchefa), pH 5,8  
 30 g/l Glukose  
 100 mg/l Inosit  
 1ml/l Vitaminlösung

MS II: 4,3 g/l „Murashige und Skoog basal salt mixture“ (Duchefa), pH 5,8  
 30 g/l Glukose  
 100 mg/l Inosit  
 1ml/l Vitaminlösung  
 2 mg/l Zeatin  
 20 µg/l Gibbellerin A3  
 20 µg/l NAA  
 100 mg/l Kanamycin  
 500 mg/l Claforan

MS III: 4,3 g/l „Murashige und Skoog basal salt mixture“ (Duchefa), pH 5,8  
 20 g/l Saccharose  
 100 mg/l Inosit  
 1ml/l Vitaminlösung

Für Festmedien wurden 7,5 g Agar zugesetzt.

10 x Vitaminlösung: 20 mg/ml Glycin  
 5 mg/ml Nicotinsäure  
 5 mg/ml Pyridoxin  
 100 mg/ml Thiamin

### **2.2.10 Zuckerbestimmung**

Die Zuckerbestimmungen an transgenen 17 Pflanzen wurden als Kooperation von Daniel Hofius (Gatersleben) wie bei Herbers *et al.* 1996 durchgeführt. Es wurden Glukose, Fruktose, Saccharose, der Gesamtgehalt an löslichen Zuckern und der Gehalt an Stärke an unteren und oberen „Soucre“-Blättern von jeweils 10 Pflanzen pro Pflanzenlinie bestimmt.

### **2.2.11 PLRV-Resistenztest**

PLRV-Resistenztests an 17kDa transgenen Pflanzen wurden als Kooperationsprojekt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Larry Kawschuk (Lethbridge Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge, Alberta, Kanada) durchgeführt. Von 10 Pflanzen pro Linie und 10 untransformierte Kontrollpflanzen wurden jeweils zwei im blattlausfreien Gewächshaus als Negativkontrolle kultiviert. Die übrigen acht Pflanzen pro Pflanzenlinie wurden mit PLRV-infizierten Blattläusen bei 22°C inokuliert. Die Blattläuse wurden nach drei Tagen abgetötet. Die infizierten Pflanzen wurden in einem separaten Gewächshaus kultiviert. Der PLRV-Titer wurde mit Hilfe von ELISA-Tests direkt nach Versuchsbeginn und nach 36 Tagen durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Studien über das von ORF0 kodierte Protein (P0)

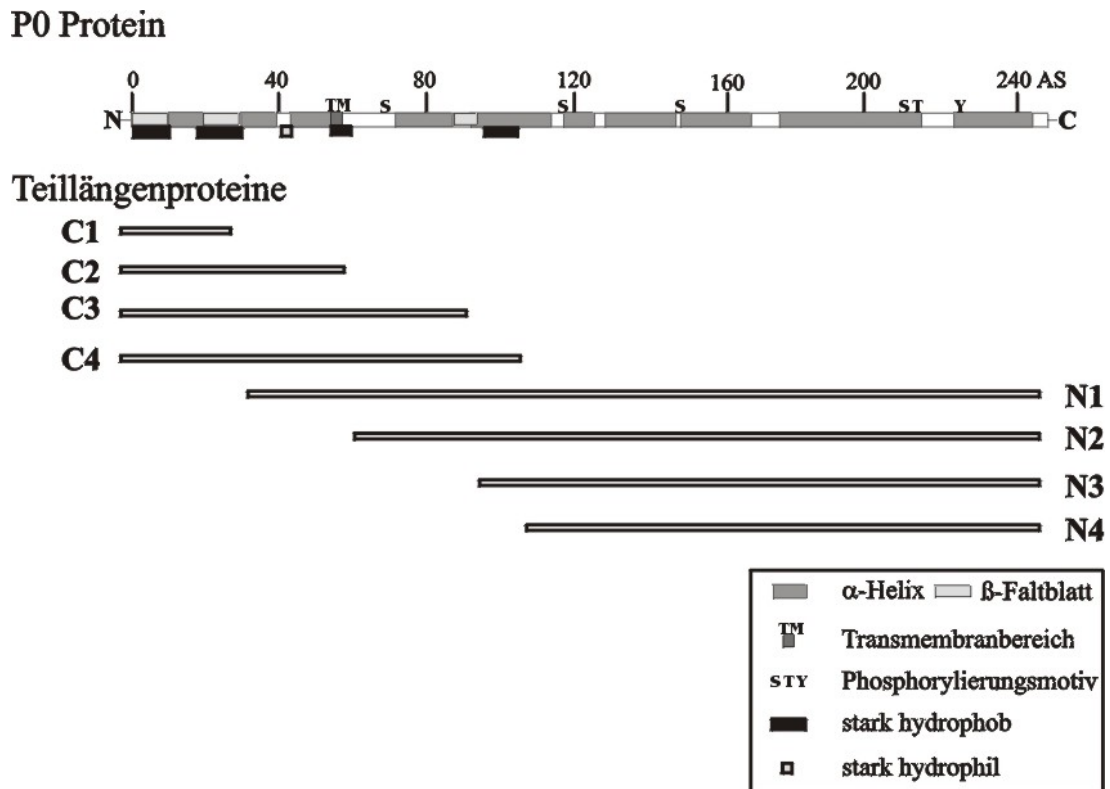
#### 3.1.1 Lassen sich funktionelle Domänen im P0 abgrenzen?

##### 3.1.1.1 Computeranalysen vom P0 Protein und P0 Proteinkonstrukte für die Transformation von Kartoffelpflanzen

Mit der Aminosäuresequenz vom P0 Protein wurden Computeranalysen mit verschiedenen Programmen aus der Internetseite „PredictProtein“ (B. Rost, 1996) und dem „GCG package“ (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA) durchgeführt, die Aufschluß über mögliche Phosphorylungsmotive, einen Transmembranbereich, mögliche Sekundärstrukturen und hydrophobe/hydrophile Bereiche im P0 Protein gaben. Die Ergebnisse aus diesen Analysen sind in der Abbildung 2 zusammenfassend schematisch dargestellt. Zur Kartoffeltransformation wurden zunächst cDNA-Konstrukte in pBIN19 hergestellt, die für verschiedene C-terminal oder N-terminal verkürzte P0 Proteine kodieren. Die Konstrukte sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Das Konstrukt C3 entspricht den oben erwähnten 113 Aminosäurekonstrukt, dessen Expression in Kartoffelpflanzen zur Ausbildung eines Krankheitsphänotyps ausreichen soll (Prüfer und Rohde, mündliche Mitteilung). Durch Einfügen von doppelten Stoppkodons in die P0-cDNA wurden die Konstrukte C1, 2 und 3 hergestellt. Die Konstrukte C4, N1, N2, N3 und N4 wurden über PCR hergestellt, das Konstrukt C1N3 wurde über PCR mit dem Konstrukt C1 als Matrize erzeugt. Alle Fragmente wurden zunächst in en Vektor pRT 101 über die Restriktionsschnittstellen *Eco* RI und *Sal* I zwischen den 35S Promotor und Terminator kloniert. Die gesamten Kassetten aus Promotor, cDNA-Insertion und Terminator wurden über die flankierenden *Hind* III Schnittstellen in den Pflanzentransformationsvektor pBin 19 gebracht. Die Richtigkeit der Konstrukte wurde durch Sequenzierung überprüft.

Die Lage der Konstrukte wurde nach den so ermittelten mutmaßlichen strukturellen Merkmalen gewählt. Das Konstrukt C1 beinhaltet eine mögliche  $\beta$ -Faltblattstruktur und endet nach einem sehr stark hydrophoben Bereich im P0 Protein. Das Konstrukt C2 erfasst zusätzlich eine  $\alpha$ -Helices, die einen stark hydrophilen Breich in dem ansonsten haupsächlich hydrophoben Protein einschließen. Dieses Konstrukt beinhaltet auch die mutmaßliche Transmembrandomäne. C3 ist um eine mögliche  $\beta$ -Faltblattstruktur erweitert. Bei C4 schließen sich weitere mutmaßliche  $\alpha$ -Helices des P0 Protein an. Die N-terminalen Verkürzungen N1, N2, N3, N4 beginnen genau an den Stellen, an denen die C-terminalen

Konstrukte gleicher Nummer enden. Sie schließen also den Bereich aus, den die C-terminal verkürzten Konstrukten umfassen (siehe Anhang 6.2, Tabelle 5).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des P0 Proteins, seiner Domänen und der hergestellten Konstrukte für die stabile Pflanzentransformation**

Mit der Aminosäuresequenz vom P0 Protein wurden Computeranalysen mit verschiedenen Programmen aus der Internetseite „PredictProtein“ (B. Rost, 1996) und dem „GCG package“ (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA) durchgeführt. Mit „Prosite motif search“ (Corpet *et al.*, 1999) ließen sich 4 mögliche Serin (S), eine Threonin (T) und eine Tyrosin (Y)-Phosphorylierungsmotive (S) mit hoher Wahrscheinlichkeit (>0,9) vorhersagen. Das Programm „ProDom“ (Corpet *et al.*, 2000) identifizierte eine Transmembranregion (TM) in Aminosäureposition 56 bis 62 mit großer Wahrscheinlichkeit. Über „PHD“ (Rost, 1996) wurde eine mögliche Sekundärstruktur ermittelt. Mit Proteinanalyseprogrammen aus dem „GCG-Package“ wurden konnten hydrophobe/hydrophile Bereiche ermittelt werden.

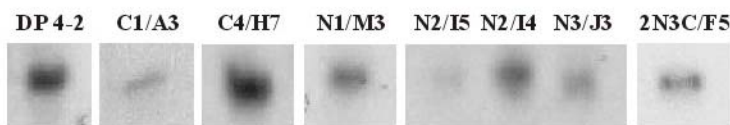
### 3.1.1.2 Herstellung und Untersuchung transgener Kartoffelpflanzen

Die oben beschriebenen P0-Konstrukte wurden mit Hilfe von Agrobakterien stabil in Kartoffelpflanzen transformiert. Die Insertion der cDNAs ins pflanzliche Genom wurde mit PCR überprüft. Die Expression der Konstrukte in den einzelnen Pflanzenlinien wurde auf

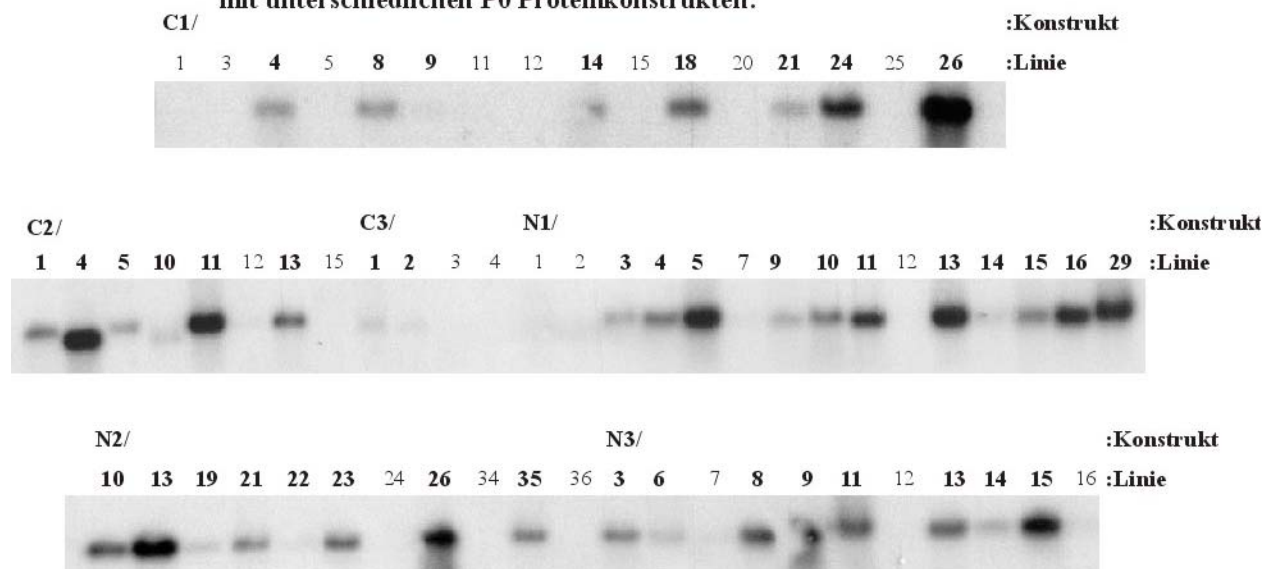


RNA-Ebene durch Northern-Blot Hybridisierungen mit einer <sup>32</sup>P-markierten P0-cDNA-Sonde. Von ersten regenerierten Transformanten wurden je 5 Linien pro Konstrukt auf dessen Expression hin untersucht. Hierbei konnte in den Linien C1/A6, C4/H7, N1/M3, N2/I4, N2/I5 und N1C3/K6 die P0-RNA nachgewiesen werden. Die Northern-Blot Hybridisierungen zeigt Abbildung 3. Jedoch konnte keine Linie erzeugt werden, welche das Volllänge P0 Protein oder das Teilkonstrukt C3 ausbildet.

**A: Pflanzenlinien aus dem ersten Set von Transformation mit unterschiedlichen P0 Proteinkonstrukten:**



**B: Pflanzenlinien aus dem zweiten Set von Transformation mit unterschiedlichen P0 Proteinkonstrukten:**



**Abbildung 3: Northern-Blot Hybridisierungen von mit verschiedenen P0 Konstrukten transformierten Kartoffelpflanzen**

Je 15 µg der gesamten RNA aus Pflanzen der verschieden Linien wurde im Northernblot mit <sup>32</sup>P markierter P0-cDNA-Sonde hybridisiert.

Daraufhin wurde eine zweite Reihe von Transformationen mit den Konstrukten P0 (Volllänge), C1, C2, C3, N1, N2 und N3 durchgeführt. Dabei fiel auf, dass nach der Transformation von C3 sich anfänglich ähnlich viele Kalli bildeten wie nach den Transformationen mit den anderen Konstrukten. Während sich allerdings aus diesen

transgenen Kalli zwischen 10 und 17 unabhängige Pflanzen generieren ließen, entwickelten sich aus dem mit C3 transformierten Kalli nur vier unabhängige Linien. Aus der Transformation vom Vollängen-P0 resultierten nur zwei Kalli, aus denen sich nur bei einem nach längerer Zeit eine Pflanze regenerieren ließ. Die Expression der Konstrukte wurde wieder auf RNA-Ebene untersucht. Durch Hybridisierungen von Northern-Blots mit 15 µg Gesamt-RNA pro Linie mit einer <sup>32</sup>P-markierter P0-cDNA-Sonde konnten für die Konstrukte C1, C2, N1, N2 und N3 jeweils mehrere exprimierende Linien gefunden werden. In den C3-transgenen Pflanzen konnte nur in zwei Linien P0-RNA nachgewiesen werden und das nur in sehr geringem Maße. Bei der P0-transgenen Pflanze konnte keinerlei P0-RNA nachgewiesen werden. Die Expression in den Pflanzenlinien der einzelnen Transformationen sind in den Northern-Blot Hybridisierungen in Abbildung 3 abgebildet.

Die Pflanzen wurden ins Gewächshaus transferiert. Der Phänotyp dieser Pflanzen wurde mit Pflanzen, die mit leerem Vektor transformiert wurden (RT14, RT15) und mit der P0-transgenen Pflanze DP 4-2b (Dirk Prüfer, unveröffentlicht) verglichen. Keine der Pflanzen, die Teilproteine von P0 exprimieren, weichen vom Phänotyp des Wildtyps ab. Keine der Linien wiesen phänotypische Merkmale einer PLRV-Infektion auf, wie sie in der ORF0-exprimierenden Linien DP 4-2b auftrat.

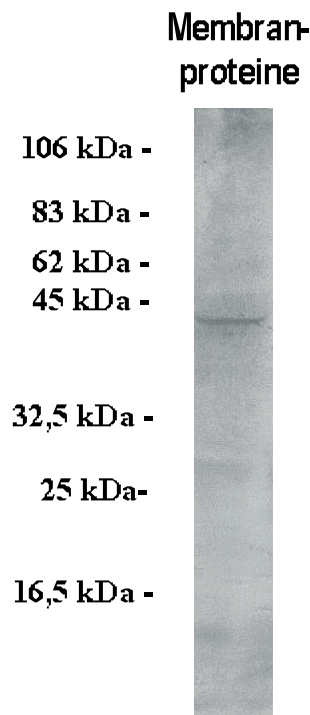
### **3.1.2 Interaktionen zwischen P0 Protein und Wirtsproteinen**

Das P0 Protein spielt eine Rolle bei der wirtsspezifischen Ausprägung von Krankheitssymptomen bei PLRV-Infektionen, wobei es zu wirtsspezifischen Wechselwirkungen mit Pflanzenproteinen kommen sollte.

Zunächst wurde in einer Interaktionssichtung einer „Two-Hybrid-cDNA-Bank“ aus Kartoffelblättern mit dem P0 Protein als „Köder“-Protein Hefekolonien nach Interaktionspartnern gesucht. Unter 10<sup>6</sup> gesichteten Kolonien waren 81 zunächst Histidin-autotroph und wurden auf neues SD-His-Leu-Trp-Mangelmedium transferiert. Hier wuchsen nur noch 40 Kolonien Histidin-unabhängig. Unter diesen waren 21 Kolonien β-Galaktosidase-positiv. Von diesen Kolonien wurden die „Ziel“-Plasmide isoliert und erneut mit dem P0 Protein in Hefe kotransformiert. Bei dieser ersten Kotransformation waren nur 12 der „Ziel“-Plasmide mit dem P0 Protein in der Lage in den Hefen sowohl Histidin-Autotrophie auszulösen als auch eine Blaufärbung beim β-Galaktosidase-Test hervorzurufen. Bei dreifachen Wiederholungen dieser Retransformationen erwiesen sich aber drei der gefundenen „Ziel“-Plasmide als selbstaktivierend, alle anderen waren im β-Galaktosidase-Test negativ. Restriktionsanalysen der gefundenen Plasmide ergaben 300 bis 1500 bp große cDNA-Insertionen. Sequenzanalysen der 12 in der ersten Kotransformation positiven Plasmide,

ergaben, dass keine der isolierten cDNAs doppelt in der Interaktionssichtung isoliert wurde. Eine der cDNAs stammte von ribosomaler RNA, alle anderen cDNAs ließ sich im Datenbankabgleich keine eindeutige Homologie zu bekannten cDNAs oder hieraus abgeleiteten Proteinen zuordnen.

Daher wurde als nächstes über „Overlay Assays“ Proteinbanden pflanzlicher Proteine dargestellt, die mit dem P0 wechselwirken. Hierbei konnte die Bindung an einem ca. 42 kDa großes Membranprotein gezeigt werden (Abbildung 4).



**Abbildung 4: „Overlay Assay“ zur Detektion von Proteinbanden aus Membranfraktionen von Kartoffelblättern, die mit dem P0 Protein interagieren**  
**50 µg Membranproteine wurden durch 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und nach Renaturierung der Proteine mit <sup>35</sup>S-markiertem P0-Translationansatz inkubiert.**

### **3.1.3 Interagieren P0 und 17kDa Protein miteinander?**

Das P0 Protein könnte als zweites Transportprotein in den Zell-zu-Zell-Transport des Virus involviert sein und hierbei Wirts- und Gewebespezifität in der Ausbreitung innerhalb der Pflanze vermitteln, wie es z.B. bei den Geminiviren vorkommt. Dies wurde z.B. von Matthews *et al.* (1992) diskutiert. Hierfür würde die Ähnlichkeiten bei der Ausbildung von Phänotypen bei Überexpression von den beiden Transportproteinen vom SqLCV („squash leaf curl virus“) in Tabak (Pascal *et al.*, 1993) sprechen. Sollte das P0 Protein neben dem 17kDa Protein am viralen Zell-zu-Zell-Transport beteiligt sein, ist eine Wechselwirkung zwischen 17kDa Protein und P0 anzunehmen.

### 3.1.3.1 Bindung von P0 an GST-17kDa-C Protein in „Overlay“- und „Pull down Assays“

Zunächst wurde die Bindung von  $^{35}\text{S}$ -markiertem P0-Translationsprodukt an GST, GST-17kDa-C Protein, GST-17kDa-C3 Protein, GST-17kDa-C4 Protein, GST-17kDa-C5 Protein (siehe hierzu auch 3.2.2.2 und 6.3) und einem nichtradioaktiver *in vitro* Phosphorylierungsansatz in einem „Overlay Assay“ untersucht. Die ans das 17kDa Protein gebundenen  $^{35}\text{S}$ -markierten P0-Proteine wurden auf Röntgenfilm dokumentiert und sind in Abbildung 5 dargestellt. P0-Translationsprodukt bindet nicht an GST, das als Negativkontrolle diente. Wohl aber wurde P0 vom GST-17kDa-C Protein gebunden. Unter den GST-17kDa-C Deletionsproteinen konnte nur noch das GST-17kDa-C5 Protein, der C-terminalen Teil vom 17kDa Protein ab der Aminosäure 72, P0-Translationsprodukt binden.

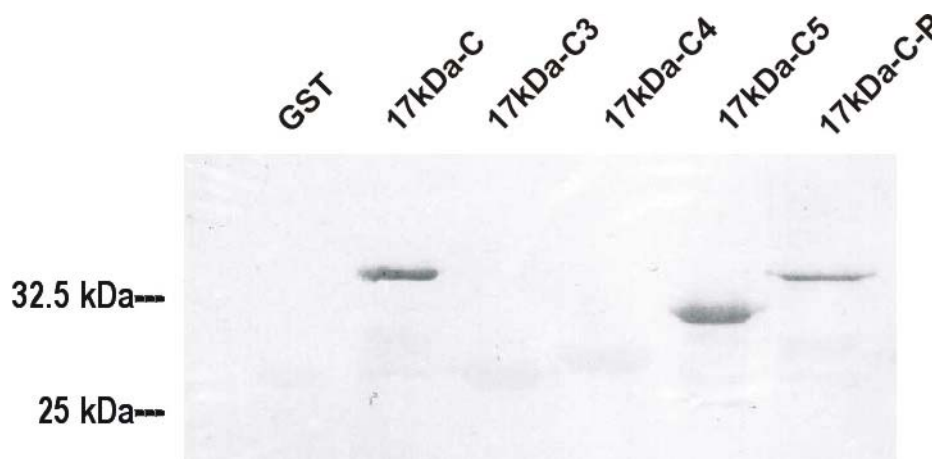
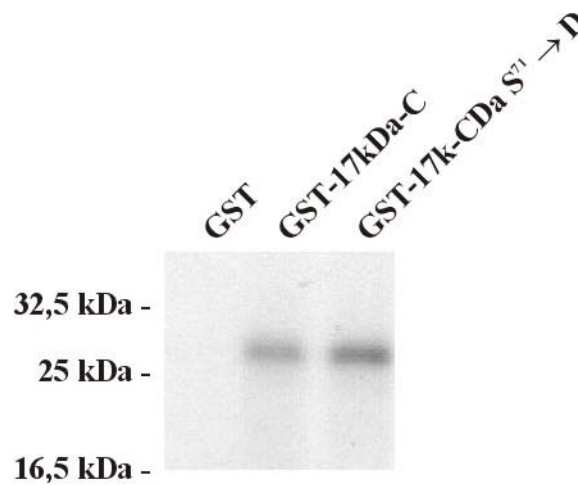


Abbildung 5: Bindung von P0 an GST-17kDa-C Protein im „Overlay Assay“

Je 5  $\mu\text{g}$  Proteine (GST, GST-17kDa-C Protein, GST-17kDa-C3 Protein, GST-17kDa-C4 Protein, GST-17kDa-C5 Protein und ein nichtradioaktiver *in vitro* Phosphorylierungsansatz mit 5 $\mu\text{g}$  GST-17kDa-C Protein) wurden durch 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und nach Renaturierung der Proteine mit 25  $\mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$ -markiertem P0-Translationansatz inkubiert.

