

"Physiologische und molekulargenetische Charakterisierung PLRV-

MP17:GFP-exprimierender *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen"

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Kristin Kronberg
geb. am: 23.01.1979 in: Quedlinburg

Gutachter /in

1. Prof. Dr. U. Sonnewald
2. Prof. Dr. K. Humbeck
3. PD Dr. R. Stadler

Halle (Saale), den 19.01.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013093

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013093>]

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Plasmodesmen als symplastische Zell-zu-Zell-Verbindungen.....	1
1.2	Transport endogener und viraler Moleküle in Pflanzen	4
1.2.1	Assimilattransport.....	4
1.2.2	Transport von endogenen Makromolekülen	6
1.2.3	Der virale Transport	8
1.3	Faktoren, die Assimilattransport und Biomasseproduktion beeinflussen....	12
1.4	Zielsetzung der Arbeit	14
2	MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	16
2.2	Pflanzenmaterial und Anzucht.....	16
2.2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	16
2.2.2	<i>Nicotiana tabacum</i>	17
2.3	Bakterienstämme und Vektoren	17
2.4	Pflanzentransformation	18
2.4.1	Stabile Pflanzentransformation	18
2.4.2	Transiente Pflanzentransformation durch <i>Agrobacterium</i> -Infiltration...	19
2.5	Sterilisierung von Samen	19
2.6	Kreuzen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
2.7	Molekularbiologische Methoden	20
2.7.1	Allgemeine Verfahren der Nukleinsäure-Manipulation	20
2.7.2	Oligonukleotide und Sequenzierungen	21
2.7.3	Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen.....	21
2.7.4	Southern-Analyse.....	22
2.7.5	Isolierung pflanzlicher RNA, Northern-Analyse	22
2.7.6	Reverse Transkription	23
2.8	Proteinbiochemische Methoden	23
2.8.1	Western-Analyse.....	23
2.8.1.1	Entwicklung mittels Chemilumineszenz durch Meerrettich- Peroxidase und Quantifizierung von Immunosignalen	24

INHALTSVERZEICHNIS

2.8.1.2	Entwicklung mittels Farbreaktion durch alkalische Phosphatase .	24
2.8.2	Proteinfärbung mit Coomassie Brilliantblau	25
2.9	Physiologische Untersuchungen	25
2.9.1	Biomasse und Ertragsparameter.....	25
2.9.2	Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten und Stärke	26
2.9.3	Virusinfektion und immunologische Bestimmung des Virustiters	27
2.9.4	Bestimmung von Kallose.....	28
2.10	Mikroskopische Techniken	28
2.10.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	28
2.10.2	Transmissionselektronenmikroskopie und Immunolokalisierung	29
2.11	Statistische Analyse	29
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Die Auswirkung des <i>Potato leafroll virus</i> Movement Proteins (PLRV-MP17) auf das Wachstum transgener <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen ist Dosisabhängig	30
3.1.1	Primärcharakterisierung von MP17:GFP-transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Linien	31
3.1.2	Kohlenhydratstatus in MP17:GFP-transgenen <i>Arabidopsis</i> Col-0, <i>Ler</i> und C24.....	34
3.1.3	Verifizierung von Phänotyp und Biomasseverteilung	36
3.1.3.1	Änderung der vegetativen Blattbiomasse nach MP17-Expression	37
3.1.3.2	Bestimmung von generativer Blattbiomasse und Blühinduktionszeitpunkt	39
3.1.3.3	Untersuchungen zum Samenertrag und Ernteindex	42
3.1.4	Resistenzeigenschaften gegenüber der Infektion mit TuMV	46
3.1.5	Korrelationsanalyse der MP17:GFP-induzierten Veränderungen.....	48
3.1.6	Wachstumsspezifische Änderungen der Saccharoseexportraten	51
3.2	Einfluss der Größe des Movement Proteins auf die Phänotyp-Ausbildung	53
3.2.1	Expressionsanalyse in MP17-transgenen <i>Arabidopsis</i> C24.....	54
3.2.2	Phänotyp und Kohlenhydratstatus	55
3.2.3	Verteilung der generativen Biomasse	57