Als nächstes wurde die Bindung von  $^{35}\text{S}$ -markiertem P0 an GST-17kDa-C Protein in „Pull down Assays“ untersucht. Hierfür wurden GST-17kDa-C Proteine und GST-17kDa-C Proteine S<sup>71</sup> • D und GST über den GST-Anteil der Proteine an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit  $^{35}\text{S}$ -markiertem P0-Translationansatz inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden von den Sepharosepartikeln durch gründliches Waschen entfernt. Gebundene

<sup>35</sup>S-markierte Proteine wurden nach Auftrennung der Ansätze auf SDS-Gelen auf Röntgenfilm abgebildet.



**Abbildung 6: Bindungen von <sup>35</sup>S-markierten Translationsprodukten von P0 Protein, an Glutathion-S-Sepharose immobilisiertes GST Protein, GST-17kDa-C Protein und GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup>•D Protein im „Pull down Assay“**

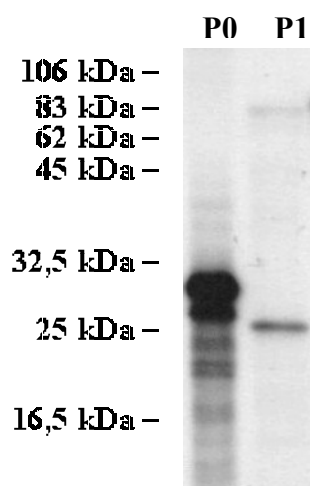
**Je 5 µg GST, GST-17kDa-C Protein, GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup>•D wurden mit 10µl <sup>35</sup>S-markiertem P0-Translationansatz inkubiert und nach abwaschen der nicht gebundenen Proteine durch 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert.**

In Abbildung 6 sieht man, dass P0 Protein an GST-17kDa-C Protein gebunden werden konnte. Die Bindung erfolgt auch ans GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup>•D erfolgen, bei dem ein Phosphoserin an der Aminosäureposition 71 durch den Austausch gegen ein Aspartat vorgetäuscht wurde.

### **3.1.3.2 Ist die Bindung von P0 an das GST-17kDa-C Protein spezifisch?**

#### **3.1.3.2.1 Beschreibung der Translationsprodukte und des GST-17kDa-C Proteins**

Der Leserahmen von der P0-cDNA enthält auch das 5'-Ende des ORF1. Das ORF0-cDNA-Fragment, das in pSP72 kloniert ist und für die *in vitro* Transkription und *in vitro* Translation verwendet wurde, kodiert neben dem P0 Protein auch für ein N-terminales P1-Teilprotein von ca. 26 kDa. Also wäre es möglich, dass in den „Overlay Assays“ keine Bindung des P0 Proteins sondern eine des P1-Teilproteins an das 17kDa Protein vorliegt.



**Abbildung 7: Translationsprodukte von P0- und P1-cDNAs**

Je 2 µl der Translationsansätze wurden durch 12,5% SDS-PAGE getrennt. Die <sup>35</sup>S-markierten Translationsprodukte wurden auf Röntgenfilm abgebildet. In Spur 1 ist der Translationsansatz von der P0-cDNA gezeigt. Die Hauptbande bei ca. 28 kDa ist das P0 Protein. Darunter erkennt man einen ebenfalls von dieser cDNA kodierten N-terminalen Teil vom P1 Protein. Spur 2 zeigt den Translationsansatz der P1-cDNA. Bei ca. 70 kDa ist das P1 Protein zu erkennen, bei 25 kDa, sieht man das P1-C25 Protein.

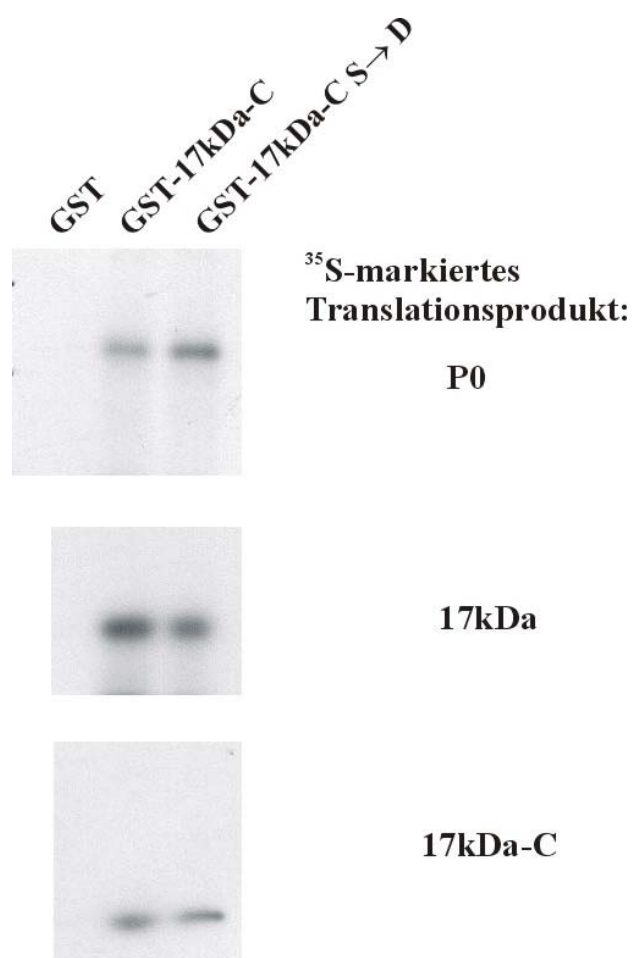
In Abbildung 7 sieht man die nebeneinander aufgetragenen Translationsprodukte von P0 und P1. Im P0-Translationsansatz erkennt man als Hauptbande bei 28kDa das P0 Protein. Unter dieser Bande sieht man als deutlich schwächere Bande das P1-Teilprodukt. Im P1-Translationsansatz erkennt man die 70kDa-Proteinbande, die dem P1 zugeordnet wird. Zusätzlich sieht man in diesem Ansatz eine 25kDa-Proteinbande. Diese Bande wird einem Spaltprodukt von P1, dem P1-C25, zugeordnet. Die kodierende Sequenz für dieses Spaltprodukt entspricht aber dem C-Terminus vom P1 Protein, der im P0 Protein nicht mehr enthalten ist.

Das 17kDa-C Protein beginnt mit Aminosäure 55 und umfasst den C-terminalen Teil. Tacke *et al.* (1993) haben die Dimerisierungsdomäne des 17kDa Proteins als ein vor dem Start des 17kDa-C-Teilproteins gelegene α-Helix charakterisiert. Da dem 17kDa-C Protein diese Domäne also fehlt, sollte ein Bindung des 17kDa- und des 17kDa-C Translationsprodukte durch das GST-17kDa-C Protein unterbleiben.

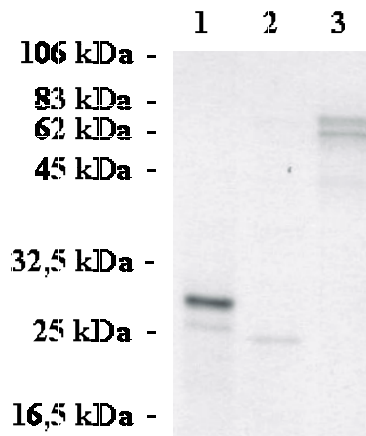
### 3.1.3.3 Kontrollassays

Um zu unterscheiden, welche der Komponenten durch das 17kDa Protein gebunden wird, wurden „Pull down Assays“ mit den P0 und P1 Translationsprodukten parallel durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit der  $\beta$ -Glukuronidase (GUS) als  $^{35}\text{S}$ -markiertes Translationsprodukt (Abbildung 9).

Die Bindung von 17kDa und 17kDa-C Translationsprodukten an des GST-17kDa-C Protein wurde als Negativkontrolle parallel durchgeführt. Die „Pull down Assays“ mit den verschiedenen aufgeführten Translationsprodukte wurden nicht nur mit GST-17kDa-C Protein, GST-17kDa-C Protein  $\text{S}^{71}\cdot\text{D}$  (siehe hierzu auch 3.2.2.1, 3.2.2.4 und 6.3), sondern auch mit dem GST durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 und 9 dargestellt.



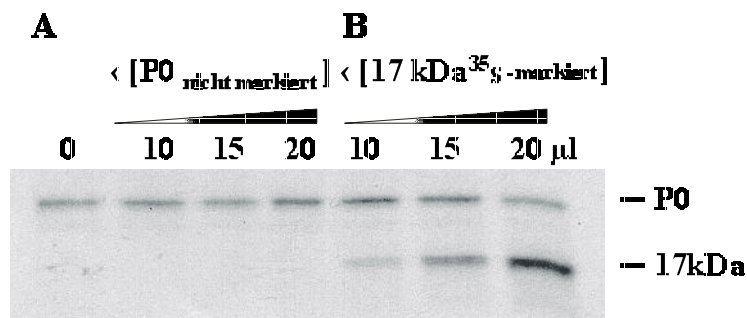
**Abbildung 8:** Bindungen von  $^{35}\text{S}$ -markiertem P0-Translationsprodukt, 17kDa- und 17kDa-C-Translationsprodukten an die an Glutathion-Sepharose immobilisiertes GST, GST-17kDa-C Protein und GST-17kDa-C Protein  $\text{S}^{71}\cdot\text{D}$  Protein im „Pull down Assay“ Je  $5\ \mu\text{g}$  GST, GST-17kDa-C Protein, GST-17kDa-C Protein  $\text{S}^{71}\cdot\text{D}$  wurden mit  $10\ \mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$ -markiertem P0-Translationansatz inkubiert und nach abwaschen der nicht gebundenen Proteine durch 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt.



**Abbildung 9:** Bindungen von  $^{35}\text{S}$ -markierten P0-(Spur 1), P1- bzw. P1-C25-(Spur 2) und GUS- (Spur 3) Translationsprodukten an Glutathion-Sepharose-immobilisiertes GST, GST-17kDa-C Protein und GST-17kDa-C Protein  $\text{S}^{71}\bullet\text{D}$  Protein im „Pull down Assay“ Je  $5\ \mu\text{g}$  GST, GST-17kDa-C Protein, GST-17kDa-C Protein  $\text{S}^{71}\bullet\text{D}$  wurden mit  $10\ \mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$ -markiertem P0-Translationansatz bei einer NaCl-Konzentration von 150 mM inkubiert und nach abwaschen der nicht gebundenen Proteine mit einer Salzkonzentration von 300 mM NaCl in PBS gewaschen durch 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt.

In beiden Experimenten, die in Abbildung 8 und 9 gezeigt sind, wurde keines der Translationsprodukte durch das GST gebunden. An die GST-17kDa-C Proteine banden alle  $^{35}\text{S}$ -markierten Proteine. Der Austausch von  $\text{S}^{71}$  gegen D hatte auf die Bindungseigenschaften von 17kDa Protein keinerlei Einfluss.

Als nächstes wurde versucht, die Bindung von  $^{35}\text{S}$ -markiertem P0 durch unmarkiertes P0 und durch  $^{35}\text{S}$ -markiertes 17kDa Protein zu kompetitieren. Bei diesem Experiment wurde die Salzkonzentration im Waschpuffer erhöht, um den Hintergrund durch unspezifische Bindungen herabzusetzen.



**Abbildung 10:** „Pull down“ Experiment: Konkurrenz der Interaktion zwischen 17kDa Protein und  $^{35}\text{S}$ -markiertes P0 Protein durch unmarkiertes P0 Protein und  $^{35}\text{S}$



### **markiertes 17kDa Protein**

**In allen Ansätzen wurden 15 µg GST-17kDa-C Protein mit 10 µl P0-Translationsprodukte inkubiert. Der in Spur 0 gezeigten Probe wurden keine weiteren Zusätze gemacht. In A waren den Ansätzen 5, 10 oder 20 µl nicht markiertes P0-Translationsprodukt beigefügt. In B waren hingegen den Ansätzen 5, 10, und 20 µl bei gleichem Gesamtvolumen zugesetzt. Statt wie zuvor bei 150 mM NaCl wurden die Bindungsreaktionen bei 300 mM NaCl im Bindungspuffer durchgeführt, die Salzkonzentration im Waschpuffer wurde auf 350 mM NaCl erhöht.**

Abbildung 10 zeigt das Ergebnis der Wettbewerbsversuche. Als erstes ließ sich feststellen, dass sich die Bindungen durch die hohe Salzkonzentration nicht inhibieren lässt. Im Wesentlichen zeigte sich aber, dass die Bindung von P0 an das 17kDa Protein nicht durch unmarkiertes P0 kompetitiert werden kann, wohl aber durch die Zugabe von <sup>35</sup>S-markiertem 17kDa Protein.

Zusätzlich wurde ein „Overlay Assay“ mit Extrakten gesamter Proteine aus *E. coli* durchgeführt, die GST-P0-Fusionsprotein und GST-17kDa-Vollängenprotein exprimierten. Parallel wurden gleiche Blots mit <sup>35</sup>S-markiertem P0 Protein und mit <sup>35</sup>S-markiertem 17kDa Protein beprobt. Hierbei ließ sich keine Interaktion detektieren (ohne Abbildung).

## 3.2 Studien über die Phosphorylierung vom 17kDa Protein

### 3.2.1 Erzeugung von mutierten 17kDa Protein

#### 3.2.1.1 Phosphorylierungsmotive im 17kDa Protein

Wie in der Einleitung beschrieben wird das von ORF4 kodierte RNA-Transportprotein 17kDa Protein im C-terminalen Teil von einer membranständigen Serin/Threonin-Kinase phosphoryliert. Diese Kinase hat Eigenschaften einer Proteinkinase des Typ C (PKC) aus tierischen Zellen und Hefen (Sokolova *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Aminosäuresequenz vom 17kDa Protein nach Phosphorylierungsmotiven durchsucht, wie sie von PKCs genutzt werden (Hanks und Quinn, 1991). Diese Motive sind in der Tabelle 4 aufgeführt und wurden mit den Motiven im 17kDa Protein verglichen. Hiernach besitzt das 17kDa Protein 7 Serine, die Bestandteile dieser Phosphorylierungsmotive sind. Daneben wurden auch 2 Threonine gefunden, die eventuelle Ziele einer Phosphorylierung durch PKCs sein könnten.

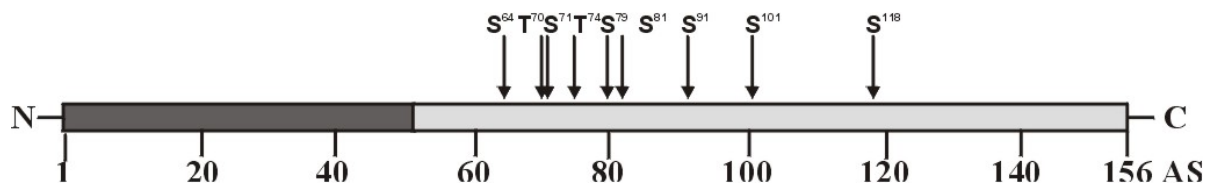
Phosphorylierungskonsensusmotive von PKCs	Gefundene Phosphorylierungsmotive
[S/T]X[K/R]	S <sup>81</sup> (SGR), T <sup>74</sup> (TPK), S <sup>118</sup> (SAR), S <sup>101</sup> (SIR)
[K/R]XX[S/T]	S <sup>71</sup> (RTTS), S <sup>79</sup> (KEVS)
[K/R]XX[S/T]X[K/R]	-
[K/R]X[S/T]	S <sup>64</sup> (RHS), T <sup>70</sup> (RTT), S <sup>91</sup> (RHS)
[K/R]X[S/T] X[K/R]	-

**Tabelle 4: Gegenüberstellung von in 17kDa Protein gefundenen PKC-Phosphorylierungsmotiven mit den in der Literatur angegebenen Motiven (Hanks und Quinn (1991))**

**Bei den im 17kDa Protein gefundenen Motiven sind erst die Zielaminosäuren (z.B S<sup>81</sup>) angegeben, die gefundene Sequenz ist dann in Klammern aufgeführt. Die in den Motiven wahrscheinlichen Phosphorylierungsziel sind fettgedruckt dargestellt.**

Die Lage dieser mutmaßlich an einer Phosphorylierung beteiligten Serine und Threonine sind in der Abbildung 11 dargestellt. Die Serine an den Aminosäurepositionen 101 und 118 sind allerdings in einem Teil des Proteins lokalisiert, der durch eine aus Rattenhirn isolierten PKC phosphoryliert werden konnte (Sokolova *et al.*, 1997). Der Teil, in dem diese beiden Serine liegen, wird jedoch anscheinend nicht von Kartoffelmembranfraktionen phosphoryliert. Im N-

terminalen Teil des 17kDa Proteins, der in der Abbildung in Dunkelgrau dargestellt wurde, konnten keine solche Motive gefunden werden. Somit sind die meisten der gefundenen mutmaßlichen Phosphorylierungsmotive in dem Teil des Proteins zu finden, der, wie in der Literatur beschrieben (Sokolova *et al.*, 1997), von einer membranständigen Serin-/Threonin-Kinase vom Typ einer PKC phosphoryliert wird.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung vom 17kDa Protein**

**Lage der mutmaßlichen Phosphorylierungsmotive sind durch Pfeile mit darüber stehender Angabe der Aminosäure angegeben.**

**Dunkelgrau: N-Terminale Teil vom 17kDa Protein mit Dimerisierungsdomäne**

**Hellgrau: C-terminaler Teil vom 17kDa Protein mit RNA-Bindungsdomäne. Dieser Teil wurde als GST-Fusionsprotein (GST-17kDa-C Protein) exprimiert.**

### 3.2.1.2 Herstellung von S•A mutierten 17kDa Protein

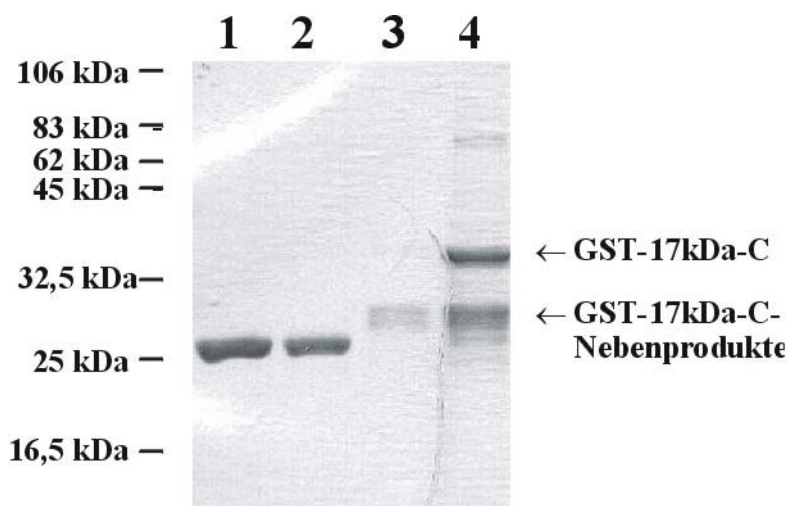
Als erstes stellte sich also die Frage, welches oder welche dieser vielen Motive tatsächlich durch die beschriebene Kinase phosphoryliert wird bzw. werden. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein „Alanin-Scanning“ durchgeführt, wie es auch im RNA-Transportprotein vom TMV durchgeführt wurde (Citovsky *et al.*, 1993, Waigmann *et al.*, 2000). Zunächst wurde die cDNA-Sequenz so verändert, dass die Sequenz statt für Serin oder Threonin jeweils für Alanin kodiert. Dabei wurde jeweils nur ein Serin oder Threonin ausgetauscht. Zusätzlich wurden die Serine S<sup>64</sup>, S<sup>79</sup> und S<sup>91</sup> gleichzeitig gegen Alanine ausgetauscht. Die cDNAs wurden wie unter 2.2.4.10.1 beschrieben verändert und der für den C-terminalen Teil des Proteins (in Abbildung 11 in Hellgrau dargestellt) hinter die für die GST kodierende Sequenz im Vektor pGEX 5X-1 zwischen die Schnittstellen von *Eco* RI und die *Sal* I des Vektors kloniert. Die Restriktionsschnittstellen der cDNA-Fragmente stammen im Fall von S<sup>64</sup>, S<sup>71</sup>, S<sup>79</sup>, S<sup>81</sup>, S<sup>91</sup> und S<sup>118</sup> aus dem Mutagenesevektor pAlter. In den anderen Fällen, in denen die Mutagenesen über PCR erzeugt wurden, wurden die Schnittstellen über die für die PCRs benutzen „Randprimer“ an die cDNA-Fragmente maßgerecht angefügt. Es wurde nur der für den C-Terminus kodierende Teil des 17kDa Proteins benutzt, weil sich wie

bei Sokolova *et al.* (1997) beschrieben eine GST-Fusion mit dem Gesamtprotein nicht aufzureinigen ließ.

Die 17kDa Proteine, bei denen die Serine bzw. Threonine gegen Alanin ausgetauscht wurden, heißen wie folgt: Als Volllängenprotein: 17kDa Protein S<sup>z.B 61</sup> • A, als C-terminales Teilprotein: 17kDa-C Protein S<sup>z.B 61</sup> • A. Wurde an dieses als C-terminales Teilprotein N-terminal ein GST angefügt, wurden die entsprechenden Konstrukte als GST-17kDa-C Protein S<sup>z.B 61</sup> • A bezeichnet. Eine Tabelle aller für Phosphorylierungsexperimente hergestellten 17kDa Proteinkonstrukte befindet sich im Anhang 6.3, Tabelle 6.

### 3.2.1.3 Expression von GST-17kDa-C Proteinen in *E. coli*

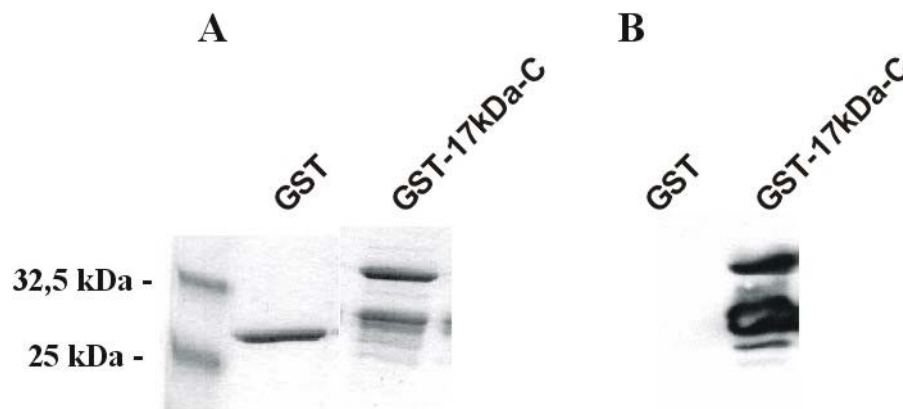
Die hergestellten Konstrukte wurden in BL 21 (DE)-Zellen überexprimiert und aufgereinigt. Die Abbildung 12 zeigt eine solche Aufreinigung am Beispiel des GST ohne Fusionsanteil und des GST-17kDa-C Proteins.



**Abbildung 12: Aufreinigung von in *E.coli* exprimiertem GST und GST-17kDa-C Protein. Spuren 1 und 3: Je 20 µl von den Sepharosepartikeln eluiertes GST (Spur 1) und GST-17kDa-C Protein (Spur 3)  
Spuren 2 und 4: Je 20 µl nach der Elution an der Sepharose gebliebenen GST Protein (Spur 2) und GST-17kDa-C Protein (Spur 4)**

Während sich das GST-Protein allein sauber, in großer Menge und ohne Abbau- oder Abbruchprodukte reinigen ließ, wurden bei den GST-17kDa-C Protein nicht nur die ca. 35 kDa großen Fusionsprotein in ganzer Länge isoliert, sondern auch kleinere Proteine.

Ein Nachweis mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen das 17kDa Protein im Western-Blot (Abbildung 13) zeigte, dass es sich bei den kürzeren Proteinen um Abbau- oder Abbruchprodukte der GST-17kDa-C Proteine handelte.



**Abbildung 13: Gereinigtes GST und GST-17kDa-C Protein**

**Je 5 µg der Proteine wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und in A: Coomassie blau gefärbt und in B: auf einem Western Blot mit einem Anti 17kDa-Antikörper immundekoriert.**

Ein Vergleich der DNA-Sequenz mit Kodons, die in Pflanzen aber in *E. coli* nur selten oder gar nicht benutzt werden, dass sich in der DNA-Sequenz für das 17kDa Protein zahlreiche solcher seltenen Kodons finden lassen. Die Bakterien können diese Kodons nicht oder nur schwer bei der Aminosäuresynthese „übersetzen“, weil ihnen die nötigen tRNAs fehlen. An solchen nichtlesbaren Stellen kann es zum Abbruch der Proteinsynthese kommen. Der Bakterienstamm „BL21 (DE3) Codon Plus RP“ ist so verändert, dass er auch die für solche seltenen Kodons die passenden tRNAs besitzt und seltene Kodons in Proteine translatieren kann. Eine Expression in diesen Zellen zeigte aber nur wenig Steigerung des Anteil des in voller Länge exprimierten GST-17kDa-C Protein im Verhältnis zu den Abbruchprodukten. Im Vergleich zur Expression in den BL21 (DE3)-Zellen wurde aber sehr viel weniger Protein hergestellt. Deshalb wurden die Abbruchprodukte in Kauf genommen und zur Proteinexpression der Bakterienstamm BL 21 (DE3) benutzt.

Die Abbildung 12 zeigt ein weiteres Problem bei der Aufreinigung von GST-17kDa-C. Das GST lässt sich leicht durch das reduzierte Glutathion von den Sepharosepartikeln ablösen. Hingegen verbleibt der Grossteil des GST-17kDa-C Proteins an den Sepharosepartikeln. Nur die Abbruchprodukte ließen sich zu einem großen Teil von den Partikeln lösen. Auch der Einsatz höherer Glutathionkonzentrationen, DTT, längeren Elutionszeiten oder höheren Elutionstemperaturen änderten nichts daran, dass das Protein zu einem großen Teil an den Partikeln verblieb.

Es wurde versucht, den GST-Teil, über den die Bindung an die Glutathion-Sepharose erfolgte, durch die Protease „Faktor X“ abzuspalten. Allerdings blieb auch in diesen Fällen das 17kDa-C Protein an den Sepharosepartikeln unspezifisch gebunden.

Wenigstens ließ sich ein Teil der Abbruchprodukte abwaschen und so der Anteil an Vollängen-GST-17kDa-C Protein in den gereinigten Sepharosepartikelfractionen erhöhen. Außerdem zeigten erste Phosphorylierungsexperimente, dass die Bindung der Proteine an die Sepharose bei der Phosphorylierung wenig störten. Aus diesen Gründen wurden für die *in vitro* Phosphorylierungsexperimente die an die Sepharose gebundenen GST-17kDa-C Proteine nach dreimaliger Elution der Abbruchprodukte verwendet.

Wie oben erwähnt kann das Protein auch von nichtpflanzlichen Kinasen, wie z.B. aus Rattenhirn isolierter PKC phosphoryliert werden. Deswegen musste als nächstes gezeigt werden, ob das in den Bakterien produzierte GST-17kDa-C Protein an einer der zu untersuchenden Motive von bakteriellen Kinasen phosphoryliert wird. Deswegen wurden die bakteriell erzeugten GST-17kDa-C Proteine mit einem Anti-Phosphoserin-Antikörper im Western-Blot untersucht. Phosphorylierte Serine konnten so nicht nachgewiesen werden. Deswegen konnten die in Bakterien produzierten Proteine im Weiteren für Phosphorylierungsexperimente benutzt werden.

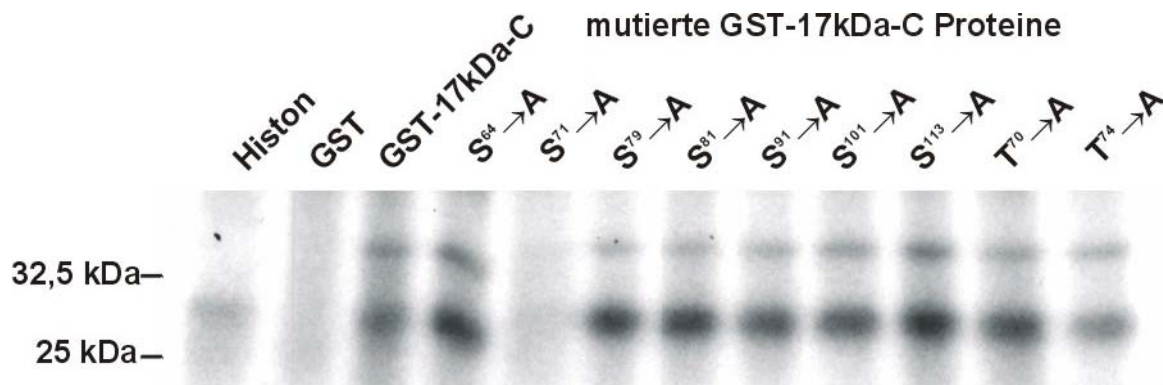
### **3.2.2 *In vitro* Phosphorylierungsstudien**

#### **3.2.2.1 Phosphorylierungen von GST-17kDa-C Protein S•A-Austauschmutanten**

Die in den Bakterien exprimierten und aus ihnen isolierten GST-17kDa-C Proteine wurden mit Membranfraktionen aus Kartoffelblättern in Anwesenheit von [ $\gamma$   $^{32}$ P]-ATP inkubiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel getrocknet und radioaktiv markierte Proteine auf Röntgenfilm detektiert. Werden Proteine in diesen Ansätzen phosphoryliert, wird ein radioaktives Phosphat aus dem [ $\gamma$   $^{32}$ P]-ATP in das Protein eingebaut und das Protein auf diese Weise radioaktiv markiert. Als Positivkontrolle für die Serin/Threonin-Kinase Aktivität in den Membranfraktionen wurde in einem Ansatz Histon mit den Kartoffelmembranen inkubiert. Als Negativkontrolle diente GST, das nicht phosphoryliert wird. Die Proteinmengen wurden vor den Experimenten photometrisch gemessen und auf gleiche Mengen äquilibriert. Die eingesetzten Proteinmengen wurden durch Anfärben der Proteingele mit Coomassie Blau überprüft. Da in den Ansätzen der Gehalt an GST-17kDa-C Protein in der gesamten Länge aufgrund unterschiedlicher Anteile an Gesamtproteinen und

Abbauprodukten (siehe oben) variierte, wurde darauf verzichtet, die Phosphorylierungsaktivität in den verschiedenen Ansätzen miteinander zu vergleichen.

Als erstes wurde die Phosphorylierung der mutierten Proteine, in denen je ein Serin bzw. Threonin gegen ein Alanin ausgetauscht wurden war, im Vergleich zum ursprünglichem GST-17kDa-C Protein untersucht. Das Ergebnis sieht man in Abbildung 14. Alle mutierten Proteine sowie das native Protein werden durch die in der Kartoffelmembranfraktion enthaltenen Proteinkinase phosphoryliert mit Ausnahme des GST-17kDa-C Proteins S<sup>71</sup>•A. Der Austausch von Serin<sup>71</sup> gegen ein Alanin führt zum totalen Verlust der Phosphorylierung im 17kDa Protein. Hingegen führen Alaninaustausche in der direkten Umgebung dieses Serin<sup>71</sup>, wie zum Beispiel der Austausch von Threonin<sup>70</sup>, Threonin<sup>74</sup>, Serin<sup>64</sup> und Serin<sup>79</sup>, zu keinem Verlust der Phosphorylierbarkeit. Auch ein gleichzeitige Austausch der drei Serine<sup>64</sup>, <sup>79</sup> und <sup>91</sup> beeinträchtigte die Phosphorylierung nicht.



**Abbildung 14: *In vitro* Phosphorylierungen des GST-17kDa-C Proteins und der mutierten GST-17kDa-C Proteine S•A durch Membranfraktionen aus Kartoffelblättern**  
**Phosphorylierungen von Histon bzw. GST dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Je 5 µg Histon H1 Typ III-S, GST oder GST-17kDa-C Proteine wurden durch 10 µg Membranproteine phosphoryliert.**

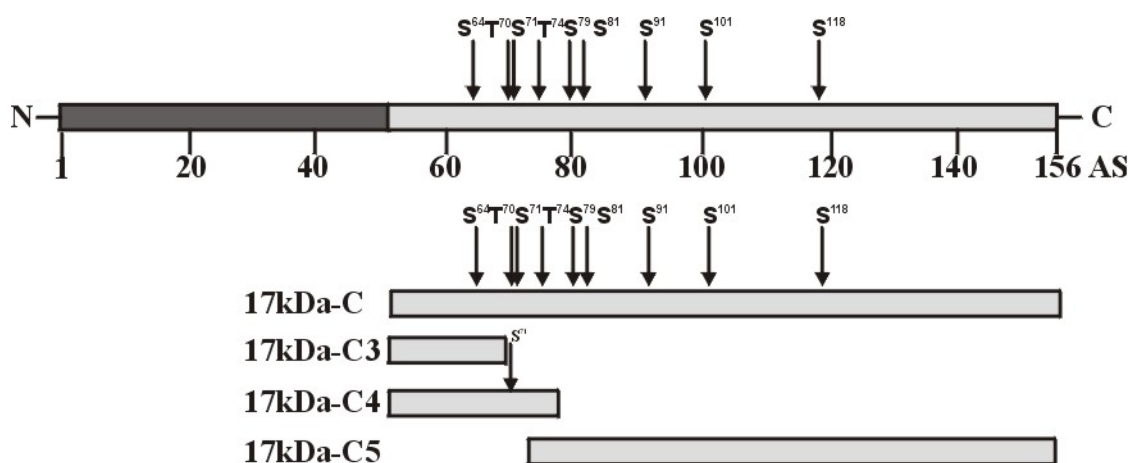
Bislang wurden die Experimente mit Membranfraktionen aus nicht PLRV-infizierten Kartoffelblättern durchgeführt. Deswegen wurden nun untersucht, ob sich die Kinase in PLRV-infiziertem Material und nicht infiziertem Material gleich verhalten. Hierfür wurden die Eluate von nativen GST-17kDa-C Protein und GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup>•A mit Membranfraktionen aus PLRV-infiziertem und nicht infiziertem Material phosphoryliert. Auch wurde die Stimulierbarkeit der in den Membranfraktionen enthaltenen Kinase durch Calcium untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die in PLRV-infizierten und

die in den gesunden Blättern gefundenen Kinaseaktivität nicht unterscheiden. Auch bei Untersuchung der Kinaseaktivität bei den anderen S • A-Austauschmutanten konnte kein Unterschied zwischen Membranfraktion infizierter und nicht infizierter Blätter festgestellt werden. In beiden Fällen ist die Kinaseaktivität Calcium-abhängig und der Serin<sup>71</sup> • Alanin-Austausch verhindert die Phosphorylierung. Daher ist es wahrscheinlich, dass die membranständige Kinase, welche das 17kDa Protein phosphoryliert, unabhängig von einer Virusinfektion gebildet wird.

### 3.2.2.2 Phosphorylierungen von GST-17kDa-Teillängenproteinen

Im Weiteren wurden Experimente unternommen, die klären sollen, ob *in vitro* tatsächlich das Serin<sup>71</sup> die alleinige Phosphorylierungsstelle für die membranassoziierte Kinase gesunder oder infizierter Kartoffelblätter ist. Dafür wurden als erstes Teillängenkonstrukte über PCR oder Primerannealing hergestellt und wie bereits oben beschrieben in pGEX 5X-1 kloniert und als N-terminale GST-Fusionsproteine expremiert und gereinigt. Dabei ließen sich die Proteine mit den kurzen Fusionsanteil (GST-17kDa-C3 Protein und GST-17kDa-C4 Protein) leicht reinigen und von der Sepharose eluieren, während bei dem Konstrukt GST-17kDa-C5 Protein die bereits beschriebenen Schwierigkeiten mit Abbruchproteinen auftraten.

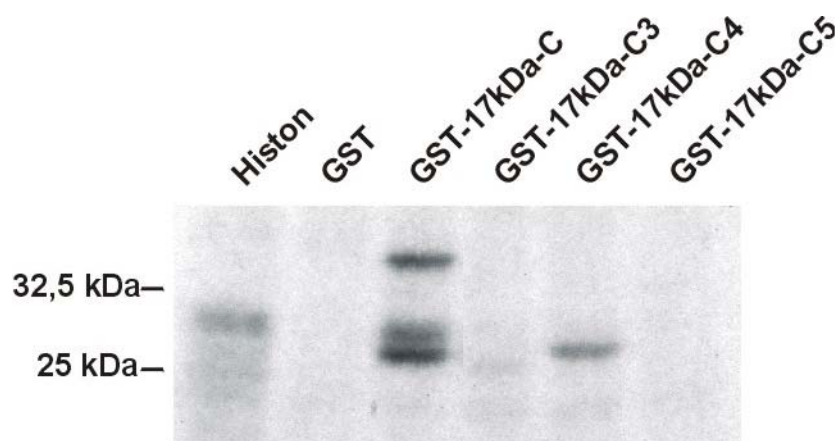
Folgende Teillängenkonstrukte wurden hergestellt: 17kDa-C3 Protein reicht von Aminosäure 55 bis direkt vor das Serin<sup>71</sup>, 17kDa-C4 Protein von Aminosäure 55 bis vor das Serin<sup>79</sup>, als nächstes Serin eines Phosphorylierungsmotives, und im Fall von Konstrukt 17kDa-C5 Protein umfasst den Teil des 17kDa Proteins von der Aminosäure 72 bis zum Ende des Proteins. Also kodiert nur das Konstrukt 17kDa-C4 Protein für das Phosphorylierungsmotiv um S<sup>71</sup>. Die beiden anderen Motive schließen dies Motiv aus (siehe Anhang 6.3, Tabelle 6). Die Lage der Teillängenkonstrukte wird in Abbildung 15 dargestellt.





**Abbildung 15: Schema vom 17kDa Protein und der Lage der hergestellten 17kDa Deletionsproteine 17kDa-C, 17kDa-C3, 17kDa-C4, 17kDa-C5, die als GST-Fusionproteine (GST-17kDa-C, GST-17kDa-C3, GST-17kDa-C4, GST-17kDa-C5) exprimiert wurden.**

Die hergestellten Teillängenproteine wurden wie oben beschrieben mit Membranproteinfraktionen inkubiert und die Phosphorylierung durch die in dieser Fraktion enthaltenen Kinase wie oben untersucht. Als Positivkontrolle diente diesmal das ursprüngliche GST-17kDa-C Protein zusätzlich zum Histon, als Negativkontrolle wurde wieder das GST verwendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 dargestellt. Auch das GST-17kDa-C3 Protein ist sehr schwach radioaktiv markiert. Das Teillängenprotein GST-17kDa-C4 Protein weist nach Inkubation mit Membranproteinen eine deutliche sehr starke Phosphorylierung auf. Dieses Teillängenprotein beinhaltet das Serin<sup>71</sup>-Phosphorylierungsmotiv.



**Abbildung 16: *In vitro* Phosphorylierungen des GST-17kDa-C Proteins und der GST-17kDa-C Deletionsproteine GST-17kDa-C3, GST-17kDa-C4 und GST-17kDa-C5 durch Kartoffelmembranfraktionen**

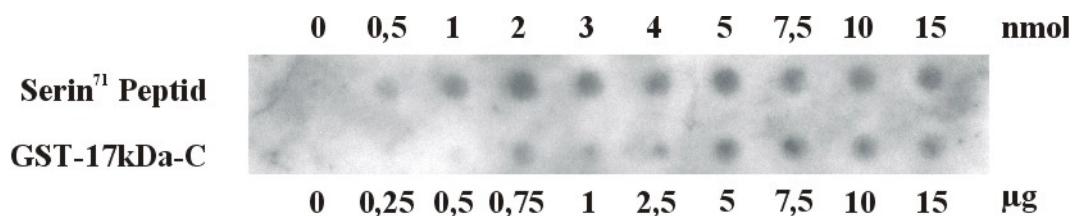
**Phosphorylierungen von Histon H1 Typ III-S bzw. GST dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Je 5 µg Histon, GST oder GST-17kDa-C Proteine wurden durch 10 µg Membranproteine phosphoryliert.**

Allerdings enthält das Konstrukt 17kDa-C4 Protein zusätzlich auch die Motive um Serin<sup>63</sup>, Threonin<sup>70</sup> und Threonin<sup>76</sup>. Deswegen wurde ein Teillängenkonstrukt hergestellt, dass nur den Bereich zwischen Aminosäure 65 und 78 in Fusion mit dem GST kodiert. Durch Anhängen

dieses kurzen Peptides an das GST lässt sich das Protein durch die Kartoffelmembranen phosphorylieren.

### 3.2.2.3 Phosphorylierung von einem 17kDa Peptid

Es wurde ein Peptid über den Bereich zwischen Aminosäure 65 und 78 synthetisiert. Auf die Wahl eines kleineren Bereichs wurde verzichtet, um den Kontext, in dem dieses Serin steht, aufrecht zu erhalten. Das Peptid wurde mit einer Dot-Blot-Apparatur neben GST-17kDa-C Protein in verschiedenen Konzentrationen auf Nitrozellulosemembran gedotet. Die Membran wurde mit Membranproteinfraction in Anwesenheit von  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  inkubiert, anschließend gewaschen und das Ergebnis auf Röntgenfilm dokumentiert (Abbildung 17). Das Serin<sup>71</sup>-Peptid lässt sich auf der Nitrozellulosemembran durch die Kinase in der Membranfraktion phosphorylieren.



**Abbildung 17: *In vitro* Phosphorylierungen vom Serin<sup>71</sup> Peptid und GST-17kDa-C Protein**

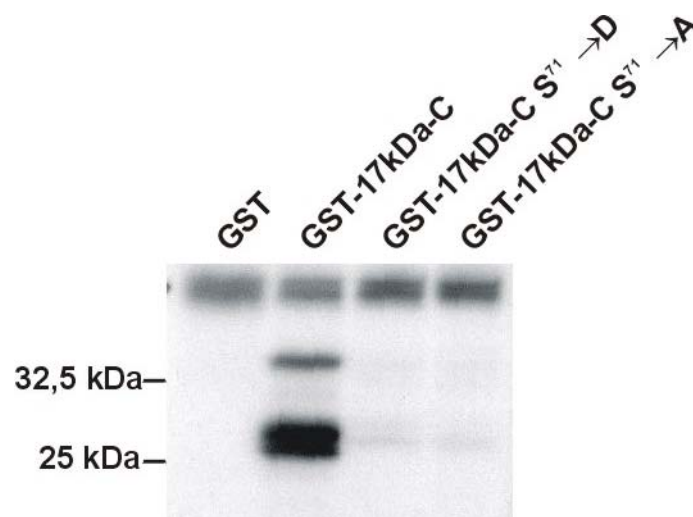
**Verschiedene Konzentrationen von Serin<sup>71</sup> Peptid und GST-17kDa-C Protein wurden auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht und anschließend mit Membranproteinen aus Kartoffelblättern phosphoryliert.**

### 3.2.2.4 Phosphorylierung eines S<sup>71</sup>→D veränderten 17kDa Proteins

Alle Phosphorylierungsexperimente von mit den S•A-Mutanten oder den verschiedenen Deletionsmutanten vom 17kDa Protein weisen darauf hin, dass Serin<sup>71</sup> *in vitro* als einziges der möglichen Ziele einer Proteinkinase genutzt wird. Nun kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass diese Ergebnisse auf Änderungen der Proteinkonformation aufgrund der vorgenommenen Veränderungen des Proteins zustande kommen. Auch kann es sein, dass sich ein an der Position 71 phosphoryliertes 17kDa Protein anders verhält als das nicht phosphorylierte Protein. Es kann zum Beispiel auch nicht ausgeschlossen, dass erst die Phosphorylierung dieses einen Motivs eine Folgephosphorylierung an anderen Stellen nach sich ziehen kann.

Aspartat ist unter physiologischen Bedingungen fast immer negativ geladen und verhält sich ähnlich wie ein Phosphoserin. Deswegen wird es oft in Experimenten mit mutagenisierten Proteinen genutzt, um ein phosphoryliertes Serin zu simulieren (Waigmann *et al.*, 2000).

Das für Serin<sup>71</sup> codierende Triplet TCA wurde in das für Aspartat codierende Triplet GAC über PCR ausgetauscht und das cDNA-Fragment wieder als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt. Das GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup> • D wurde wie zuvor in *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten mit Kartoffelmembranfraktionen eingesetzt. In Abbildung 18 ist das Ergebnis dargestellt: Neben Phosphorylierungsansätzen mit GST (Negativkontrolle), GST-17kDa-C Protein und GST-17kDa-C Protein-S<sup>71</sup> • A wurde ein Phosphorylierungsansatz mit GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup> • D auf dem SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert. Das GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup> • D lässt sich durch Kartoffelmembranproteine nicht mehr phosphorylieren.



**Abbildung 18: *In vitro* Phosphorylierungen des GST-17kDa-C Proteins und der mutierten GST-17kDa-C Proteine GST-17kDa-C S<sup>71</sup> • D und GST-17kDa-C S<sup>71</sup> • A durch Kartoffelmembranfraktionen**

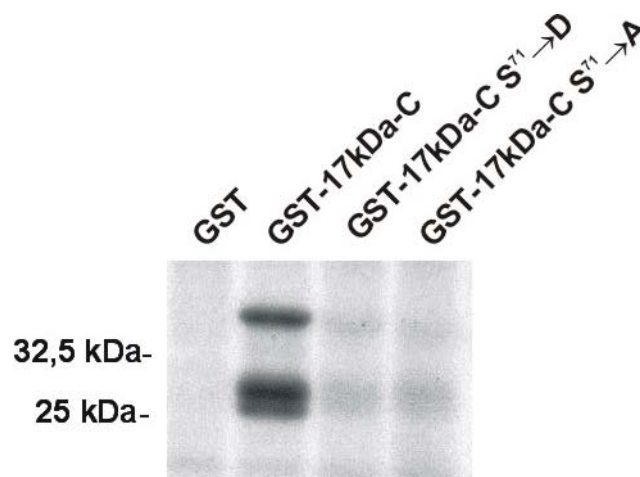
**Die Phosphorylierung von GST diente als Negativkontrolle. Je 5 µg GST oder GST-17kDa-C Proteine wurden durch 10 µg Membranproteine inkubiert.**

Dieser Arbeit vorangegangene Studien zeigten, dass das PLRV-17kDa Protein von einer membranassoziierten Serin-/Threonin-Kinase phosphoryliert wird, die Eigenschaften von PKCs aufweist (Sokolova *et al.*, 1997). Innerhalb des 17kDa Proteins ließen sich sieben Serine und zwei Threonine finden, die Bestandteil möglicher PKC-Phosphorylierungsmotive darstellen.

Die Verwendung von Deletionsmutanten, S • A- und S • D-Mutanten sowie von einem synthetisiertem Peptid in Phosphorylierungsexperimenten zeigten, dass *in vitro* das Serin<sup>71</sup> das einzige Ziel einer in der Membranfraktion enthaltenen Proteinkinase ist.