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.3.1	Untersuchung von generativer Blattbiomasse und Blühinduktionszeitpunkt.....	58
3.2.3.2	Untersuchungen zum Samenertrag und Ernteindex	60
3.3	Der MP17-vermittelte Phänotyp ist nicht Hitze-revertierbar.....	62
3.4	Zellspezifische MP17:GFP-Expression <i>Arabidopsis</i>	65
3.4.1	Konstrukte zur Zell-spezifischen Expression von MP17:GFP	66
3.4.2	Verifizierung der MP17:GFP-Expression in transgenen <i>Arabidopsis</i> -Linien.....	68
3.4.3	Zelluläre Lokalisierung von MP17:GFP	71
3.4.4	Änderungen des Kohlenhydratstatus nach Zell-spezifischer MP17:GFP-Expression.....	74
3.4.5	Einfluss der spezifischen Expression von MP17:GFP auf die Biomassen-Verteilung	77
3.4.5.1	Phänotyp, vegetative und generative Blattbiomasse.....	77
3.4.5.2	Untersuchungen zum Blühinduktionszeitpunkt und Ernteindex ...	81
3.4.6	Entwicklungsspezifische Saccharosetransportraten	85
3.5	Charakterisierung von <i>Arabidopsis</i> -Mutanten mit Defekten in putativen Pflanzenrezeptoren des PLRV-MP17	87
3.5.1	Molekulare Charakterisierung der MP17-Suppressormutanten.....	89
3.5.2	Reversion des MP17-induzierten Phänotyps in den MP17:GFP-Mutanten.....	92
3.5.3	Phytopathologische Charakterisierung.....	95
3.5.4	Genetische Analyse der Suppressormutanten	97
3.5.5	Erzeugung und Charakterisierung des Kreuzungspartners für die Kartierungspopulation.....	103
4	DISKUSSION	108
4.1	Dosis-abhängige Effekte von PLRV-MP17 auf Assimilattransport und Phänotypausprägung.....	109
4.1.1	Vegetative Wachstumsphase.....	109
4.1.1.1	Apoplastischer oder symplastischer Photoassimilatstrom?.....	110
4.1.1.2	Unterbrechung des plasmodesmalen Transportes in Linien mit hohem MP17:GFP-Proteingehalt und Auswirkungen auf den Phänotyp.....	111

INHALTSVERZEICHNIS

4.1.1.3	Erhöhte plasmodesmale Transporteigenschaften und Virusausbreitung	116
4.1.2	Reproduktive Wachstumsphase.....	118
4.1.2.1	MP17:GFP-Dosis-abhängige Effekte auf die Blühinduktion in <i>Arabidopsis</i>	118
4.1.2.2	Einfluss hoher MP17:GFP-Expression auf den Ernteindex.....	121
4.1.2.3	PD-Lokalisation und ihre physiologische Auswirkungen unter entwicklungsspezifischer Kontrolle.....	122
4.2	Zell-spezifische MP17-Assoziation und Modulation von Kohlenhydratstatus und Wachstum	124
4.2.1	MP17:GFP-Expression in chloroplastenhaltigen Zellen	124
4.2.2	Geleitzell-spezifische MP17:GFP-Expression	126
4.2.3	MP17:GFP-Expression in Bündelscheidenzellen	128
4.3	Vom Phänotyp zum Gen - Charakterisierung und Isolierung von MP17- Suppressormutanten zur genetischen Identifizierung von pflanzlichen MP17- Interaktionspartnern	129
5	ZUSAMMENFASSUNG	134
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	136
7	LITERATURVERZEICHNIS	139
8	ANHANG.....	i
I	Oligonukleotide.....	i
II	Kohlenhydratgehalte in MP17:GFP-transgenen <i>Arabidopsis</i>	ii
III	Biomasseverteilung in konstitutiv MP17:GFP-exprimierenden <i>Arabidopsis</i>	iii
IV	Biomasseverteilung in Col-0- <i>Arabidopsis</i> mit Zell-spezifischer MP17:GFP- Expression.....	iv
V	Kohlenhydratgehalte in <i>Arabidopsis</i> mit Zell-spezifischer MP17:GFP- Expression.....	v
VI	Ergänzende Bestimmung von Frisch- und Trockengewicht von MP17- und MP17:GFP transgenen <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen mit konstitutiver und spezifischer Expression.....	v