### 3.2.3 Phosphorylierungen mit verschiedenen Zellfraktionen

Bislang wurde nur die Phosphorylierung des 17kDa Proteins durch Kartoffelmembranfraktionen untersucht. Andere Zellfraktionen wurden nicht auf ihre Phosphorylierungaktivität auf das 17kDa Protein untersucht. Für das Transportprotein vom TMV konnte z.B. eine an der Zellwand assoziierte Serin-/Threonin-Kinase nachgewiesen werden, die dieses Transportprotein phosphoryliert (Citovsky *et al.*, 1993). Da das 17kDa Protein an den Plasmodesmata lokalisiert (Schmitz *et al.*, 1997) ist und Zellwand- und Zellmembranfraktionen ein Anteil von plasmodesmalen Proteinen gemeinsam ist, könnte in einer Zellwandfraktion Kinaseaktivität für die Phosphorylierung des 17kDa Proteins zu finden sein. Darüber hinaus könnte das 17kDa Protein durchaus auch für lösliche Kinasen erreichbar sein und von ihnen phosphoryliert werden. Deswegen wurden zunächst Zellmembranfraktion und lösliche Proteine wie unter 2.2.6.3 beschrieben und Zellwandfraktionen wie unter 2.2.6.4 beschrieben hergestellt und dann mit den in *E. coli* erzeugten und gereinigten GST-17kDa-C Proteinen für *in vitro* Phosphorylierungsversuche eingesetzt.

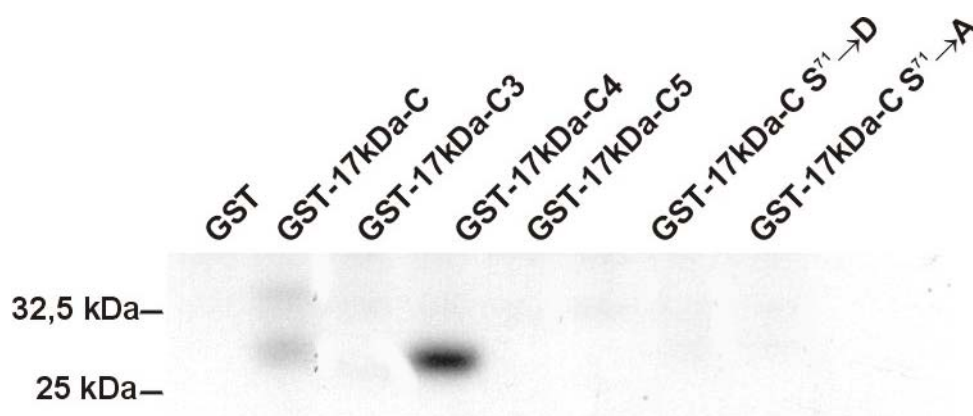


**Abbildung 19: *In vitro* Phosphorylierungen des GST-17kDa-C Proteins und der mutierten GST-17kDa-C Proteine GST-17kDa-C S<sup>71</sup> • D und GST-17kDa-C S<sup>71</sup> • A durch Fraktionen löslicher Proteinextrakte**

**Die Phosphorylierung von GST diente als Negativkontrolle. Je 5 µg GST oder GST-17kDa-C Proteine wurden durch 10 µg lösliche Proteine phosphoryliert.**

Abbildung 19 zeigt die Phosphorylierungen von GST, GST-17kDa-C Protein, GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup>•D und GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup>•A mit löslichen Proteinfractionen gezeigt. Auch mit einer Fraktion löslicher Proteine konnte das GST-17kDa-C Protein phosphoryliert werden. Während die Membranfraktion die in der Aminosäureposition 71 veränderten 17kDa Proteinen durch die Membranfraktion nicht phosphorylieren konnten, sieht man, dass diese beiden mutierten Proteine durch lösliche Proteine durchaus phosphoryliert wurden. Allerdings sind die Signale im Vergleich zum unveränderten Protein sehr viel schwächer.

In Abbildung 20 ist die Phosphorylierung von GST, GST-17kDa-C Protein, den Deletionen GST-17kDa-C3, -C4, -C5 Proteinen und den Austauschmutanten GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup>•A und S<sup>71</sup>•D durch Zellwandfraktionen gezeigt. Neben GST-17kDa-C Protein konnte mit den Zellwandfraktionen auch das Serin<sup>71</sup> enthaltene Teilprotein GST-17kDa-C4 Protein phosphoryliert werden. Sowohl die anderen beiden Teilproteine, die dieses Motiv nicht enthalten, als auch die beiden Austauschmutanten, bei denen dieses Motiv zerstört wurde oder eine schon stattgefundene Phosphorylierung vorgetäuscht wurde, konnten durch die Zellwandfraktion nicht phosphoryliert werden.



**Abbildung 20: *In vitro* Phosphorylierungen von GST-17kDa-C Protein, GST-17kDa-C3, GST-17kDa-C4 und GST-17kDa-C5 Proteinen und mutierten GST-17kDa-C Proteinen GST-17kDa-C S<sup>71</sup>•D und GST-17kDa-C S<sup>71</sup>•A durch Zellwandproteine aus Kartoffelblättern**

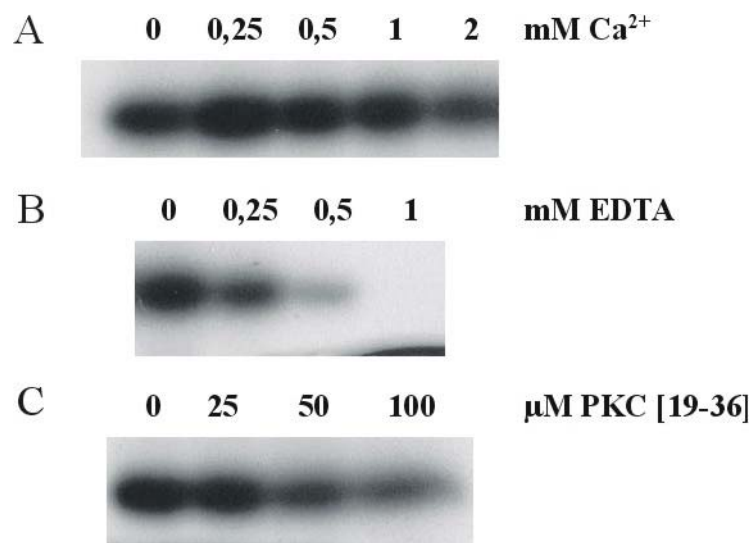
**Die Phosphorylierung von GST diente als Negativkontrolle. Je 5 µg GST oder GST-17kDa-C Proteine wurden mit 10 µg Zellwandproteinfraktion inkubiert.**

Während die Fraktion löslicher Proteine eine zusätzliche Kinaseaktivität enthält, verhalten sich die Fraktionen aus gesamten Zellmembranen und Zellwänden gleich.

### 3.2.4 Charakteristika der Phosphorylierung im Serin<sup>71</sup>

Bislang ist unklar, ob die Kinase, die das Serin<sup>71</sup> phosphoryliert, mit der Kinase übereinstimmt, welche durch Sokolova *et al.* (1997) beschrieben wurde. Deswegen wurden exemplarisch einige der beschriebenen Charakteristika (Calciumabhängigkeit, EDTA-Hemmbarkeit, Hemmung durch PKC-Inhibitor) gewählt und diese Einflüsse auf das GST-17kDa-C4 Protein untersucht. Dieses Konstrukt umfasst neben dem Phosphorylierungsmotiv Serin<sup>71</sup> auch noch die Motive Serin<sup>64</sup>, Threonin<sup>70</sup> und Threonin<sup>76</sup>. Durch die vorherigen Experimente wurde die Phosphorylierung an diesen Positionen durch Membranproteine ausgeschlossen. Ein sehr kurzes GST-Fusionsprotein, welches nur die Aminosäuren 65 bis 78 umfasst, konnte zwar auch unter den gleichen Bedingungen phosphoryliert werden, aber sehr viel schlechter, als das etwas längere Konstrukt GST-17kDa-C3 Protein (ohne Abbildung). Wahrscheinlich kann die verantwortliche Kinase das Motiv zwar noch erkennen, aber sterische Effekte des GST-Teils auf dieses sehr kurze 17kDa Teilprotein erschweren den Zugriff auf dieses Motiv durch die Kinase. Außerdem beinhaltet dieses kurze Protein immer noch die beiden Threoninmotive zusätzlich zum Serin<sup>71</sup> Motiv. Aus diesen Gründen wurde mit dem längeren Konstrukt GST-17kDa-C4 gearbeitet. Man sieht in Abbildung 22, dass sich die Kinaseaktivität auf 17kDa Protein-C4 durch Calcium zunächst steigern lässt, bei hohen Calciumkonzentrationen aber wieder abnimmt. Auch lässt sich die Reaktion durch EDTA hemmen. Setzt man den Reaktionen ein spezifisch PKCs hemmendes Peptid zu, sieht man, dass die Phosphorylierung von GST-17kDa-C4 Protein hierdurch negativ beeinflusst wird. Daher haben Calcium, EDTA und PKC-Inhibitorpeptid auf das 17kDa-C4 Protein genau den Effekt, wie es durch Sokolova *et al.* (1997) für das gesamte 17kDa Protein beschrieben wurde.

Die Serin-/Threonin-Kinase, die das Motiv Serin<sup>71</sup> phosphoryliert, stimmt in ihren Eigenschaften mit der in der Literatur beschriebenen membranlokalisierten PKC-ähnlichen Serin-/Threonin-Kinase überein.



**Abbildung 22: Charakteristika der Phosphorylierung im Serin<sup>71</sup>**

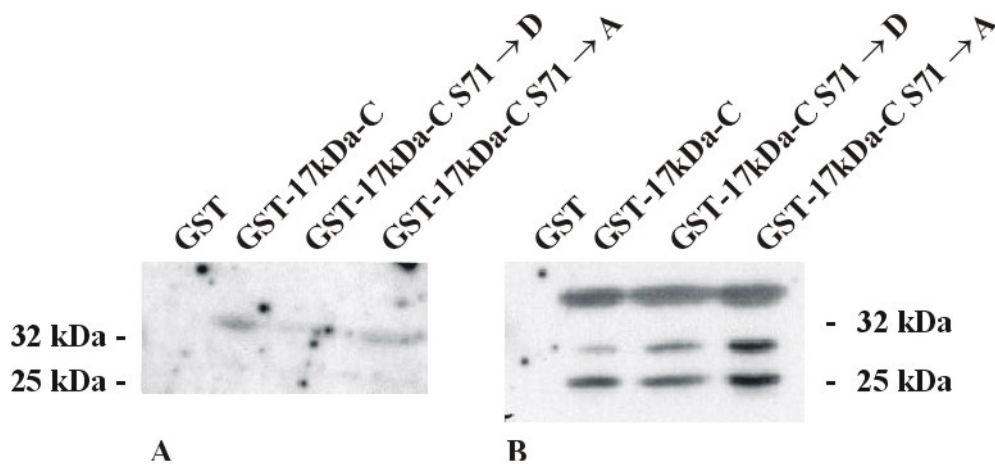
**Je 5µg GST-17kDa Protein-C4-Fusionsproteine wurden mit 10 µg Proteinen einer Membranfraktion aus Kartoffelblättern mit folgenden Zusätzen im Assaypuffer inkubiert: In A: mit 0, 0,25, 0,5, 1 und 2mM CaCl, in B: mit 0, 0,25, 0,5, 1mM EDTA und in C: mit 0, 50, 100 und 200 mM PKC-Inhibitorpeptid PKC [19-36]**

### **3.2.5 Beeinflusst die Phosphorylierung des 17kDa Proteins die RNA-Bindung?**

Das virale Transportprotein 17kDa bindet einzelsträngige Nukleinsäuren (RNA oder einzelsträngige DNA) in unspezifischer Weise (Tacke *et al.*, 1991). Ungeklärt ist bislang, wie die Bindung von RNA an das 17kDa Protein bzw. dessen Loslösung vom 17kDa Protein reguliert wird. Sokolova *et al.* (1997) diskutieren den De-/Phosphorylierungsstatus des 17kDa Proteins als Regulationsmechanismus für die RNA-Bindung.

Um ein Phosphoserin zu simulieren, wurde im 17kDa Protein das Serin<sup>71</sup> gegen ein Aspartat ersetzt (GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup>•D). Die Bindung von RNA/einzelsträngiger DNA von GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup>•D wurde mit der von GST-17kDa-C und GST-17kDa-C-S<sup>71</sup>•A verglichen. Die von den geblotteten Proteinen gebundenen Nukleinsäuren sind als Autoradiogramm in Abbildung 23 dargestellt. Das schwächere Signal durch die Bindung von RNA durch GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup>→D in Abbildung 23 A ist drauf zurückzuführen, das weniger GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup>→D als GST-17kDa-C Protein geladen war. In Abbildung 23 B sieht man, dass bei allen verschiedenen 17kDa Proteinen in ähnlichem Maße einzelsträngige Nukleinsäuren gebunden wurden. Die vorgetäuschte Phosphorylierung im

GST-17kDa-C Protein S<sup>71</sup> • D führt zu keinem Verlust der RNA-Bindungsfähigkeit vom 17kDa Protein.



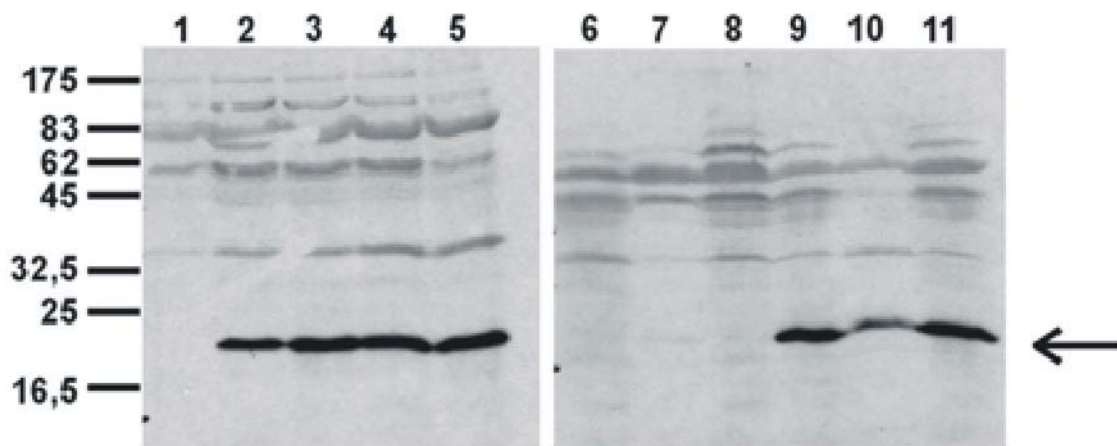
**Abbildung 23: Overlay Assays zur Bindung einzelsträngiger Nukleinsäuren durch GST, GST-17kDa-C Protein und die mutierten GST-17kDa-C Proteine S<sup>71</sup> • D und S<sup>71</sup> • A In A wurde die Bindung von RNA untersucht. In Abbildung B wurde einzelsträngige DNA in Form von Oligonukleotiden für die Bindungsstudien verwendet. Blots mit GST-17kDa-C Proteinen wurden mit radioaktiv markierter NA oder mit radioaktiv markierten Oligonukleotide inkubiert.**

### **3.2.6 Herstellung von transgenen, 17kDa Protein exprimierenden Kartoffelpflanzen**

Als nächstes sollte der Phosphorylierungsstatus des 17kDa Proteins *in planta*, der Effekt durch das Ausschalten des Serin<sup>71</sup>-Motivs auf die Lokalisation des 17kDa Proteins *in planta*, der Einfluß eines solchen phosphorylierungsdefizienten 17kDa Protein auf den Zuckerhaushalt und auf die Reaktion diuser17kDa Protein- und 17kDa Protein S<sup>71</sup> • A-transgener Pflanzen auf eine PLRV-Infektion untersucht werden. Hierfür wurden transgene Kartoffelpflanzen erzeugt, die entweder das native 17kDa Protein oder das 17kDa Protein S<sup>71</sup> • A mit jeweils einem 6 x HIS-TAG unter der Kontrolle des 35S-Promotors aus dem Blumenkohl-Mosaikvirus exprimieren. Zunächst wurden über PCR an das 3'-Ende der Vollängen-cDNA-Fragmente, die für 17kDa Protein und 17kDa ProteinS<sup>71</sup> • A codieren, 6 x Histidinkodons nebst *Sal* I-Schnittstelle angefügt. Das 5'-Ende wurde mit einer *Eco* RI-Schnittstelle versehen. Über die beiden Schnittstellen wurden die Fragmente zunächst in den Vektor pRT101 kloniert, der über den 35S-Promotor 5' der *Eco* RI-Seite und den 35S-Terminator 3' von der *Sal* I-Seite verfügt. Anschließend wurden die gesamten Kassetten, bestehend aus 35S-Promotor, Insertion und Terminator, und auch die Kasette bestehend aus



35S-Promotor und Terminator ohne Insertion über *Hind* III-Schnittstellen an beide Seiten in den binären Vektor pBIN 19 kloniert, der für die stabile Pflanzentransformation verwendet wurde. Die Kasette ohne Insertion dient als Negativkontrolle bei den nachfolgend hergestellten transgenen Kartoffellinien, um mögliche Sterilkultureffekte und Effekte durch die Transformationsprozedur ausschließen zu können. Mit Hilfe von mit diesen 3 Konstrukten transformierten Agrobakterien wurden sterile Kartoffelblattstücke der Kartoffelsorte Désirée transformiert. Aus den resultierenden Kalli wurden Pflanzen regeneriert und die Pflanzen aus den Linien im Gewächshaus aufgezogen. Von diesen Pflanzen wurde Blattmaterial gerntet und Pflanzenproteine extrahiert. Jeweils 40 µg der Proteine wurden auf SDS-PAGE-Minigelen aufgetrennt und geblottet. Die 17kDa Protein-Expression in den einzelnen Kartoffellinien wurde mit dem 17kDa Protein-Antikörper untersucht. In Abbildung 24 sind „Western-Blots“ 17kDa Protein-/bzw. 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A-exprimierender Kartoffellinien neben 2 Linien der mit einer leeren 35S-Kasette transformierten Kartoffelpflanzen (RT14 und RT 15) als Negativkontrolle gezeigt.



**Abbildung 24: Western-Blot-Analyse der 17kDa Protein (17kDa) und 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A (M2) exprimierenden Kartoffelpflanzen**

**Je 50 µg Gesamtproteinextrakte wurden durch 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde durch deren Beprobung mit dem 17kDa Protein-Antikörper in einer 1:5 000 Verdünnung die Expression von 17kDa Protein- bzw. 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A in den Pflanzen untersucht.**

**In den Spuren wurden die Proteinextrakte der verschiedenen Pflanzen wie folgt aufgetragen: 1 und 6: mit leerem pBIN19 transformierte Pflanze, 2 bis 5: 17kDa Protein-transgene Pflanzen (2: 17kDa/6, 3: 17kDa/13, 4: 17kDa /14, 5: 17kDa /16), 7 bis 11: 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A-transgene Pflanzen (7: M2/9, 8: M2/16, 9: M2/21, 10: M2/22, 11: M2/24**

Es konnten 4 Linien generiert werden, die 17kDa Protein exprimieren (17kDa /6, 17kDa /13, 17kDa /14, 17kDa /16). 5 Linien exprimieren 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A (M2/9, M2/16, M2/21, M2/24). Dabei konnten in den Linien M2/9 und M2/16 nur sehr geringe Mengen des Proteins im Vergleich zu den anderen Linien nachgewiesen werden.

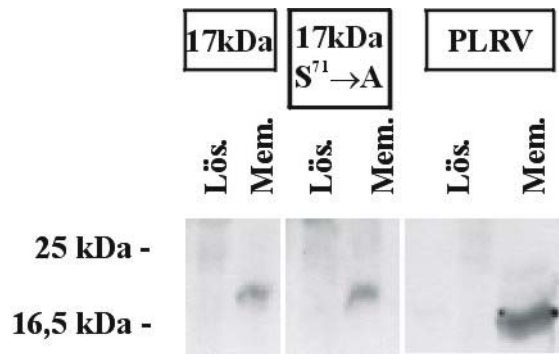
### **3.2.7 Analyse transgener Kartoffelpflanzen**

#### **3.2.7.1 Zelluläre Lokalisierung des 17kDa Proteins**

Sowohl in PLRV-infizierten Pflanzen als auch in transgenen Pflanzen ist das 17kDa Protein vornehmlich an Membranen, insbesondere an Plasmodesmata zwischen Geleitzellen und Siebelementen, lokalisiert (Schmitz *et al.*, 1997).

Trotz mehrfacher Phosphorylierung des Transportproteins des „Tomato Mosaicvirus“ bestimmt die Phosphorylierung an einer bestimmten Phosphorylierungsstelle, ob dieses Protein an Membranen gebunden ist oder nicht (Kawakami *et al.*, 1999). Daher sollte untersucht werden, ob durch die Zerstörung der Phosphorylierungsstelle Serin<sup>71</sup> *in planta* eine Bindung an Membranstrukturen unterbunden wird. Ist dies der Fall, sollte sich das Serin<sup>71</sup>-defiziente 17kDa Protein in Pflanzenextrakten weder in der Membran noch in der Zellwandfraktion zu finden sein.

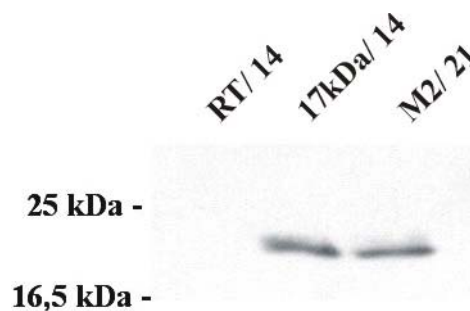
Für die Untersuchung von Zellfraktionen von Membranen, Zellwänden und löslichen Proteinen wurden die Linien 17kDa/14 und M2/21 ausgewählt, weil diese 17kDa Protein in sehr ähnlichen Mengen exprimieren. Zunächst wurde die Lokalisierung an Membranen von 17kDa Protein und 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A untersucht. Als Positivkontrolle wurden gleichzeitig Proteine aus Blättern PLRV-infizierter Pflanzen untersucht. Zunächst wurde aus den Blättern Membranproteinextrakte und Extrakte löslicher Proteine hergestellt. Gleiche Mengen an Proteinen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Die Proteinblots wurden mit dem 17kDa-Antikörper inkubiert. Das Ergebnis sieht man in Abbildung 25. Die 17kDa Protein und Serin<sup>71</sup>-defizientes 17kDa Protein ließen sich ausschließlich in den Membranfraktionen transgener als auch PLRV-infizierter Pflanzen nachweisen.



**Abbildung 25: Western-Blot zur Lokalisation des 17kDa Proteins in Kartoffelmembranfraktionen**

Je 50 µg Proteine aus Membranextrakten und Extrakten löslicher Proteine 17kDa/14 (expremiert natives 17kDa Protein) und M2/21 (expremiert S<sup>71</sup>•A mutiertes 17kDa Protein) und von PLRV-infizierten Pflanzen (PLRV) wurden im 15% SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem Anti-17kDa-Antikörper detektiert.

Als nächstes wurden Zellwandextrakte aus Blättern der Linien 17kDa/14 und M2/21 und der mit leeren 35S-Kassette transformierten Linie RT14 als Negativkontrolle hergestellt. Im Western-Blot mit gleichen Proteinmengen wurden die 17kDa Proteine mit dem 17kDa-Antikörper nachgewiesen (Abbildung 26). In der Pflanze, welche das native 17kDa Protein bildet, auch in der, welche das Serin<sup>71</sup>-defiziente 17kDa Protein bildet, sind die 17kDa Proteine in den Zellwandextrakten lokalisiert.



**Abbildung 26: Western-Blot zur Lokalisation des 17kDa Proteins in der Zellwandfraktion**

Je 50 µg Proteine aus Zellwandextrakten von Blättern der Pflanzenlinien RT14 (Negativkontrolle), 17kDa/14 (expremiert 17kDa Protein) und M2/21 (expremiert 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A) wurden im 15% SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem Anti-17kDa-Antikörper nachgewiesen.

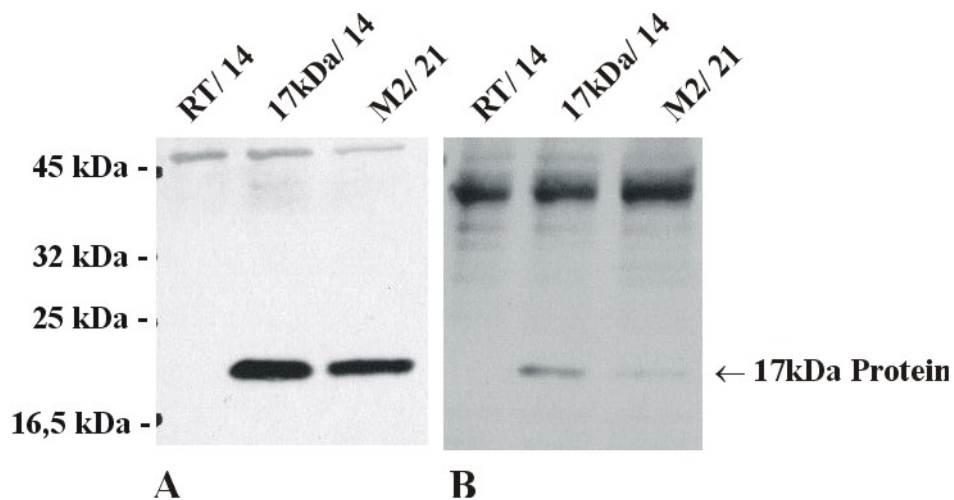
Die Zerstörung der Phosphorylierungsstelle Serin<sup>71</sup> durch den Austausch dieser Aminosäure gegen Alanin hat in transgenen Kartoffelpflanzen, welche diese Proteine in der Pflanze bilden, keinen Einfluss auf die Assoziation von 17kDa Protein mit Membranstrukturen.

Die Phosphorylierungsstelle Serin<sup>71</sup> nimmt keinen Einfluss auf die Lokalisation des 17kDa Proteins.

### **3.2.7.2 Phosphorylierungsstatus des 17kDa Proteins in transgenen Kartoffelpflanzen**

Als nächstes wurden die Pflanzen dafür verwendet, den Phosphorylierungsstatus des 17kDa Proteins *in planta* zu zeigen. Ist Serin<sup>71</sup> auch die einzige *in planta* genutzte Phosphorylierungsstelle, sollte im Gegensatz zum 17kDa Protein im 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A kein Phosphoserin bei den aus den Pflanzen extrahierten Proteinen nachweisbar sein. Aus zwei Gründen wurden dafür Zellwandextrakte von den Linien 17kDa Protein/14 und M2/21 benutzt: Erstens sind die 17kDa Protein im Vergleich zum Gesamtprotein in der Zellwandfraktion sehr stark angereichert. Zweitens werden in Gesamtproteinextrakten sehr viele Banden von phosphoserinhaltigen Proteinen mit dem Phosphoserinantikörper erkannt. Nimmt man Zellwandextrakte statt Gesamtproteinextrakte, nimmt der Hintergrund etwas ab. Zellwandextrakte der ungefähr gleich stark exprimierenden Linien 17kDa/14 und M2/21 wurde neben dem der Negativkontrolllinie RT14 (transformiert mit leerem Vektor) auf einem 15%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der Blot wurde zunächst mit dem 17kDa Protein-Antikörper aus Kaninchen inkubiert, um die 17kDa Proteinbanden nachzuweisen (Abbildung 27 A). Anschließend wurde der Antikörper gründlich vom Blot entfernt. Der Blot wurde dann mit dem Phosphoserinantikörper aus Maus inkubiert (Abbildung 27 B).

Nicht nur im unveränderten 17kDa Protein auch im 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A konnten Phosphoserine nachgewiesen werden. Allerdings ist das Signal mit dem Phosphoserinantikörper im 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A erheblich schwächer im Vergleich zu dem des nativen 17kDa Protein. *In planta* wird auch das Serin<sup>71</sup> phosphoryliert, aber auch andere Serinphosphorylierungsmotive.



**Abbildung 27: Western-Blot zur Untersuchung vom Phosphorylierungsstatus des 17kDa Proteins *in planta***

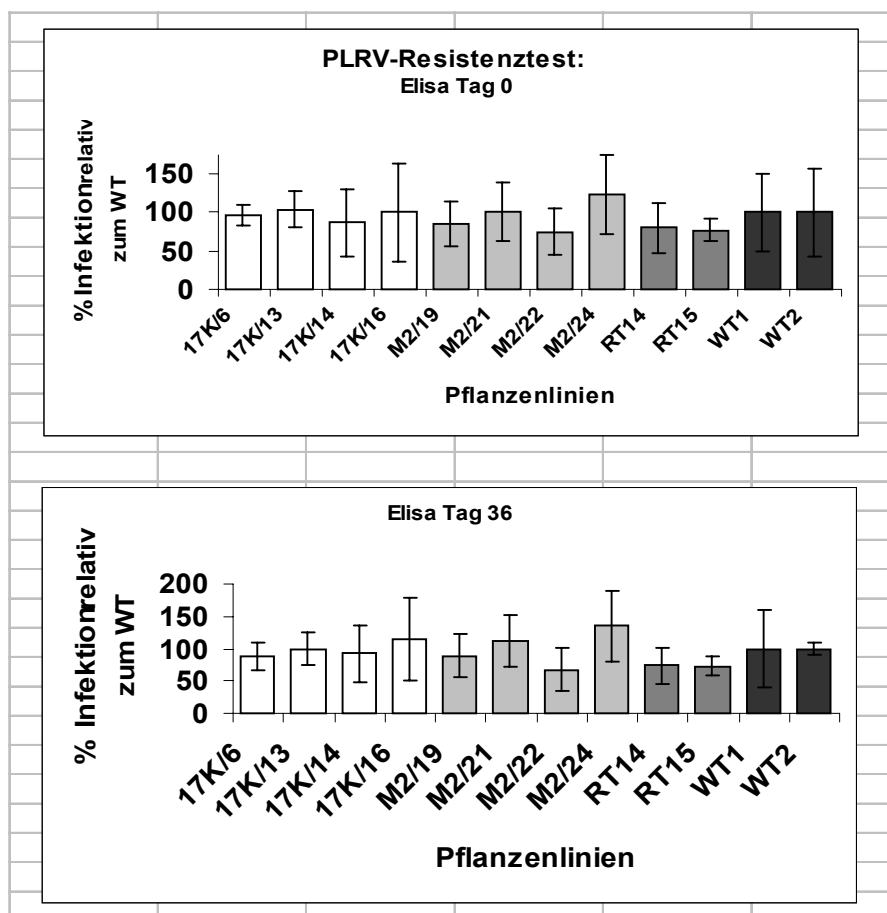
Je 50 µg Proteine aus Zellwandextrakten von Blättern der Pflanzenlinien RT14 (Negativkontrolle), 17kDa/14 (exprimiert 17kDa Protein) und M2/21 (exprimiert 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A) wurden im 15% SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und in A: mit einem Anti-17kDa-Antikörper inkubiert. In B: wurde derselbe Blot nach Entfernen des Anti-17kDa-Antikörpers mit einem Anti-Phosphoserin-Antikörper behandelt.

### 3.2.7.3 Resistenztest

Die Infektion von Kartoffeln mit PLRV erfolgt über folgende Methoden: Über Pfropfung mit PLRV infiziertem, phloemhaltigem Pflanzenstücken, mit Hilfe von PLRV-infizierten Blattläusen oder durch Infiltration mit PLRV-haltigen Agrobakterien. Erste Methode hat den Nachteil, dass das PLRV erst als Folgeinfektion in der nächsten Generation im ELISA sicher nachgewiesen werden kann. Die Infektion durch Blattläuse hat den Vorteil, dass sich die PLRV-Infektion schon nach wenigen Tagen im neu infizierten Pflanzenmaterial nachweisen lässt. Diese Versuche in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Larry Kawschuk (Lethbridge Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge, Alberta, Kanada) als Kooperation durchgeführt.

In Kartoffeln führte die Expression von 17kDa Protein, welches im N-Terminus so verändert war, das die Dimerisierung gestört wurde, zu einer Toleranz der Pflanzen gegen PLRV-Infektionen (Tacke *et al.*, 1996). Um zu prüfen, ob die Expression von Serin<sup>71</sup>-defizienten 17kDa Protein auch zur Toleranz in transgenen Kartoffelpflanzen führt, wurden die 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A exprimierenden Kartoffellinien M2/6, M2/16, M221, M2/22 und M2/24 im Vergleich zu den 17kDa exprimierenden Linien 17kDa/6, 17kDa/13, 17kDa/14 und 17kDa /16 PLRV-Resistenztests unterzogen. Die mit dem leeren Vektor transformierten

Kartoffellinien RT14 und RT15 und untransformierten Kartoffelpflanzen dienten als Positivkontrolle. Je 8 Pflanzen der Linien wurden den Resistenztests unterzogen. Zusätzlich wurden je 2 Pflanzen pro Linie als nicht infizierte Kontrolle verwendet. Direkt nach PLRV-Infektion und 36 Tage später wurde der PLRV-Titer in den Pflanzen über ELISA festgestellt. Die Höhe des PLRV-Titers zeigt den Grad der Infektion an. Da die verschiedenen Pflanzenlinien in unterschiedlichen Versuchsreihen getestet wurden, waren die Originalwerte zwischen den Versuchen nicht vergleichbar. Deswegen wurden die Infektionen bei den Wildtyppflanzen (WT 1 und 2) in den Einzelversuchen als zu 100% infiziert gesetzt. Die Werte der transgenen Pflanzenlinien wurden hierzu in Relation gesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 28 gezeigt. Die Originalwerte wurden in Tabelle 7 im Anhang 6.4 abgebildet.



**Abbildung 28: PLRV-Resistenztest an transgenen Kartoffelpflanzen nach Infektion (Tag 0) und 36 Tage nach Infektion (Tag 36) im Vergleich zu untransformierten Pflanzen** 17kDa: exprimiert unverändertes 17kDa Protein, M2: exprimiert Serin<sup>71</sup> defizientes 17kDa Protein, RT: mit leerem Vektor transformierte Pflanzen und WT: untransformierte Pflanzen (Negativkontrolle)

Die Ergebnisse der Elisa-Tests wurden in Relation zu den Infektionen der Wildtyppflanzen gesetzt

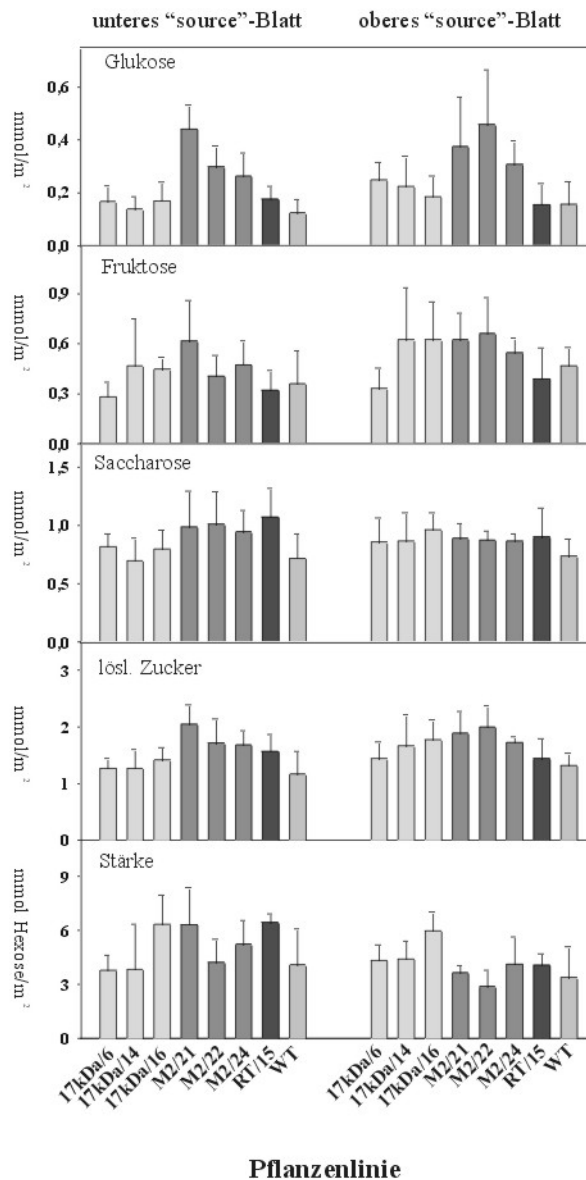
Die 17kDa Protein-S<sup>71</sup>•A exprimierenden Pflanzen zeigen keinerlei signifikant erhöhte Resistenz gegenüber PLRV-Infektionen im Vergleich zu den Pflanzen, die das native 17kDa Protein exprimieren. Die Expression von 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A in Kartoffelpflanzen bringt ebenfalls keine Toleranz gegen PLRV-Infektionen mit sich.

#### **3.2.7.4 Zuckerbestimmungen**

Die Expression von N-terminal um sechs Histidine verlängertem 17kDa Protein in Kartoffelpflanzen führt zu Akkumulation von Zuckern in den „Source“-Blättern. Vermutlich stört dieses N-terminal verlängerte 17kDa Protein-Protein die Phloembeladung an den Plasmodesmata. Darüber hinaus wurde die Rolle der Phosphorylierung des 17kDa Proteins auf diesen Effekt auf den Zuckertransport diskutiert (Herbers *et al.*, 1997). Die Zerstörung des Serin71-Phosphorylierungsmotivs im 17kDa Protein könnte bei Expression in Kartoffelpflanzen zu einer Änderungen im Zuckerhaushalt der Pflanzen im Vergleich zu den Pflanzen. Um das zu prüfen, wurde der Zuckergehalt von den 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A exprimierenden Pflanzen M2/ 21, 22, 24 im Vergleich zu den Pflanzen, die 17kDa Protein bilden, untransformierten (WT) und mit leerem Vektor transformierten Pflanzen (RT15) bestimmt.

Die Zuckerbestimmungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Sonnewald von Daniel Hofius (IPK, Gatersleben) durchgeführt, da die Zuckeranalytik in dieser Arbeitsgruppe etabliert ist.

Bei je 5 bis 6 Pflanzen der Linien 17kDa Protein/6, 17kDa Protein/14, 17kDa Protein/16, M2/21, M2/22, M224, RT15 und WT an oberen und unteren „Source“-Blättern die Konzentrationen von Glukose, Fruktose, Saccharose, der gesamte Gehalt an löslichen Zuckern und der Stärkegehalt gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt. Die Expression von 17kDa Protein oder 17kDa Protein S<sup>71</sup>•A in Kartoffelpflanzen hat folglich keinen Effekt auf den Zuckerhaushalt der Pflanzen.



**Abbildung 29: Zuckerbestimmungen an 17kDa transgenen Kartoffelpflanzen (von Daniel Hofius, IPK Gatersleben, 2001 als Gemeinschaftsprojekt)**

### 3.2.8 Interaktionen zwischen 17kDa Protein und Wirtspoteinen

Das 17kDa Protein hat als virales Transportprotein die Aufgabe, die virale, genomische RNA zu schützen und als RNA-Protein-Partikel über die Plasmodesmata von Zelle zu Zelle zu schleusen. Um den gezielten Transport viraler RNA zu bewerkstelligen, muss das 17kDa Protein mit Wirtsfaktoren, insbesondere mit Proteinen der Wirtspflanze, wechselwirken. Zusätzlich besteht eine Interaktion mit einer/mehreren Kinase(-n) und Phosphatase(-n). Auch



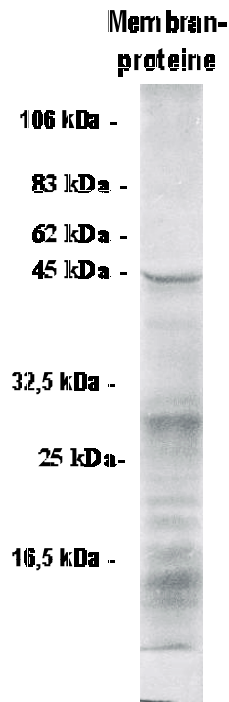
muss es Interaktionen mit dem Proteinabbauapparat der Pflanzenzellen geben. Bislang konnte aber für das Transportprotein vom PLRV kein interagierendes Protein isoliert werden.

Zunächst wurde über Durchmustern einer Two-Hybrid-cDNA-Bank aus Kartoffelblatt-cDNAs mit 17kDa Vollängenprotein und 17kDa-C Protein nach Interaktionspartnern gesucht. Unter jeweils  $10^6$  Hefetransformanden waren 115 Kolonien mit dem 17kDa Vollängenprotein und 51 mit dem 17kDa-C Protein in den Interaktionssichtungen Histidinautotroph. Nach Plattieren dieser Kolonien auf neues SD-His-Trp-Leu-Mangelmedium wuchsen 95 Kolonien (17kDa Vollängenprotein) und 34 Kolonien (17kDa-C Protein). Von diesen erwiesen sich 25 (17kDa Vollängenprotein) und 7 (17kDa-C Protein) als positiv im  $\beta$ -Galaktosidase-Test. Aus diesen Hefekolonien wurden die „Ziel“-Plasmide isoliert und zusammen mit dem 17kDa Protein-Plasmiden in Hefe retransformiert. Bei einer ersten Retransformation erwiesen sich nur 3 der mit dem 17kDa Vollängenprotein isolierten „Ziel“-Plasmide als positiv im  $\beta$ -Galaktosidase-Test. In drei weiteren Retransformationsexperimenten blieben auch diese „Ziel“-Plasmide im  $\beta$ -Galaktosidase-Test negativ. Sequenzanalysen zeigten, als alle drei cDNAs unterschiedlich waren. Eine der cDNAs war nicht im Kontext mit dem 5'-gelegenen AD-Anteil im pAD-Plasmid. Signifikante Homologien zu bekannten cDNAs oder hieraus abgeleiteten Proteinen konnten nicht gefunden werden

Danach sollte in so genannten „Overlay Assays“ und „Pull down Assays“ Interaktionen zwischen 17kDa Protein und Pflanzenproteinen nachgewiesen werden.

### **3.2.8.1 „Overlay Assays“**

Membranproteine aus Kartoffelblättern wurden nach Auftrennung durch SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulose und anschließender Renaturierung mit  $^{35}\text{S}$ -markiertem 17kDa-Protein inkubiert. Nachdem nicht gebundenes Protein abgewaschen wurde, konnten auf Röntgenfilm Bindung des radioaktiven 17kDa-Translationprodukt an Pflanzenproteinbanden dargestellt werden. Insbesondere konnte ein starkes Signal mit einem ca. 45 kDa großes Membranprotein. detektiert werden. Daneben traten Signale durch Bindung von 17kDa-Translationprodukt mit Proteinen im Bereich von 10-35 kDa auf (Abbildung 30).



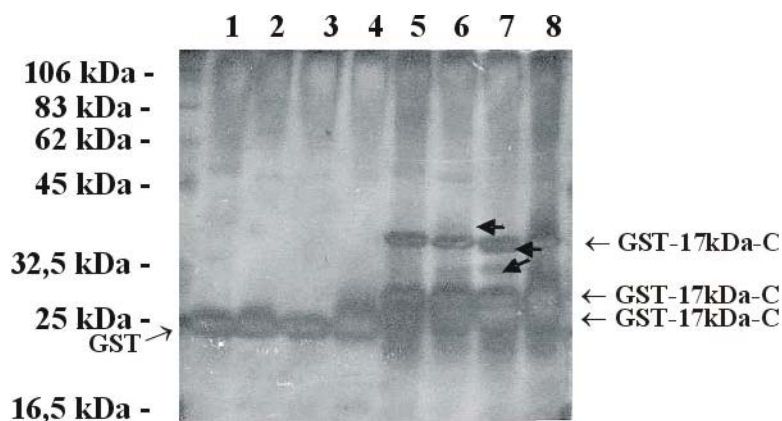
**Abbildung 30: „Overlay Assay“ zur Darstellung von Interaktion vom 17kDa Protein mit Proteinbanden aus Kartoffelmembranfraktionen**

**50µg Membranproteine wurden durch 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und nach Renaturierung der Proteine mit <sup>35</sup>S-markiertem 17kDa-Translationansatz inkubiert.**

### **3.2.8.2 „Pull down Assays“**

Hierbei wurden Pflanzenproteine in Lösung an Glutathion-Sepharose gekoppelte GST-17kDa-C Proteine gebunden. Nicht gebundene Proteine wurden dann abgewaschen. Anschließend wurden die Proteine durch 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie blau oder mit einer Silberfärbung angefärbt. Als Negativkontrolle wurden Pflanzenproteine auch mit an Sepharose gekoppeltem GST inkubiert und parallel dem gleichen Prozedere unterzogen. In Abbildung 31 sieht man neben den GST bzw. GST-17kDa-C Proteinen solche Proteine, die an diese gebunden hatten.

Das GST-17kDa-C Protein war in der Lage ein ca. 35 und ein ca.33 kDa großes Protein aus der Membranfraktion infizierter Kartoffelpflanzen zu binden. Allerdings wiesen auch die Proben mit den löslichen Proteinen, die 33 kDa-Bande in schwachem Maße auf. Proteinbanden im Bereich von 42 bis 60 kDa traten auch den mit GST inkubierten Proben auf.



**Abbildung 31: „Pull down Assays“ von Pflanzenproteinen durch GST oder GST-17kDa-C Protein** In dem silbergefärbten Gel sind in den Spuren 1 bis 4 GST und die Proteine, die daran gebunden hatten, dargestellt, in den Spuren 5 bis 8 sieht man neben den GST-17kDa-C Protein und seinen kürzeren Abbruchprodukten die Proteine dargestellt, die an das 17kDa-C Protein gebunden hatten. In den Spuren 1 und 5 sind Inkubationen mit Membranproteinen gesunder Kartoffelpflanzen aufgetrennt, in den Spuren 2 und 6 Inkubationen mit löslichen Proteinen derselben Pflanzen. In den Spuren 3 und 7 sieht man das Resultat aus den Inkubationen mit Membranproteinen PLRV-infizierter Kartoffelpflanzen, in den Spuren 4 und 7 die aus den Inkubationen mit löslichen Proteinen dieser Pflanzen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Studien über das P0 Protein

#### 4.1.1 Expression von P0 Teilproteinen in transgenen Kartoffelpflanzen

Expression des PLRV-P0 Proteins bewirkt in transgenen Kartoffelpflanzen wirtsspezifisch die Ausprägung eines Phänotyps, der den Krankheitssymptomen einer PLRV-Infektion entspricht. Das P0 Protein ist vermutlich in der Vermittlung der Wirtsspezifität des PLRV involviert (van der Wilk *et al.*, 1997). Bisher war nicht klar, welche Bereiche innerhalb des P0 Proteins für seine Funktion wesentlich sind oder ob nur das gesamte Protein diese Krankheitssymptome in transgenen Pflanzen auszulösen vermag.