1 EINLEITUNG

1.1 Plasmodesmen als symplastische Zell-zu-Zell-Verbindungen

Plasmodesmen (PDs) sind einzigartige, Membran-durchspannende Kanäle in der Zellwand. Als solche verbinden sie benachbarte Pflanzenzellen und ermöglichen die Aufrechterhaltung der zytoplasmatischen Kontinuität für Zell-zu-Zell-Transport und – Kommunikation. PDs bilden das symplastische Netzwerk für die Bereitstellung von Photoassimilaten, den Energieträgern des pflanzlichen Stoffwechsels, in Richtung der kleinen Leitbündel ausgewachsener *source*-Blätter und tragen wesentlich zur Entladung der Kohlenhydrate und Aminosäuren in sich entwickelnde *sink*-Organe bei (Stitt, 1996; Imlau *et al.*, 1999; Baluska *et al.*, 2001; Haupt *et al.*, 2001; Viola *et al.*, 2001; Hoth *et al.*, 2005). Sie wurden früher lange Zeit als einfache Poren mit einem geringen Größenausschlussvolumen („Size exclusion limit“, SEL) angesehen, die nur den Durchtritt kleiner Metabolite erlaubten. In den letzten Jahren wurde jedoch gezeigt, dass PDs dynamische Strukturen bilden, welche auch den spezifischen Transport von größeren Molekülen, wie RNA- und Proteinmakromolekülen, bewerkstelligen, die an lokaler und systemischer Signalgebung beteiligt sind (Lucas und Lee, 2004; Oparka, 2004; Ruiz-Medrano *et al.* 2004; Kim und Zambryski, 2005). Neben der Beobachtung, dass sich die Architektur individueller PDs als Reaktion auf Umweltbedingungen beträchtlich ändern kann, wurden fundamentale Eingriffe in PD-Struktur und –Funktion während der Entwicklung und in verschiedenen Pflanzengewebe detektiert (Crawford und Zambryski, 2001; Roberts und Oparka, 2003; Zambryski, 2004; Liarzi und Epel, 2005).

Ausgehend von der Struktur werden zwei grundsätzliche PD-Typen unterschieden (s. Abb. 1-1, links). So genannte primäre PDs entstehen während der Zytokinese durch Positionierung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) zwischen fusionierenden Vesikeln der sich entwickelnden Zellplatte, wobei das ER in einen zusammengedrückten Zylinder umgewandelt wird (Hepler, 1982; Lucas *et al.*, 1993). Im Allgemeinen sind diese primären PDs lineare, einzelsträngige Einheiten und kommen vorrangig in niederen Pflanzen (Franceschi *et al.*, 1994; Cook *et al.* 1997) oder *sink*-Zellen junger Pflanzengewebe vor (Oparka *et al.*, 1999). Unverzweigte, einfache PDs

sind durch ein hohes SEL (<50 kDa) gekennzeichnet und ermöglichen den passiven Durchtritt eines Großteils der Phloemproteine (10-40 kDa) als auch von GFP (Oparka *et al.*, 1999; Oparka und Santa Cruz, 2000). Auch nach abgeschlossener Zytokinese können PDs quer durch etablierte Zellwände gebildet werden. Diese als sekundäre