Aufgrund über Computeranalysen vorhergesagten hydrophile/hydrophobe Bereiche, Sekundärstrukturen und möglichen Transmembranbereichen wurden C-terminal und N-terminal verkürzte Teillängenkonstrukte hergestellt (3.1.2) und in Kartoffelpflanzen transformiert. Alle Pflanzen, die mit diesen Teillängen-Konstrukten transformiert waren, sahen wie gesunde Kartoffelpflanze aus (3.1.3), also führte die Expression keiner der Teillängen-Konstrukte zur Ausbildung eines Krankheitsphänotyps.

Auffällig war, dass die meisten Kalli, die mit dem Konstrukt C3 transformiert waren, eingingen, obwohl anfänglich bei allen Transformationen mit den verschiedenen Konstrukten ähnlich viele Kalli beobachtet werden konnte. Während aus den Transformationen mit den Konstrukten C1, C2, N1, N2 und N3 jeweils mindestens 10 Linien resultierten, in denen P0-RNA nachgewiesen werden konnte, konnten nur bei zwei Linien von C3-transgenen Pflanzen sehr geringe Mengen an P0-RNA nachgewiesen werden. Aufgrund früherer Versuche (Prüfer, unveröffentlicht), soll die Expression des C3-Teils des P0 Proteins in Kartoffelpflanzen ausreichen, um einen Krankheitsphänotyp in den Pflanzen zu bewirken. Es könnte sein, dass sowohl die Expression vom C3 Protein als auch jene vom P0-Vollängenprotein die Pflanzenzellen so stark schädigt, dass die meisten Kalli, die dieses Konstrukte exprimieren, absterben, bevor sich daraus Pflanzen regenerieren können. Da ein Nachweis der P0 Proteine nicht möglich war, wurde die Expression der transformierten P0-cDNAs auf RNA-Ebene mit Hilfe von Northern-Blot-Hybridisierungen untersucht. Hierbei konnte in den Linien, die in Tabelle 5 im Anhang 6.2 aufgeführt sind, P0-RNA nachgewiesen werden –im Falle der C3-transgenen Pflanzen nur in sehr geringen Maße. Prüfer (unveröffentlicht) konnte eine Korrelation zwischen der Menge an P0-RNA und der Schwere des ausgeprägten Phänotyps zeigen. Die Anwesenheit von RNA bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass auch Protein in den

Pflanzen vorhanden sein muss. Es könnte also sein, dass gar keine oder nur geringe Mengen an P0 Protein in den transgenen Pflanzen gebildet wurden und es deshalb zu keinem Phänotyp kam.

Am wahrscheinlichsten ist allerdings, dass keine der P0-Teillängenproteine in transgenen Kartoffelpflanzen einen Krankheitsphänotyp bewirken konnten, weil Teile des P0 Proteins hierfür nicht ausreichend sind. Das bedeutet, dass für die wirtsspezifische Induktion von Krankheitssymptomen in transgenen Pflanze ist das gesamte P0 Protein notwendig ist.

#### **4.1.2 Interaktion vom P0 Protein mit Wirtspoteinen**

Ist das P0 Protein an der Vermittlung der Wirtsspezifität bei einer Infektion von Pflanzen mit dem PLRV beteiligt, kann eine Wechselwirkung des P0 Proteins mit Wirtsfaktoren angenommen werden. Hierbei könnte das P0 Protein zum einen als zweites Transportprotein beim zellulären Transport der Virus-RNA beteiligt sein und so wirtsspezifisch mit für diesen Transport genutzten Wirtspoteinen interagieren (Matthews *et al.*, 1992). Zum anderen wird das P0 Protein als viraler Inhibitor des PTGS diskutiert. In dieser Funktion könnte das P0 Protein durch wirts- und gewebespezifische Interaktion mit Wirtspoteinen den Abbau von viraler RNA durch PTGS-Mechanismen verhindern. Über eine Interaktionssichtung einer TwoHybrid-cDNA-Bank mit dem P0 Protein konnten keine cDNAs von Proteinen, welche mit dem P0 interagierten identifiziert werden. Dies kann mehrere Gründe haben. Erstens könnte der BD-Anteil in dem eingesetzten BD-P0-Fusionsprotein aus sterischen Gründen eine Interaktion mit möglichen Partnerproteinen verhindern. Zweitens könnten für eine Interaktion wichtige Bedingungen in den Hefezellen fehlen, die in den Phloemzellen vorliegen. Drittens könnte es Interaktionen zwischen spezifisch im Phloem exprimierten Proteinen und dem P0 Protein geben. Der Anteil dieser Phloem-spezifischer cDNAs in der TwoHybrid-cDNA-Bank könnte so gering sein, dass sich Interaktionen mit hiervon translatierten Proteinen in dem Umfang, in dem die Sichtigungen durchgeführt wurden nicht finden lassen. Viertens könnte es sein, dass die Hydrophobizität des P0 Proteins eine für die Detektion einer Interaktion notwendige Lokalisierung im Zellkern der Hefezellen verhindert. Wegen seines stark hydrophoben N-Terminus und dem hierin gelegenen möglichem Transmembranspann, kann angenommen werden, dass es sich beim P0 Protein um ein membranassoziertes Protein handelt. In „Overlay Assays“ konnte in dieser Arbeit eine Interaktion des P0-Proteins mit einem 42 kDa großen Protein aus einer Membranfraktion aus Kartoffelblättern festgestellt werden (3.1.4). Dieses Resultat bedeutet den ersten Schritt zur Identifizierung eines Interaktionspartners für das P0 Protein und bietet einen Hinweis zur Aufreinigung eines solchen mutmaßlichen Interaktionspartners.

### 4.1.3 Interaktion zwischen 17kDa Protein und P0 Protein

Für die Funktion des P0 Proteins als zweites Transportprotein sprechen Parallelen zu der Ausbildung von Phänotypen bei Überexpression der beiden Transportproteine vom Geminivirus SqLCV („Squash leaf curl virus) in Tabak. Hier bewirkt ein Transportprotein den Transport des Virus durch die Plasmodesmata. Das andere bewirkt den Transport in der Zelle selber und löst ein krankheitsphänotypisches Erscheinungsbild in transgenen Pflanzen aus (Pascal *et al.*, 1993). Ist das P0 Protein zusammen mit dem 17kDa Protein am Transport der viralen RNA beteiligt, wie Matthews *et al.* (1992) vermuteten, kann man annehmen, dass diese beiden Proteine miteinander interagieren.

Sowohl durch „Pull down Assays“ als auch durch „Overlay Assays“ konnte in dieser Arbeit P0 Protein an GST-17kDa-C Protein gebunden werden. In mehreren Kontrollexperimenten wurde die Spezifität dieser Bindungsstudien überprüft. Es konnte klar zwischen einer Bindung vom P0 Protein an das 17kDa Protein und der Bindung von P1-Teilproteinen unterschieden werden, die aufgrund einer Überlappung beider Leseraster von derselben P0-cDNA abgelesen werden können. Die durchgeführten Experimente zeigen eine Bindung des P0-Proteins im C-terminalen Teil des Proteins. Diesem Teilproteins fehlt aber die von Tacke *et al.* (1993) identifizierte Dimerisierungsdomäne und steht im Gegensatz zu den von Tacke *et al.* (1993) gefundenen Ergebnissen. Aufgrund der von Tacke *et al.* (1993) identifizierten Dimerisierungsdomäne und der hier gezeigten Bindung des P0 Proteins an das GST-17k-C6-Teillängenprotein müssten unterschiedliche Bereiche im 17kDa Protein für Dimerisierung und für die Bindung des P0 Proteins verantwortlich sein. Deshalb sollte die Bindung des P0 Proteins nicht durch die Bindung des 17kDa Proteins beeinflusst werden, wie es hier aber der Fall war. Zusätzlich konnte unter den gewählten Bedingungen auch noch die Glukoronidase durch das GST-17kDa-C Protein gebunden werden, für die es keinerlei Hinweis auf mögliche Interaktion mit dem 17kDa Protein gibt (3.1.7.1). Dies lässt vermuten, dass die hier durchgeführten Bindungsexperimente unter den gewählten Bedingungen zu wenig spezifischen Ergebnissen führen. Es konnten zwar Bindungen an die 17kDa-C und 17kDa-C6 Teillängenproteine gezeigt werden, aber keine Bindung des P0 Proteins an das 17kDa Protein. Das spricht dafür, dass eine Interaktion des P0 Proteins mit dem 17kDa Protein unwahrscheinlich ist. Ob das P0 Protein an Transportprozessen der Virus-RNA beteiligt ist, oder eine andere Funktion erfüllt, z.B. die eines PTGS-Inhibitors, ist weiterhin unklar.

## 4.2 Die Phosphorylierung des 17kDa Proteins

### 4.2.1 Phosphorylierungsmotive im 17kDa Protein

Das 17kDa Protein wird im C-terminalen Bereich des Proteins durch eine Serin-/Threonin-Kinase aus der Membranfraktion von Kartoffelblättern phosphoryliert, welche Eigenschaften einer PKC hat (Sokolova *et al.*, 1997). Der Vergleich mit Phosphorylierungsmotiven tierischer PKCs (Hanks und Quinn, 1991) führte zur Identifizierung von sieben Serinen und zwei Threoninen, die von einer PKC phosphoryliert werden könnten (3.2.1.1). Serin<sup>101</sup> und Serin<sup>118</sup> außerhalb des Proteinteils liegen, der laut Sokolova *et al.*, (1997) *in vitro* phosphoryliert wird. Das 17kDa Protein besitzt neben den Serinen und Threoninen, welche Bestandteil von PKC-Phosphorylierungsmotiven sind, noch zahlreiche andere Serine. Bei der Phosphorylierung des Transportproteins des TMV, dem TMV-MP-30, konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur Serine genutzt werden, welche Bestandteil von in der Literatur beschriebenen Phosphorylierungsmotiven sind, sondern auch andere Serine phosphoryliert werden, welche keinen zuvor beschriebenen Motiven zugeordnet werden können (Citovsky *et al.*, 1993). Da in dieser Arbeit besonders die in der Literatur beschriebene Phosphorylierung (Sokolova *et al.*, 1997) weitergehend studiert werden sollte, wurden zunächst die Motive untersucht, die für die beschriebene Phosphorylierung des PLRV 17kDa Proteins in Frage kommen.

### 4.2.2 Identifizierung von *in vitro* genutzten Phosphorylierungsmotiven

Welche der Serin- bzw. Threoninmotive durch die in der Membranfraktion aus Kartoffelblättern enthaltene Kinase phosphoryliert werden, wurde durch *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten von verschiedenen Mutanten des 17kDa Proteins untersucht. In einer Serie von Phosphorylierungsexperimenten wurden 17kDa Proteine eingesetzt, bei denen Serine und Threonine gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht wurden. Hierdurch konnte das Serin<sup>71</sup> als Ziel der in der Membranfraktion enthaltenen Kinase identifiziert werden (3.2.2). Solche S→A-Austauschmutanten wurden auch für die Identifizierung von Phosphorylierungsmotiven in anderen viralen Transportproteinen verwendet, wie z.B. bei den Transportproteinen vom TMV oder vom ToMV (Waigmann *et al.*, 2000; Kawakami *et al.*, 1999). Da der Austausch von der dem Serin<sup>71</sup> benachbarten Aminosäure Threonin<sup>70</sup> die Phosphorylierung des 17kDa Protein nicht beeinflusst, kann ausgeschlossen werden, dass der Austausch des Serin<sup>71</sup> gegen ein Alanin aufgrund einer Änderung in der Sekundärstruktur die Phosphorylierung des 17kDa Proteins unterbindet. Die Ergebnisse aus den Phosphorylierungsversuchen mit den 17kDa Protein S→A-Austauschmutanten wurden durch

Einsatz von 17kDa Deletionsmutanten und den Einsatz eines synthetischen 17kDa Peptids überprüft (3.2.2). Die verschiedenen verwendeten Konstrukte und die Auswirkung der Veränderung der mutierten Proteine gegenüber dem unveränderten Protein auf dessen Phosphorylierbarkeit *in vitro* ist in Tabelle 6 im Anhang 6.3 zusammengefasst. Bei anderen viralen Transportproteinen *in vitro*, *in vivo* und *in planta* wurde eine Multiphosphorylierung an mehreren Serin- bzw. Threoninresten festgestellt (Waigmann *et al.*, 2000; Kawakami *et al.*, 1999). Im Gegensatz hierzu konnte in dieser Arbeit anhand der mit diesen mutierten 17kDa Proteinen durchgeführten Phosphorylierungsstudien gezeigt werden, dass nur das Serin<sup>71</sup> des PLRV-17kDa Proteins durch die in der Membranfraktion aus Kartoffelblättern enthaltene Proteinkinase *in vitro* phosphoryliert wird.

#### **4.2.3 Charakteristika der Phosphorylierung im Serin<sup>71</sup>**

Sokolova *et al.* (1997) beschrieben die Phosphorylierung des 17kDa Proteins durch eine Kinase in der Kartoffelmembranfraktion als Ca<sup>2+</sup>-abhängig, EGTA-hemmbar und durch einen spezifischen PKC-Inhibitor inhibierbar. Um zu prüfen, ob diese Charakteristika auf die Phosphorylierung des Serin<sup>71</sup> zutreffen, wurde in den entsprechenden Phosphorylierungsexperimenten mit dem 17kDa Teillängenprotein GST-17kDa-C4 gearbeitet. Anhand der Phosphorylierungsexperimente an dem GST-17kDa-C4 Protein konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Serin<sup>71</sup> Ca<sup>2+</sup>-abhängig ist und durch EDTA und ein PKC-Inhibitorpeptid gehemmt werden kann (3.3). Dies entspricht den von Sokolova *et al.* (1997) aufgestellten Charakteristika der Phosphorylierung des 17kDa Proteins. Also ist das Serin<sup>71</sup> das Ziel dieser Kinase.

#### **4.2.4 *In vitro* Phosphorylierungen des 17kDa Proteins durch verschiedene Zellfraktionen**

Bislang wurde nur die Phosphorylierung des 17kDa Proteins durch eine Kinase der Membranfraktion beschrieben. Ob jedoch auch andere Zellfraktionen Kinaseaktivitäten aufweisen, die das 17kDa Protein phosphorylieren können, wurde bislang nicht untersucht. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das 17kDa Protein sowohl durch Zellmembranen als auch durch Zellwandpräparationen am selben Phosphorylierungsmotiv phosphoryliert wird. Da beide Präparationen ein Anteil an Proteinen aus den Plasmodesmata enthalten, kann man davon ausgehen, dass die Kinaseaktivität, von einer Serin-/Threonin-Kinase ausgeht, die vermutlich an den Plasmodesmata lokalisiert ist. In Zellwänden wurde in der Literatur eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Kinaseaktivität innerhalb solcher Zellwandpräparationen beschrieben (He *et al.*, 1996). Ob diese Kinase für die Phosphorylierung des 17kDa Proteins verantwortlich ist oder eine andere, ist allerdings noch unklar. Sicherlich ist es aber eine andere Kinase als die,



die das Transportprotein vom TMV an den Zellwänden phosphoryliert, da die Phosphorylierung dieses TMV-MP30 durch Zellwandpräparationen cAMP-abhängig und  $Mg^{2+}$ -abhängig ist. Eine  $Ca^{2+}$ -Abhängigkeit liegt bei dieser Phosphorylierung nicht vor (Waigmann *et al.*, 2000). Eine wiederum andere Kinase wird für die Phosphorylierung des Transportproteins vom ToMV beschrieben. In diesem Fall ist für die Phosphorylierung des Transportproteins eine Casein-Kinase verantwortlich (Kawakami *et al.*, 1999). Virale Transportproteine mögen zwar meist phosphoryliert werden, die Art der Phosphorylierung bei den Transportproteinen der unterschiedlichen Viren ist allerdings jeweils verschieden.

Neben der Phosphorylierung des 17kDa Proteins durch Zellmembranfraktionen und Zellwände am Serin<sup>71</sup> konnte hier gezeigt werden, dass das 17kDa Protein durch eine Kinaseaktivität aus einer Fraktion löslicher Proteine an anderer Stelle phosphoryliert wird (3.2.4). Für das Transportprotein vom TMV wurde neben der Phosphorylierung durch Zellwandfraktionen auch eine Phosphorylierung in Protoplasten gezeigt, die an anderen Positionen erfolgt, als an denen die von der zellwandassoziierten Kinase genutzt werden (Haley *et al.*, 1995). Die Autoren vermuten, dass die unterschiedlichen Phosphorylierungen durch die verschiedenen Kinasen unterschiedliche Aufgaben bei der Funktion des Transportproteins übernehmen. Dies könnte bei der Phosphorylierung des 17kDa Proteins durch unterschiedliche Kinasen der Fall sein. Es ist aber auch gut vorstellbar, dass erst durch die sukzessive Phosphorylierung des 17kDa Proteins die vollständige Funktion der Phosphorylierung erreicht wird.

#### **4.2.5 Einfluss der Phosphorylierung im Serin<sup>71</sup> auf die RNA-Bindung**

Der Phosphorylierungsstatus des Proteins könnte einen Einfluss auf seine RNA-Bindungseigenschaften haben. Sokolova *et al.* (1997) diskutierten den Phosphorylierungsstatus als möglichen Regulationsmechanismus für die Bindung bzw. Ablösung der RNA an bzw. vom 17kDa Protein. Doch weder das Ausschalten des Phosphorylierungsmotivs Serin<sup>71</sup> durch einen Austausch gegen ein Alanin, noch eine vorgetäuschte Phosphorylierung durch den Austausch vom Serin<sup>71</sup> gegen das negativ geladene Aspartat, haben einen sichtbaren Effekt auf die Bindung von einzelsträngigen Nukleinsäuren (3.3.1). Deswegen kann ein Einfluss des Phosphorylierungsstatus vom 17kDa Protein auf dessen Affinität zu Nukleinsäuren ausgeschlossen werden.

#### **4.2.6 Einfluss der Phosphorylierung des Serin<sup>71</sup> auf die zelluläre Lokalisation des 17kDa Proteins**

Für das Transportproteins vom ToMV konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung am Serin<sup>37</sup> wesentlich dafür ist, dass das Protein mit Membranen assoziieren kann (Kawakami *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob die Phosphorylierung in der Aminosäureposition 71 des 17kDa Proteins Auswirkungen auf die Lokalisation in der Pflanze hat, wurden transgene Kartoffelpflanzen erzeugt, die das native 17kDa Protein und ein phosphorylierungsdefizientes 17kDa Protein exprimieren. Obwohl der Austausch der Aminosäure Serin<sup>71</sup> gegen ein Alanin die Phosphorylierung an dieser Position verhindert, ist das 17kDa Protein dennoch in der Membranfraktion und der Zellwandfraktion lokalisiert (3.4.1). Die in der Literatur beschriebene Kosegregation von phosphoryliertem und unphosphoryliertem 17kDa Protein unterstützen die hier gezeigten Ergebnisse, dass das Phosphorylierungsmuster des 17kDa Proteins keinen Einfluss auf dessen Lokalisation hat (Tacke *et al.*, 1993).

#### **4.2.7 Einfluss der Phosphorylierung des Serin<sup>71</sup> auf den Zuckerhaushalt in 17kDa-transgenen Pflanzen**

Die Expression dieses in seiner Funktion gestörten 17kDa Proteins führt in transgenen Pflanzen zur Akkumulation von Kohlenhydraten in den „Source“-Blättern. Das C-terminal verlängerte 17kDa Protein hingegen zeigte nicht diesen Effekt auf den Zuckerhaushalt der Pflanze (Tacke *et al.*, 1996, Herbers *et al.*, 1996). Darüber hinaus vermuteten Herbers *et al.* (1996) einen Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung des 17kDa Proteins und der Störung des Zuckerhaushalts. In Pflanzen, die das unveränderte und das an der Position Serin<sup>71</sup> phosphorylierungsdefiziente 17kDa Protein exprimieren, war hingegen der Zuckerhaushalt der Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp unverändert (3.4.4). Deswegen kann angenommen werden, dass die Phosphorylierung des Serin<sup>71</sup> keinen Funktionsverlust des 17kDa Proteins hervorruft, und somit die Beladung des Phloems und so der Zuckerhaushalt unbeeinflusst bleibt

#### **4.2.8 Einfluss der Phosphorylierung des Serin<sup>71</sup> auf Resistenzvermittlung in 17kDa-transgenen Pflanzen**

Die Phosphorylierung des Transportproteins vom TMV bewirkt die Weitung der Plasmodesmata für den Durchgang der Protein-/RNA-Partikel und hat so einen regulatorischen Effekt bei der Verbreitung des Virus in der Pflanze (Waigman *et al.*, 2000). Hat die Phosphorylierung im Serin<sup>71</sup> vom 17kDa Protein eine ähnliche Funktion, so könnte die Expression eines Serin<sup>71</sup>-phosphorylierungsdefizienten 17kDa Proteins auf diese Weise

ebenfalls zur PLRV-Toleranz in Pflanzen führen, indem dieses Proteins mit dem durch eine PLRV-Infektion eingebrachtem Wildtypprotein konkurriert. Die Untersuchung von transgenen Pflanzen, welche unverändertes 17kDa Protein und phosphorylierungsdefizientes 17kDa Protein exprimieren, ergab, dass die Änderung im Phosphorylierungsmuster vom 17kDa Protein, jedoch zu keiner Toleranz der Pflanzen gegenüber einer PLRV-Infektion führt (3.4.3).

Die Expression von im Serin<sup>71</sup> phosphorylierungsdefizientem 17kDa Protein hat anscheinend keinen Einfluss auf eine Weitung der Plasmodesmata in Pflanzen. Darüber hinaus könnte das Einbringen von nativen 17kDa Protein durch PLRV-Infektion selbst bei Anwesenheit von dysfunktionalem 17kDa Protein ausreichen, um die Plasmodesmata zu weiten und so die Ausbreitung des Virus in der Pflanze ermöglichen. Ferner kann es sein, dass für die Auswirkung des Phosphorylierungsstatus auf die Funktion des 17kDa Proteins die Phosphorylierung im Serin<sup>71</sup> allein nicht ausreicht, sondern das hierfür eine mehrfache Phosphorylierung des Proteins vorliegen muss.

#### **4.2.9 Phosphorylierungsstatus des 17kDa Proteins *in planta***

Beim Transportproteins vom TMV wurden Unterschiede zwischen bei *in vitro*, *in vivo* oder *in planta* Unterschiede im Phosphorylierungsmuster gezeigt (Citovsky *et al.*, 1993, Haley *et al.*, 1995). Ein Western-Blot von in Kartoffel exprimierten, Serin<sup>71</sup>-defizientem 17kDa Protein mit einem Phosphoserin-Antikörper zeigte, dass im Gegensatz zu der *in vitro* Phosphorylierung von 17kDa Proteinen mit Membranfraktionen das 17kDa Protein an weiteren Motiven phosphoryliert wird. Durch Vergleich des Phosphorylierungsmusters vom Transportprotein vom TMV in Protoplasten und in *in vitro* Phosphorylierungen dieses Proteins mit Zellwandfraktionen wurde geschlossen, dass mehrere unterschiedlich lokalisierte Kinasen an der Phosphorylierung dieses Proteins beteiligt sein könnten (Haley *et al.*, 1995). Oben (4.4.4) wurde bereits besprochen, dass das 17kDa Protein *in vitro* nicht nur durch Membranfraktionen bzw. Zellwandfraktionen von Kartoffelblättern phosphoryliert wird, sondern von einer löslichen Kinase an weiteren Motiven phosphoryliert werden kann. Dies unterstützt die Beobachtung, das *in planta* das 17kDa Protein nicht allein am Serin<sup>71</sup> phosphoryliert wird, sondern auch an anderen Serinen (3.4.2).

Möglicherweise hat nur die schrittweise Phosphorylierung des 17kDa Proteins einen Einfluss auf dessen Funktion. So wurde vermutet, dass die unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster durch verschieden lokalisierte Kinase beim Transportproteins vom TMV unterschiedliche Funktionen haben (Haley *et al.*, 1995). Für das Transportprotein des ToMV wurde gezeigt, dass, obwohl es in zwei Serinresten phosphoryliert wird, nur eines dieser Phosphoserine für

Membranassoziiierung und für die Stabilität des Proteins verantwortlich ist (Kawakami *et al.*, 1996). Deswegen ist es wahrscheinlich, dass ein durch unterschiedliche Kinasen in unterschiedlichen Zellkompartimenten hervorgerufenes unterschiedliches Phosphorylierungsmuster ebenfalls verschiedene Funktionen beim 17kDa Protein haben.

#### **4.2.10 Interaktion von 17kDa Proteinen mit Wirtsproteinen**

Durch die Identifizierung von Protein-/Protein-Interaktionen zwischen dem Transportprotein vom TMV und Wirtsproteinen war man in der Lage verschiedene Stationen des Zell-zu-Zell-Transports vom TMV aufzuklären. So konnte man zeigen, dass das Virus von den Orten der viralen Replikation in Form von Protein-/RNA-Partikeln an Tubulinfilamenten zu den sekundären Plasmodesmata geleitet wurde. Durch Interaktion mit bislang nicht isolierten plasmodesmalen Proteinen, einem 38 kDa Protein und einer Interaktion mit einer Pektinmethylesterase erfolgt die Passage der Protein-/RNA-Partikel in die nächste Zelle (zusammenfassend siehe hierzu Citovsky, 1999). Die Identifizierung von Protein-/Protein-Interaktionen vom 17kDa Protein mit Wirtsproteinen könnte darüber Aufschluss geben, wie der Zell-zu-Zell-Transport des PLRV erfolgt. In Interaktionssichtungen einer TwoHybrid-cDNA-Bank aus Kartoffelblättern konnten keine cDNA isoliert werden, die für Proteine kodieren, die mit dem 17kDa Protein interagieren. Hierbei könnten die gleichen Gründe verantwortlich sein die schon unter 4.1.2 beschrieben wurden. Doch mit Hilfe von „Overlay Assays“ und „Pull down Assays“ konnten Proteine der Wirtspflanze von 45kDa und im Größenbereich von 15 bis 35kDa gezeigt werden, die mit dem 17kDa Protein vermutlich interagieren. Dies bedeutet einen ersten Schritt in Richtung der Identifizierung und Isolierung von Wirtsproteinen, die am viralen Transportprozess beteiligt sind.

#### **4.2.11 Ausblick**

Diese Arbeit zeigte, dass es Interaktionen zwischen Wirtsproteinen den PLRV Proteinen P0 und 17kDa gibt. Mit Hilfe einer Kombination von 2-dimensionaler Gelelektrophorese und „Overlay Assays“, und anschließender Proteinsequenzierung könnten in der Zukunft Proteine isoliert und beschrieben werden, welche mit diesen Proteinen interagieren. Ebenso könnten weiterführende biochemische Auffreinigungsmethoden der über „Pull down Assays“ identifizierten Proteinen, die mit dem P0 Protein oder dem 17kDa Protein kommunizieren zur Isolierung von Interaktionspartner dieser beiden viralen Proteine führen. Die Isolation von Pflanzenproteinen, die in Wechselwirkung mit dem P0 Protein treten, könnten Ausschluss über seine genauere Funktion geben. Für den viralen Transport könnte die Identifizierung von

Interaktionspartnern des 17kDa Protein Aufschluss über die Stationen des viralen Zell-zu-Zell-Transport vom PLRV geben.

Zellbiologische und molekulare Untersuchungen von PLRV-infizierten Pflanzen, die das P0 Protein exprimieren, könnte zeigen, ob das P0 Protein als PTGS-Inhibitor wirkt. Wäre dies der Fall, so müsste die ubiquitäre Expression von P0 Protein in Pflanzen bewirken, dass das PLRV die Beschränkung auf das Phloem durchbrechen könnte und somit anderen Zellen zu finden wäre. Es wäre darüber hinaus möglich, dass das P0 Protein als möglicher PTGS-Inhibitor in der Lage Gewebespezifität zu vermitteln, indem es nur in Phloemzellen das PTGS inhibieren kann. Dann müsste die Expression von P0 Protein in transgenen Pflanzen bei einer PLRV-Infektion dazu führen, dass sich im Vergleich zu untransformierten Pflanzen mehr PLRV im Phloem nachweisen lässt, die Phloemschranke aber nicht durchbrochen wird. Durch die Transformation von P0 exprimierenden Pflanzen mit speziellen cDNA-Konstrukten, die durch das so genannte „RNA interference“ das PTGS von korrespondierenden RNAs auslösen, kann nachgewiesen werden, dass das P0 Protein ein PTGS-Inhibitor ist.

Es konnte gezeigt werden, dass eine vermutlich an den Plasmodesmata lokalisierte Kinase das Serin<sup>71</sup> Ca<sup>2+</sup>-abhängig und PKC-Inhibitor-hemmbar phosphoryliert. Durch affinitätschromatographische Reinigung aus der Membran-/Zellwandfraktion von Blättern könnten Kinasen isoliert werden. Anhand der Identifizierung des Phosphorylierungsmotivs, der Korrelation mit der Lokalisation der Kinase und den Phosphorylierungscharakteristika, könnte die für die Phosphorylierung des 17kDa Proteins verantwortliche Kinase identifiziert werden.

Mit Hilfe von Immunogolddekorationen von Gewebeschnitten von Pflanzen, die Serin<sup>71</sup>-phosphorylungsdefiziente 17kDa Proteine exprimieren, könnte untersucht werden, ob diese Phosphorylierung in diesem Motiv, die Lokalisation an speziellen Plasmodesmata beeinflusst. Die Infektion von Kartoffelpflanzen mit mutiertem PLRV, das für ein phosphorylierungsdefizientes 17kDa Protein kodiert, könnte zeigen, ob die Phosphorylierung im Serin<sup>71</sup> einen Einfluss auf den Zell-zu-Zell-Transport hat.

## 5 Literaturverzeichnis

**Anadalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., Vance, V.B.** (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13079-13084

**Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J.M. (jr.) Mau, A., Pruss, G., Bowman, L., Vance, V.B.** (2000) A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **290**, 142-143

**Ashoub, A.** (1999) Molecular studies in transcriptional and translational regulation of potato leafroll luteovirus (PLRV) gene expression via subgenomic RNA synthesis and non-canonical translation initiation. *Universität zu Köln, Dissertation*

**Ashoub, A., Rohde, W., Prüfer, D.** (1998) *In planta* transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome. *Nucleic Acids Res.* **26**, 420-426

**Ausubel, F.m., Brent,R., Kingston, R.E., Moore, D.D.,Seidman, J.G.,Smith, J.A., Struhl, K.**(1994) Current Protocols in Molecular Biology. *Wiley, New York*

**Bahner, I., Lamb, J., Mayo, M.A., Hay, R.T.** (1990) Expression of the genome of potato leafroll virus: readthrough of the coat protein termination *in vivo*. *J. Gen. Virol.* **71**, 2251-2256

**Barker, H., Reavy, B., Kumar, A., Webster, K.D., Mayo, M.A.** (1992) *Ann. Appl. Biol.* **120**, 55-64

**Barker, H., Waterhouse, P.M.** (1999) The development of resistance to luteoviruses mediated by host genes and pathogen-derived transgenes. In: *The Luteoviruses*, Smith, H.G., Barker, H. (Ed.), *CABI Publishing, New York*

**Bevan, M.**(1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**, 8711-8721

**Birnboim, H. C., Doyle, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **12**, 8711-8721

- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J.** (1987) Improved silverstaining of plant proteins RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99
- Chandler, V.L. und Vaucheret, H.** (2001) Gene Activation and Gene Silencing. *Plant Physiol.* **125**, 145-148.
- Citovsky, V.** (1993a) Probing plasmodesmal transport with plant viruses. *Plant Physiol.* **102**, 1071-1076
- Citovsky, V.** (1999) Tobacco mosaic virus: A pioneer of cell-to-cell movement. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **354**, 637-643
- Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G., Zambryski, P.** (1990) The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *Cell* **60**, 637-647
- Citovsky, V., McLean, B.G., Supan, J.R., Zambryski, P.** (1993b) Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes Devel.* **7**, 904-910
- Clark, A.M., Jacobsen, K.R., Bostwick, D.E., Dannehofer, J.M., Skaggs, M.I., Thompson, G.A.** (1997) Molecular characterisation of a phloem-specific gene encoding the filament protein, phloem protein (PP1), from *Curcubita maxima*. *Plant J.* **12**, 49-61
- Cooper, B., Lapidot, M., Heick, J.A., Dodds, J.A., Beachy, R.N.** (1995) A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analogue increases susceptibility. *Virology* **206**, 2035-2038
- Corpert, F., Gouzy, J., Kahn, D.** (1998) The ProDom database of protein domain families. *Nucleic Acid Res.* **26**, 323-326
- D'Arcy, C.J., Mayo, M.A.** (1997) Proposals for changes in luteovirus taxonomy and nomenclature. *Arch. Virol.* **142**, 1285-1287
- Dehesh, K., van Cleve, B., Ryberg, M., Apel, K.** (1986) Light-induced changes in the distribution of the 36000 Mr polypeptide of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase within different cellular compartments of barley (*Hordeum vulgare* L.) I. Localisation by immunoblotting in isolated plastids and total leaf extracts. *Planta* **169**, 162-171

- Ding, B., Hauenschild, J.S., Hull, R.J., Wolf, S., Beachy, R.N., Lucas, W.J.** (1992) Secondary plasmodesmata are specific sites of localisation of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic plants. *Plant Cell* **4**, 915-928
- Ding, S.-W., Li, W.X., Simons, R.H.** (1995) A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J.* **14**, 5762-5772
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W.** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C.** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* **19** 1349
- Feinberg A.P., Vogelstein, B.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13
- Frangioni, J., V., Neel, B.G.** (1993) Solubilisation and purification of enzymatically active glutathione-S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.* **210**, 179-187
- Gietz, R.D., Jean, A.S., Woods, R.A., Schiestl, R.H.** (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells *Cell* **40**, 767-774
- Gramstat, A., Courtpozanis, A., Rohde, W.** (1990) The 12 kDa protein of potato virus M displays properties of a nucleic acid-binding regulatory protein. *FEBS Lett.* **243**, 103-114
- Haley, A., Hunter, T., Kibertis, P., Zimmermann, D.** (1995) Multiple serine phosphorylation sites on the 30 kDa TMV cell-to-cell movement protein synthesized in tobacco protoplast. *Plant J.* **8**, 715-724
- Hames, B.D., Rickwood, D.** (1981) Gel electrophoresis of proteins. *IRL Press Oxford*
- Hamilton, A., Baulcombe, D.** (1999) A novel species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing. *Science* **286**, 950-952
- Hanahan, D.**(1985) In Glover, D.M. (Ed.), DNA Cloning –A Practical Approach. *IRL Press, Oxford*, **1**, 109-135



**Hanks, S.K., Quinn, A.M.** (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members *Academic Press. Inc., London*, pp. 39-81 In: (Hunter, T., Sefton, B.M. ed.) *Methods of Emzymology Vol. 200*

**He, Z.-H., Fujiki, M., Kohorn, B.** (1996) A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 19789-19793

**Herbers, K., Tacke, E., Hazirezei, M., Krause, K.-P., Wielzer, M., Rohde, W., Sonnewald, U.** (1997) Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. *Plant J.* **12**, 1045-1056

**Hoekema, A., Hirsch, P., Hooykaas, P., Schilperoort, R.A.** (1983), A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of a *A. tumefaciens*. *Nature* **303**, 179-180

**Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L., Bairoch, A.** (1999), The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids. Res.* **27**, 215-219

**Hogehout, S.A., van der Wilk, F., Verbeek, M., Goldbach, R.W., van den Heuvel, J.F.** (2000) Identifying the determinins in the equatorial domain of *Buchera* GroEL implicated in binding potato leafroll virus. *J. Virol.* **74**, 4541-4548

**Jolly, C.A., Mayo, M.A.** (1994) Changes in the amino acid sequence of the coat protein readthrough domain of the potato leafroll luteovirus affect the formation of an epitope and aphid transmission. *Virology* **201**, 182-185

**Karpova, O.V., Rodionova, N.P., Ivanov, K.I., Kozlovsky, S.V., Dorokhov, Y.L., Atabekov, J.G.** (1999) Phosphorylation of tobacco mosaic virus movement protein abolishes its translation repressing ability. *Virology* **261**, 20-24

**Karpova, O.V., Ivanov K.I., Rodionova, N.p., Dorokhov, Y.L., Atabekov, J.G** (1997) Nontranslatability and dissimilar behavior in plants and protoplasts of viral RNA and movement protein complexes formed *in vitro*. *Virology* **3** 111-121

**Kawakami, S., Padgett, H.S., Hosokawa, D., Okada, Y., Beachy, R.N., Watanabe, Y.** (1999) Phosphorylation and/or presence of serine 37 in the movement protein of tomato

mosaic tobamovirus is essential for intracellular localisation and stability *in vivo*. *J. Virology* **73**, 6831-6840

**Kawchuk, L., Prüfer D.** (2000) Commercialization of genetically engineered potato plants resistant to disease. *Elsevier Science B.V.* (2000) pp.166-171

**Kawchuk, L.M., Martin, R.R., Mc Pherson, J.** (1990) Resistance in transgenic potato plants expressing the potato leafroll virus coat protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**, 301-307

**Kawchuk, L.M., Martin, R.R., Mc Pherson, J.** (1991) Sense and antisense RNA mediated resistance to potato leafroll virus in Russett Burbank potato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 247-253

**Kierdorf, M.**(1999) Etablierung eines „Yeast Two-Hybrid“-Systems für das Studium Replikase-assoziiierter Pflanzenproteine im Pathosystem Blattrollvirus/Kartoffel. *Universität zu Köln, Diplomarbeit*

**Kragler, F., Monzer, J., Shash, K., Xoconostle-Cázares, B., Lucas, W.J.** (1998) Cell-to-cell transport of proteins: Requirement for unfolding and characterisation of binding to a putative plasmodesmal receptor. *Plant J.* **15**, 367-381

**Kragler, F., Monzer, J., Xoconostle-Cázares, B., Lucas, W.J.** (2000) Peptide antagonists of the plasmodesmal macromolecular trafficking pathway. *EMBO J.* **19 (12)**, 2856-2868

**Kuhn, C., Franceschi, V.R., Schultz, A., Lemoine, R., Frommer, W.B.** (1997) Macromolar Trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleated sieve elements. *Science* **275**, 1298-1300

**Lämmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

**Lapidot, M., Gafny, R., Ding, B., Wolf, S., Lucas, W.J., Beachy, R.N.** (1993) A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant J.* **4**, 959-970

**Lazarowitz, S.G., Beachy, R.N.** (1999) Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants, *Plant Cell* **11**, 535-548

- Leiser, R.M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Lemaire, O., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G.** (1992) Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows virus. *Proc. Nat. Acad. USA* **89**, 9136-9140
- Leisner, S.M., Howell, S.H.** (1993) Long-distance movement of viruses in plants. *Trends Microbiol.* **1**, 314-317
- Li, H.-W., Lucy, A.P., Guo, H.-S., Li, W.-X., Ji, L.-H., Wong, S.-M., Ding, S.-W.** (1999) Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO J.* **18**, 2683-2691
- Llave, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C.** (2000) Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc. Nat. Acad. USA* **97**, 13401-13406
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** (1951) Protein measurement within the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-275
- Lucas, W.J.** (1998) Plasmodesmata and the cell-to-cell transport of proteins and nucleoprotein complexes. *J. Exp. Botany* **50** 979-987
- Lucas, W.J., Balachandran, S., Park, J., Wolf, S.** (1996) Plasmodesmatal companion cell-mesophyll communication in the control over carbon metabolism and phloem transport: insights gained from viral movement proteins. *J. Exp. Botany.* **47**, 1119-1128
- Lucas, W.J., Ding, B., van der Schoot, C.** (1993) Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytologist* **125**, 435-476
- Lucas, W.J., Gilbertson, R.L.** (1994) Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *An. Rev. Phytopathology* **32**, 387-411
- Ma, J., Ptashne, M.** (1987) Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments *Cell* **48**, 847-853
- Matsushita, Y., Hanazawa, K., Yoshioky, K., Oguchi, T., Kawakami, S., Watanabe, Y., Nishiguchi, M., Nyunoya, H.** (2000) *In vitro* phosphorylation of the movement protein of tomato mosaic tobamovirus by a cellular kinase. *J. Gen. Virol.* **81**, 2095-2102

**Matthews, R.E.F.** (1992) Fundamentals of Plant Virology. *Academic Press, New York, Inc.*

**Mayo M.A., Robinson, D.J., Jolly, C.A., Hyman, L.**(1989) Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA. *J. Gen. Virol.* **70**, 1037-1051

**Mayo, M.A., Barker, H., Robinson, D.J., Tamada, T., Harrison, B.D.** (1982) Evidence that potato leafroll virus RNA is positive-stranded, is linked to a small protein and does not contain polyadenylate. *J. Gen. Virol.* **59**, 163-167

**Mayo, M.A., Ziegler-Graff, V.** (1996) Molecular biology of luteoviruses. *Adv. Vir. Res.* **46**, 413-460

**Miller, J.S., Mayo, M.A.** (1991) The location of the 5' end of the potato leafroll luteovirus subgenomic coat protein mRNA. *J. Gen. Virol.* **72**, 2633-2638

**Morra, M.R., Petty, I.T.D.** (2000) Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell* **12**, 2259-2270

**Olesinski, A.A., Almon, E., Navod, N., Perl, A., Galun, E., Lucas, W.J., Wolf, S.** (1996) Tissue-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic potato plants alters plasmodesmal function and carbohydrate partitioning. *Plant Physiol.* **111**, 541-550

**Oparka, K.J., Turgeon, R.** (1999) Sieve elements and companion cells –traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* **11**, 739-750

**Pascal, E., Goodlove, P.E., Wu, L.C., Lazarowitz, S.G.**(1993) Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. *Plant Cell* **5**, 795-807

**Prüfer, D., Kawchuk, L., Monecke, M., Nowak, S., Fischer, R., Rohde, W.** (1999) Immunological analysis of potato leafroll luteovirus (PLRV) P1 expression identifies a 25 kDa RNA-binding protein derived via P1 processing. *Nucleic Acids Res.* **27**, 421-425

**Prüfer, D., Tacke, E., Schmitz, J., Kull, B., Kaufmann, A., Rohde, W.** (1992) Ribosomal frameshifting in plants: A novel signal directs the -1 frameshift in the synthesis of the putative replicase of potato leafroll luteovirus. *EMBO J.* **11**, 1111-1117

- Radcliff, F., Harrison, B.D., Baulcombe, D. C.** (1997) A similarity between viral defence and gene silencing in plants. *Science* **276**, 1558-1560
- Reutenauer, A., Ziegler-Graff, V., Lot, H., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G.** (1993) Identification of beet western yellows luteovirus genes implicated in viral replication and particle morphogenesis. *Virology* **195**, 692-699
- Rich, A.E.** (1983) Potato diseases. *Academic Press London*, pp. 93-119
- Rost, B.** (1996) PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks. *Meth. Enzym.* **266**, 525-539
- Ryabov, E.V., Fraser, G., Mayo, M.A., Barker, H., Taliansky, M.** (2001) Umbravirus gene expression helps potato leafroll virus to invade mesophyll tissues and to be transmitted mechanically between plants. *Virology* **286**, 363-372
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning –a laboratory manual. *Cold Spring harbour laboratory, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbour*
- Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prüfer, D., Rohde, W., Rohrfritsch, O.** (1997) *In situ* localisation of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* **235**, 311-322
- Shikegawa, K., Dower, W.J.** (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach of the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* **6**, 742-751
- Syller, J., Marczewski, W., Queen, C., Rosenberg, M.** (1987) Transmission by aphids of potato spindle tuber viroid encapsidated by potato leafroll luteovirus particles. *Europ. J. of Plant Pathol.* **103**, 285-289
- Smith, H.G., Barker, H.** (1999) The Luteoviridae. *CABI Publishing, New York*
- Sokolova, M., Prüfer, D., Tacke, E., Rohde, W.** (1997) The potato leafroll virus 17k movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett.* **400**, 201-205

**Spaar, O., Kleinhempel, H.** (1985) Bekämpfung von Viruskrankheiten der Kulturpflanzen. *Landwirtschaftsverlag Berlin (1989), Berlin*

**Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W.** (1990) Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89

**Tacke, E., Salamini, F., Rohde, W.** (1996) Genetic engineering of potato for broadspectrum protection against virus infection. *Nature Biotechnology* **14**, 1597-1601

**Tacke, E., Prüfer, D., Salamini, F., Rohde, W.** (1990) Characterisation of potato leafroll luteovirus subgenomic RNA: Differential expression by internal translation initiation and UAG suppression. *J. Gen. Virol.* **71**, 2265-2272

**Tacke, E., Prüfer, D., Schmitz, J., Rohde, W.** (1991) The potato leafroll luteovirus 17k is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *J. Gen. Virol.* **72**, 2035-2038

**Tacke, E., Schmitz, J., Prüfer, D., Rohde, W.** (1993) Mutational analysis of the nucleic-acid-binding 17 kDa phosphoprotein of the potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic  $\alpha$ -helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* **197**, 274-282

**Terry, B.R., Robards, A.W.** (1987) Hydrodynamic radius alone governs the mobility of molecules through plasmodesmata. *Planta* **171**, 145-157

**Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B. Schell, J., Steinbiss, H.H.** (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.* **15**, 5890

**Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354

**van Bel, A.J.E.** (1993) Strategies of phloem loading. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* **44**, 253-281

**Van der Wilk, F., Houterman, P., Molthoff, J., Hans, F., Dekker, B., van der Heuvel, J., Huttinga, H., Goldbach, R.** (1997) Expression of the potato leafroll virus ORF0 induces viral disease symptoms in transgenic potato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 153-159

- Van der Wilk, F., Verbeek, M.,m Dullemans, R.M., van den Heuvel, J.F.J.M.** (1997b) The genome-linked protein is located downstream of the putative protease domain of the ORF1 product. *Virology* **234**, 300-303
- Van der Wilk, F., Willink, D. P.-L., Huisman, M.J., Huttinga, H., Goldbach, R.** (1991) Expression of the potato leafroll coat protein gene in transgenic potato plants inhibits viral infection. *Plant Molecular Biology* **17**, 431-439
- Veidt, I., Lot, H., Leiser, M., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G.** (1992) Synthesis of fulllength transcripts of beet western yellows virus RNA: messenger properties and biological activity in protoplast. *Virology* **186**, 192-200
- Voinnet, O., Pinto, Y.,M., Baulcombe, D.C.** (1999) Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14147-14152
- Wagman, E., Chen, M.-H., Bachmaier, R., Ghoshroy, S., Citovsky, V.** (2000) Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *EMBO J.* **19**, 4875-4884
- Wagman, E., Zambryski, P.** (1994) Plasmodesmata: Gateways for rapid information transfer. *Curr. Biol.* **4**, 713-716
- Waterhouse, P.M., Gildow, F.E., Jonstone, G.R.** (1988) Luteovirus Group. *AAB Description of Plant Viruses No 339*, 455-464
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., Wang, M.-B.** (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13959-13964
- Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N., Lucas, W.J.** (1989) Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* **246**, 377-379
- Xoconostle-Cázares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H.-L., Monzer, J., Yoo, B.-C., McFarland, K.C., Franceschi, V.R., Lucas, W.J.** (1999) Plant paralog to viral movement protein potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* **283**, 94-98