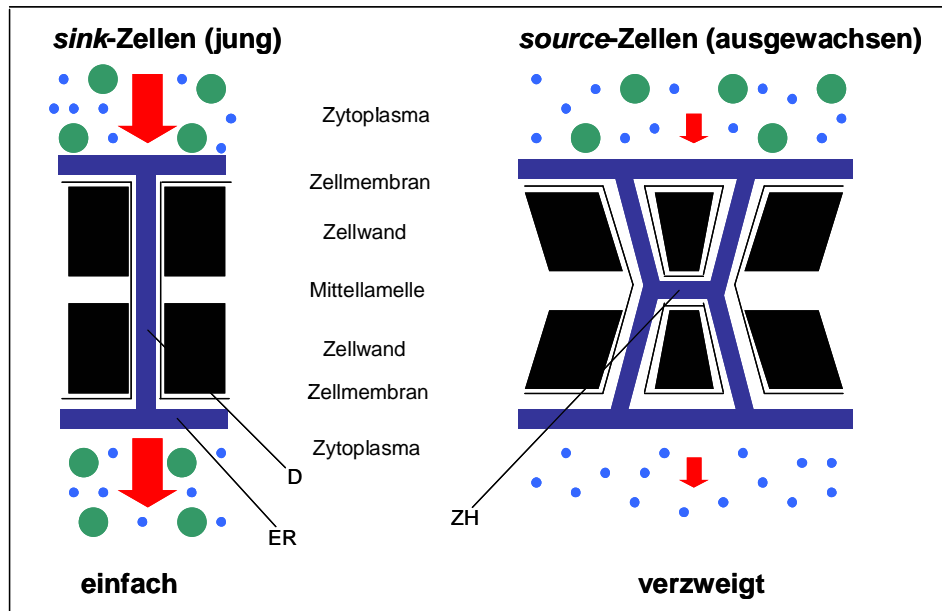


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der strukturellen Änderungen beim Übergang von einfachen zu verzweigten PDs

Während der Entwicklung von Assimilat-verbrauchenden *sink*-Zellen (z. B. junge Blätter) in Kohlenhydrat-produzierende *source*-Zellen (ausgewachsene Blätter) gehen einfache PD-Poren in komplexe, verzweigte Strukturen mit einer zentralen Höhle über. Diese Transformation erfolgt entlang der Mittellamelle der Zellwand über ein H-förmiges Intermediat, welches sich durch die Bildung einer neuen protoplasmatischen Brücke zwischen benachbarten, einfachen PDs zu bilden scheint. Verbunden damit nimmt das basale Größenausschlußvolumen (SEL) ab. Während Proteine bis 50 kDa durch einfache PDs transportiert werden (dicker Pfeil, grüne Kreise) sinkt das SEL verzeigter PDs auf etwa 1 kDa und ist lediglich für kleine Moleküle durchlässig (dünner Pfeil, blaue Kreise). D: Desmotubulus, ER: Endoplasmatisches Retikulum, PD: Plasmodesmos, ZH: Zentralhöhle. Modifiziert nach Pickard und Beachy (1999), Roberts und Oparka (2003).

PDs bezeichneten, verzweigten Strukturen bestehen aus zwei oder mehr Kanälen auf jeder Seite der Mittellamelle, welche oft durch eine Zentralhöhle verbunden sind (s. Abb. 1-1, rechts). Im Gegensatz zu einfachen PDs sind verzweigte PDs in ausgewachsenen Geweben weit verbreitet und stellen evolutionär fortgeschrittenere Strukturen dar (Lucas *et al.*, 1993; Oparka *et al.*, 1999). Neben der Neubildung zwischen Zellen verschiedener Abstammung (Kollmann und Glockmann, 1985; Kollmann und Glockmann, 1991) können sekundäre PDs von zunächst einfachen, linearen Strukturen ausgehend gebildet werden, welche sich während der Entwicklung verzweigen. Die Umwandlung von einfachen zu verzweigten PD-Strukturen, wie für Epidermis und Mesophyll von Tabakblättern gezeigt, erfolgt während der *sink*-

source-Transition und ist mit einer beträchtlichen Abnahme der plasmodesmalen Permeabilität verbunden (Oparka *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2001). Diese enge Korrelation zwischen Import/Export-Übergang von Photoassimilaten und Änderungen im plasmodesmalen Leitvermögen lässt vermuten, dass PDs als wichtige Kontrollpunkte des symplastischen Assimilattransportes sowie der Ressourcenverteilung zwischen *source*- und *sink*-Gewebe dienen (Lucas und Wolf, 1999; Lucas und Lee, 2004).