## 6 Anhang

### 6.1 Verwendete Oligonukleotide

#### 6.1.1 Oligos für PCR und Sequenzierungen

##### „Vektorprimer“:

genutzt für die Vektoren pSP72, pSP64 und pBluescript:

PT7            5'-gtaatacgaactcactatag-3'

PSP6           5'-catacatttaggtgacac-3'

genutzt für den Vektor pGEX -3X:

PGEX FW      5'-gggctggcaagccacgtttggtg-3'

PGEX RV      5'-ccgggagctgcatgtgtcagagg-3'

genutzt für den Vektor pRT101:

35Sfw         5'-cttcgcaagacccttctc-3'

pRTrv         5'-gagagagactggtgattt-3'

##### „P0 Primer“

PORF0FW      5'-atg att gta ttg acc cag tc-3'

PORF0RV      5'-ctt ttg gag aaa gct gcc ctc-3'

P0rvPstI      5'-gggg ctg cag tca ttc ttg taa ttc ctt ttg-3'

##### „17kDa Primer“

17kDarv        5'-ggg gtc gac tca tcc gcg ctt gat aag ttt tgg-3'

17kDafw        5'-ggg gaa ttc ccg atg tca atg gtg gtg tac-3'

#### 6.1.2 Oligos für Mutagenesen und Klonierungen von Teillängenkonstrukten

„P0 cDNA Primer“ für Teillängenkonstrukte

Zur Klonierung von C1: doppeltes Stoppkodon eingefügt (fett)

P0Mut1        5'-aca ggc ttt cct **tga taa** ctt ctc ctg cag-3'

Zur Klonierung von C2: doppeltes Stoppkodon eingefügt (fett)

P0Mut2        5'-ccc gct ata caa **tga taa** atc gtg ggc ctt acc-3'

Zur Klonierung von C3: doppeltes Stoppkodon eingefügt (fett)

P0Mut3        5'-gac cca acc acc **tga taa** gcc gcc gct tac-3'



Zur Klonierung von C4: Pst I-Schnittstelle (unterstrichen) angefügt, reverse Sequenz; in Kombination mit PORF0FW verwendet

P04rvPstI 5'-gggg ctg cag aaa gtc cag acg tat caa aca aag tga tc-3'

Zur Klonierung von N1: Eco RI-Schnittstelle angefügt (unterstrichen); ; in Kombination mit P0rvPstI verwendet

P01NEcoRI 5'-gggg gaa ttc tcc atg gct ctt ctc ctg cag caa gcg ag-3'

Zur Klonierung von N2: Eco RI-Schnittstelle angefügt (unterstrichen); ; in Kombination mit P0rvPstI verwendet

P02NEcoRI 5'-gggg gaa ttc tcc atg gct atc gtg ggc ctt acc atc-3'

Zur Klonierung von N3: Eco RI-Schnittstelle angefügt (unterstrichen); ; in Kombination mit P0rvPstI verwendet

P03NEcoRI 5'-gggg gaa ttc tcc atg gct gcc gct tac aga tcg gag-3'

Zur Klonierung von N4: Eco RI-Schnittstelle angefügt (unterstrichen); ; in Kombination mit P0rvPstI verwendet

P04NEcoRI 5'-gggg gaattc tcc atg gct cct ctg gac ttt cag cat-3'

### **17kDa Primer für Mutagenesen und Teillängenkonstrukte:**

Für alle 17kDaC Konstrukte verwendet; Eco RI-Schnittstelle angefügt (unterstrichen)

17kDaCfw 5'-ggg gaa ttc ccc gag gac gag gct caa gcg-3'

Zur Klonierungen von GST-17kDa-C S<sup>x</sup>•A: Ausgetauschte Nukleotide (fett) für zum Aminosäureaustausch S gegen A

GST-17kDa-C S<sup>64</sup>•A:

PMut1 5'-gcg aga cat **g**cg tgt tta caa agg-3'

GST-17kDa-C S<sup>71</sup>•A:

PMut2 5'-agg aca acc **g**ca tgg gca act c-3'

GST-17kDa-C S<sup>79</sup>•A:

PMut3 5'-aag gaa gtt **g**ca cct tcg ggc-3'

GST-17kDa-C S<sup>81</sup>•A:

PMut4 5'-ggt tca cct **g**cg ggc cga gtc-3'

GST-17kDa-C S<sup>91</sup>•A:

PMut5 5'-gtc cgg cat **g**ca agg atg g-3'

GST-17kDa-C S<sup>101</sup>•A:

PMut6 5'-cct acc atg **g**ct ata aga tc-3'

PMut6rv 5'-tga tct tat **g**cc cat ggt agg-3'

GST-17kDa-C S<sup>118</sup>•A:

PMut7 5'-ttc agt tgc **gca** gcg agg cc-3'

GST-17kDa-C T<sup>70</sup>•A:

P17kDaT1 5'-tgt tta caa agg aca **gcc** tca tgg gca-3'

17kDaT1rv 5'-tgc cca tga **ggc** tgt cct ttg taa aca-3'

GST-17kDa-C T<sup>74</sup>•A:

17kDaT2 5'-tca tgg gca **gct** ccc aag gaa ctt-3'

17kDaT2rv 5'-aag ttc ctt ggg agc tgc cca tga-3'

GST-17kDa-C S<sup>71</sup>•D:

P17kDaAspfw 5'-agg aca acc **gat** tgg gca act-3'

P17kDaAsprv 5'-agt tgc cca **atc** ggt tgt cct-3'

pBIN19 17kDa S<sup>71</sup>•A:

P17kDaMut2rv 5'-g agt ggc cca tgc ggt tgt cct-3'

(revers zu PMut2)

17kDaC-His 5'-cccccc gga tcc **gtg atg gtg atg gtg atg** tca tcc gcg ctt gat aag ttt tgg-3'

(revers, angefügt: 6 x His-Tag (fett) und Eco RI-Schnittstelle)

Zur Klonierung von GST-17kDa-C3: zusammen mit 17kDaCfw verwendet

17kDaC3 5'-ggggg ctg cag ggt tgt cct ttg taa aca cga atg tet cgc ttg agc etc-3'

(revers; Pst I-Schnittstelle angefügt)

Zur Klonierung von GST-17kDa-C4:

17kDaC4fw 5'-ggggg gaa ttc tgt tta caa agg aca acc tca tgg gca-3'

(Eco RI-Schnittstelle [unterstrichen] angefügt)

17kDaC4rv 5'-ggggg ctg cag aac ttc ctg gga gtt gcc cat gag gt-3'

(revers; Pst I-Schnittstelle [unterstrichen] angefügt)

Zur Klonierung von GST-17kDa-C4: zusammen mit 17kDarv verwendet

17kDaC6fw 5'-ggggg gaa ttc tgg gca act ccc aag gaa g-3'

(Eco RI-Schnittstelle [unterstrichen] angefügt)

## 6.2 Hergestellte P0 Proteinkonstrukte und transgene Pflanzenlinien, die diese Konstrukte exprimieren

Konstrukt	Bereich im P0 Protein	exprimiert in Pflanzenlinie:
P0	Gesamtprotein (AS 1 bis 247)	DP 4-2b (Prüfer)
C1	AS 1 bis 31	C1/A6; C1/4,8,14,15,18,21,24,26
C2	AS 1 bis 62	C2/1,4,5,10,11,12,13
C3	AS 1 bis 98	C3/1,2
C4	AS 1 bis 113	C4/H7
N1	AS 32 bis 247	N1/M3; N1/3,4,5,7,9,10,13,14,15,16,29
N2	AS 63 bis 247	N2/I4, N2/I5; N2/10,13,19,21,22,23,26,35
N3	AS 99 bis 247	N3/J3; N3/3,6,7,8,9,11,13,14,15
N4	AS 114 bis 247	N4/G8
N2C3	AS 63 bis 98	N2C3/F5

**Tabelle 5: Für die Pflanzentransformation hergestellte P0 Proteinkonstrukte, der Bereich, über den sie sich über den sie sich beim ursprünglichen P0 Protein erstrecken (angegeben sind die Aminosäurepositionen (AS), an denen die Konstrukte beginnen und enden) und die Pflanzenlinien, die diese Konstrukte exprimieren**

### 6.3 Für Phosphorylierungsexperimente hergestellte 17kDa Proteinkonstrukte und ihre Phosphorylierbarkeit

Konstrukt	Bereich im 17kDa Protein	Aminosäureaustausch	Phosphorylierbarkeit
GST-17kDa-C	AS 55 bis 157	-	ja (Membran-, Zellwandproteine, lösliche Proteine von Kartoffel und Tabak)
GST-17kDa-C S <sup>64</sup> •A	AS 55 bis 157	S <sup>64</sup> gegen A	ja
GST-17kDa-C T <sup>70</sup> •A	AS 55 bis 157	T <sup>70</sup> gegen A	ja
GST-17kDa-C S <sup>71</sup> •A	AS 55 bis 157	S <sup>71</sup> gegen A	nein (Membran- und Zellwandproteine aus Kartoffel und Tabak), ja (lösliche Proteine)
GST-17kDa-C T <sup>74</sup> •A	AS 55 bis 157	T <sup>74</sup> gegen A	ja
GST-17kDa-C S <sup>79</sup> •A	AS 55 bis 157	S <sup>79</sup> gegen A	ja
GST-17kDa-C S <sup>81</sup> •A	AS 55 bis 157	S <sup>81</sup> gegen A	ja
GST-17kDa-C S <sup>91</sup> •A	AS 55 bis 157	S <sup>91</sup> gegen A	ja
GST-17kDa-C S <sup>101</sup> •A	AS 55 bis 157	S <sup>101</sup> gegen A	ja
GST-17kDa-C S <sup>112</sup> •A	AS 55 bis 157	S <sup>112</sup> gegen A	ja
GST-17kDa-C S <sup>71</sup> •D	AS 55 bis 157	S <sup>71</sup> gegen D	nein (Membran- und Zellwandproteine aus Kartoffel und Tabak), ja (lösliche Proteine)
GST-17kDa-C3	AS 55 bis 70	-	(nein)
GST-17kDa-C4	AS 55 bis 78	-	ja (Membran- und Zellwandproteine aus Kartoffel)
GST-17kDa-C5	AS 72 bis 157	-	nein
Serin 71 Peptid	AS 65 bis 78	-	ja

**Tabelle 6: Hergestellte 17kDa Proteinkonstrukte, der Bereich, über den sie sich beim ursprünglichen 17kDa Protein erstrecken (angegeben sind die Aminosäurepositionen**

(AS), an denen die Konstrukte beginnen und enden), Veränderungen in den Konstrukten und die Ergebnisse aus den Phosphorylierungsexperimenten mit diesen Konstrukten

## 6.4 PLRV-Resistenztests

PLRV-Resistenztest Versuchsreihe 1							
	17kDa/13	17kDa/14	17kDa/16	M2/19	M2/21	M2/24	WT1
<b>Elisa Tag 0</b>							
<b>Pflanze1</b>	0,466	0,213	0,387	0,399	0,394	1,067	0,347
2	0,414	0,736	0,815	0,305	0,274	0,236	0,274
3	0,488	0,303	0,151	0,614	0,506	tot	0,468
4	0,639	tot	0,795	0,4	0,396	0,779	0,257
5	0,337	0,461	0,236	0,454	0,584	0,558	0,88
6	tot	0,306	tot	0,306	0,366	0,537	tot
7	tot	0,311	0,322	0,326	0,806	0,319	0,477
8	tot	0,416	tot	0,268	0,311	0,417	tot
<b>Durchschnitt</b>	0,469	0,392	0,451	0,384	0,455	0,559	0,451
<b>St.-Abweichung</b>	0,172	0,285	0,112	0,174	0,285	0,321	0,271
<b>neg. Kontrolle 1</b>	0,049	0,053	0,051	0,055	0,048	0,048	0,05
2	0,05	0,057		0,051	0,05	0,05	0,039
<b>Elisa Tag 36</b>							
<b>Pflanze1</b>	0,299	0,18	0,247	0,281	0,311	0,756	0,244
2	0,272	0,537	0,627	0,197	0,325	0,164	0,172
3	0,274	0,233	0,18	0,428	0,276	tot	0,256
4	0,433	0,307	0,639	0,274	0,302	0,685	0,185
5	0,242	0,199	0,158	0,376	0,407	0,373	0,671
6	tot	0,219	0,245	0,202	0,249	0,388	tot
7	tot	0,287	tot	0,237	0,637	0,229	0,298
8	tot	tot	tot	0,171	0,199	0,287	tot
<b>Durchschnitt</b>	0,304	0,28	0,349	0,271	0,338	0,412	0,304
<b>St.-Abweichung</b>	0,122	0,223	0,09	0,135	0,226	0,234	0,258
<b>neg. Kontrolle 1</b>	0,06	0,07	0,072	0,073	0,06	0,065	0,07
2	0,072	0,071	tot	0,083	0,064	0,075	0,082

**PLRV-Resistenztests Versuchsreihe 2**

17kDa/6	M2/22	RT14	RT15	WT2
---------	-------	------	------	-----

**Elisa Tag 0**

Pflanze1	0,892	1,075	1,217	1,353	1,314
2	1,353	0,784	0,958	1,038	1,211
3	1,314		0,948	1,186	1,244
4	1,303	1,257	0,936	0,814	1,079
5	1,01	0,41	tot	1,102	1,252
6	1,146	1,057	0,836	0,949	1,435
7	1,128	0,945	0,783	0,354	1,287
8	1,15	0,836	0,857	tot	0,874
<b>Durchschnitt</b>	<b>1,162</b>	<b>0,9091</b>	<b>0,9336</b>	<b>0,9709</b>	<b>1,212</b>
<b>St.-Abweichung</b>	<b>0,159</b>	<b>0,271</b>	<b>0,141</b>	<b>0,321</b>	<b>0,169</b>
neg. Kontrolle 1	0,213	0,183	0,167	0,159	1,221
2	0,206	0,853	0,148	0,23	0,223

**Elisa Tag 36**

Pflanze1	0,661	0,82	0,989	1,119	1,207
2	1,158	0,767	0,899	1,043	1,134
3	1,18	tot	0,933	0,944	1,129
4	1,346	1,167	0,824	0,777	0,907
5	0,922	0,367	tot	0,832	1,158
6	0,947	0,953	0,709	0,773	1,287
7	0,943	0,663	0,699	0,403	1,199
8	0,897	0,593	0,719	tot	1,039
<b>Durchschnitt</b>	<b>1,005</b>	<b>0,7614</b>	<b>0,8246</b>	<b>0,8416</b>	<b>1,1325</b>
<b>St.-Abweichung</b>	<b>0,212</b>	<b>0,258</b>	<b>0,119</b>	<b>0,234</b>	<b>0,11594334</b>
neg. Kontrolle 1	0,15	0,135	0,193	0,135	1,115
2	0,123	0,655	0,146	0,199	0,132

**Tabelle 7: Ergebnisse der PLRV-Resistenztests: gemessene PLRV-Titer in den ELISA-Tests (optische Messungen bei OD<sub>450</sub>)**

## **7 Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Francesco Salamini für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine Gesprächsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. Wolfgang Rohde und Herrn Dr. Dirk Prüfer danke ich für die spannende Themenstellung und ihre Betreuung. Dirk danke ich zusätzlich für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. Uwe Sonnewald und Daniel Hofius (IPK Gatersleben) danke ich für ihre Kooperation und die Zuckermessungen. Prof. Dr. Larry Kawschuk und seinen Mitarbeitern sei herzlichen Dank für die Durchführung der PLRV-Resistenztests.

Mike, Ahmed, Mervat, Hannah, Alice, Vladimir, Holger, Peter danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, dafür, dass sie tolle Kollegen waren, und für so etliche Kaffees und Zigaretten. Ein besonderer Dank sei außerdem an Alice gerichtet für die Einführung in die „Kunst der Pflanzensterilkultur und Transformation von Kartoffeln“.

Dr. Joachim Uhrig sei gedankt für seine konstruktive Kritik an der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge sei Dank für die Übernahme des Koreferats und die Begleitung meiner Doktorandenzeit als Leiter des Graduiertenkollegs.

Alles Mitdokoranden des Graduiertenkollegs „Molekulare Entwicklungsprozesse bei Pflanzen“, insbesondere Kirstin, Ani, Heike und Heike, einen „Herzlichsten“ für Diskussionen, Anregungen und Spaß.

Kirstin gilt mein besonderer Dank für ihren moralischen Beistand, ihre motivierenden Worte und für die Korrektur dieser Arbeit.

## 8 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen Untersuchungen der PLRV-Proteine P0 und 17kDa.

Durch Expression von P0 Teilproteinen in Kartoffel gezeigt werden, dass zur wirtsspezifischer Ausbildung von Krankheitsymptomen durch das P0 Protein das gesamte Protein notwendig ist. Die Identifikation von Wirtspoteinen, welche mit dem P0 Protein wechselwirken, könnte Aufschluß, auf die Funktion des P0 Proteins geben. Hier konnte dargestellt werden, dass das P0 Protein mit einem 42 kDa Protein aus der Membranfraktion von Kartoffel interagiert. Das P0 Protein könnte am Zell-zu-Zell-Transport beteiligt sein, wofür eine Interaktion mit dem 17kDa Protein nahe liegt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Interaktion zwischen P0 und 17kDa Protein unwahrscheinlich ist.

Durch *in vitro* Phosphorylierungsexperimente an mutierten 17kDa Proteinen, 17kDa Teilproteinen und einem synthetischen 17kDa Peptid konnte nachgewiesen, dass das Serin<sup>71</sup> das einzige Motiv ist, das *in vitro* durch Kartoffelmembranfraktion phosphoryliert wird. Durch Vergleich der Charakteristika der Phosphorylierung im Serin<sup>71</sup> mit denen des gesamten Proteins zeigte, dass das Serin<sup>71</sup> das Ziel der gleichen Kinase ist. Außerdem konnte das 17kDa Protein durch Zellwandfraktionen und von Fraktionen löslicher Proteine phosphoryliert werden. Während in Membranfraktion und Zellwandfraktion die gleiche Phosphorylierungsaktivität gefunden wurde, wird durch die Fraktion löslicher Proteine andere Motive im 17kDa Protein phosphoryliert. DNA-/RNA-Bindungsstudien an mutierte 17k Proteine zeigte, dass der Phosphorylierungsstatus des 17k Proteins keinen Einfluss auf dessen RNA-Bindungseigenschaften hat und somit keinen Regulationsmechanismus zur RNA-Bindung darstellt.

In dieser Arbeit wurden transgene Pflanzen erzeugt, das unverändertes oder Serin<sup>71</sup>-defizientes 17kDa Protein exprimieren. Untersuchungen an diesen Pflanzen zeigten, dass die Phosphorylierung im Serin<sup>71</sup> keinen Einfluss auf die Lokalisation des 17kDa Proteins hat. Diese Pflanzen zeigten außerdem keine Änderung im Zuckerhaushalt. Auch führte die Expression des Serin<sup>71</sup>-defizienten 17kDa Protein zu keiner Toleranz der Pflanzen gegenüber PLRV-Infektionen. Anhand dieser Pflanzen wurde *in planta* eine Multiphosphorylierung nachgewiesen. Abschließend wurden Interaktionen vom 17kDa Protein mit verschiedenen Pflanzenproteinen dargestellt.



## 9 Abstract

Expression of the P0 protein leads hostspecifically to a disease-symptom-like phenotype in transgenic potato plants. Here, it could be shown, that for the symptom-induction the whole P0 protein is necessary. For the transmission of host specificity of the PLRV infection the interaction of the P0 protein with host proteins is postulated. An overlay assay reveals an interaction of the P0 protein with a 42 kDa protein of the membrane fraction of potato leaves. P0 protein might be involved in cell-to-cell movement of PLRV. Therefore, an interaction between the P0 protein and the 17kDa protein can be assumed. Interaction studies obtained by pull down assays as well as overlay assays showed, that an interaction between P0 protein and 17kDa protein is unlikely. Thus, it is unlikely, too, that the P0 protein acts in cell to cell movement.

Phosphorylation studies of different mutated 17kDa proteins, partial 17kDa proteins and a synthetic 17kDa peptide identified serine<sup>71</sup> as the only target of phosphorylation *in vitro*. The characteristics of the phosphorylation of serine<sup>71</sup> are identical to these of the whole protein described by Sokolova *et al.* (1997) The same kinase activity could be found in cell wall fractions from potato leaves. However, an additional kinase activity for 17kDa phosphorylation could be found in the fraction of soluble proteins. In this case other motifs than the Serine<sup>71</sup> were used. It seems, that a successive phosphorylation of the 17kDa proteins by kinases might occur in different cellular compartments. RNA-/DNA-binding experiments with 17kDa protein showed, that the phosphorylation status of the 17kDa proteins does not alter the 17kDa proteins affinity to RNA. Therefore, the de-/phosphorylation of the 17kDa protein is not a regulative mechanism for the aggregation of 17kDa protein with RNA.

Analysis of potato plants, which expresses 17kDa protein or serine<sup>71</sup> knock-out 17kDa protein, revealed, that the phosphorylationstatus in the motif serine<sup>71</sup> does not influence the localisation of the 17kDa protein. Further, it could be shown, that alteration of the phosphorylation pattern of the 17kDa protein does not alter sugar metabolism in transgenic plants. Furthermore, no increased PLRV resistance was visible after expression of the serine<sup>71</sup> phosphorylation deficient 17kDa protein in transgenic potato plants.

Detection of phosphoserines within unmutated and serine<sup>71</sup> knock-out 17kDa proteins in transgenic plants indicated, that *in planta* a multiphosphorylation of the 17kDa proteins occurs.

During cell-to-cell movement an interaction between 17kDa protein and host proteins must take place. Here, interactions between 17kDa protein and a 45 kDa membrane protein and some proteins in the range of 25 and 35 kDa could be detected.

## **Erklärung**

"Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. F. Salamini betreut worden."

Teilpublikationen: keine

## Lebenslauf

Brigitte Paap  
Kolibriweg 14  
50829 Köln  
Tel.: 0221-5802203  
Email: paapbrigitte@hotmail.com

### Angaben zur Person

Name: Brigitte Katrin Paap  
Geburtsdatum: 19.03.1969  
Geburtsort: Preetz  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Christel Paap, geb. Klonikowski, Kurt Paap

### Schulbildung:

1976 bis 1980 Hermann-Ehlers-Grundschule in Preetz  
1980 bis 1988 Friedrich-Schiller-Gymnasium in Preetz

### Berufausbildung:

1988 bis 1991 Fotografenlehre bei „Foto Carstens“ in Kiel

### Studium:

1991 bis 1997 Biologiestudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
WS 1993/94 Vordiplom (Zoologie, Botanik, Chemie, Mathematik)  
WS 1995/96 Diplomprüfungen (Botanik, Zoologie und Biochemie)  
Febr. 1996 bis Febr. 97  
Diplomarbeit am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Thema: Analysen zur Struktur und Funktion von CP12, einem kernkodiertem Plastidenprotein Höherer Pflanzen  
Betreuer: Prof. Dr. J. Soll  
Febr. 1997 bis 98 Arbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karin Krupinska am Botanischen Institut der Universität zu Köln  
Thema: Klonierung und Strukturanalysen von *hpd*-Genen aus Gerste und Soja und die Analysen von Expressionsmustern, Promotorelementen und Lokalisation der Proteine  
Seit 1998 Dissertation am MPI für Züchtungsforschung in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Rohde in der Abteilung von Prof. Dr. F. Salamini  
Thema: Wechselwirkungen zwischen Genprodukten des Kartoffelblattrollvirus (PLRV) und Wirtsfaktoren der Kartoffel (*Solanum tuberosum*)  
1997 bis 99 Doktorandenstipendium vom Graduiertenkolleg „Molekulare Analysen von Entwicklungsprozessen in Pflanzen“  
Seit 2000 Assoziiertes Mitglied des oben genannten Graduiertenkollegs