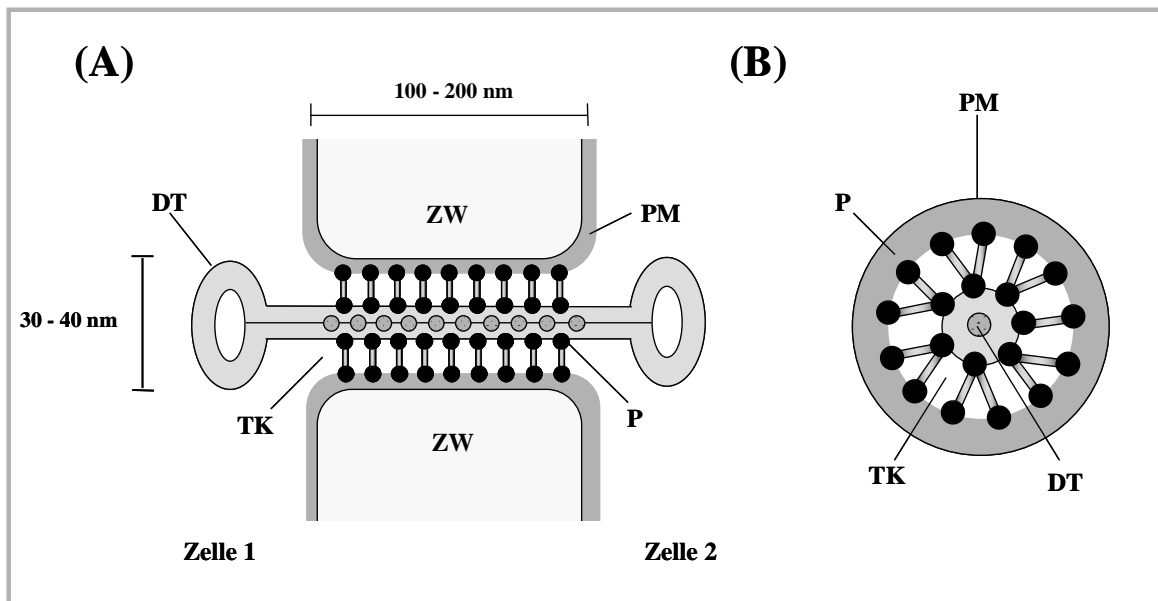


Abbildung 1-2: Schematisches Modell der Struktur primärer PDs im longitudinalen (A) und transversalen (B) Querschnitt durch die Zellwand (ZW)

Die Moleküle werden durch den zytoplasmatischen Transportkanal (TK) zwischen Plasmamembran (PM) und Desmotubulus (D), welcher sich vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) ableitet, transportiert. Speicherartige Proteinstrukturen (P), die den TK in mehrere Mikrokanäle unterteilen, verbinden D und TK. Modifiziert nach Ding (1998) und Wu *et al.* (2002).

Aus diesem Grund ist die Identifizierung von Komponenten und Prozessen des plasmodesmalen Transportes von essentieller Bedeutung. Die feste Verankerung in der Zellwand erschwert jedoch die biochemische Isolation intakter PDs aus Zellwandstrukturen. Daher begründen sich PD-Strukturmodelle hauptsächlich auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Robards, 1971; Robards und Lucas, 1990; Beebe und Turgeon, 1991; Ding *et al.*, 1992b; Botha *et al.*, 1993; Overall und Blackmann, 1996; Waigmann *et al.*, 1997). Das derzeitige Modell der PD-Struktur (s. Abb. 1-2) geht von einem zentralen Desmotubulus aus, der sich vom ER ableitet (Robards und Lucas, 1990; Ding *et al.*, 1992b; Lucas und Wolf, 1993b; Epel, 1994). Globuläre Proteine, die eng mit Transmembranproteinen assoziiert sind, sind speicherartig im Transportkanal zwischen Desmotubulus und Plasmamembran

angeordnet und untergliedern ihn in zahlreiche Mikrokanäle. Demnach reduzieren die speichenartigen Kanäle den funktionellen PD-Durchmesser auf 3-4 nm (Lucas *et al.*, 1993; Fisher, 1999) mit einem basalen SEL von 0,8-1,0 kDa (Epel, 1994; Lucas und Wolf, 1993; Overall und Blackmann, 1996), wobei der übliche Durchmesser von PDs etwa 40 nm beträgt (Robards und Lucas, 1990; van Bel und van Kesteren, 1999). Des weiteren deuten Studien an, dass einige Zytoskelettkomponenten, wie spezifische Formen von Aktin, Myosin und Calreticulin, Bestandteile der PD-Mikrokanäle bilden oder mit ihnen zusammenwirken könnten (Blackmann und Overall, 1998; Radford und White, 1998; Reichelt *et al.*, 1999; Chaffey und Barlow, 2001). Zudem wurde in *Arabidopsis* erst kürzlich eine über GPI-Anker mit PDs assoziierte Glukanase identifiziert, für die eine Beteiligung am Kalloseabbau vermutet und somit eine mögliche Funktion bei der Regulation der plasmodesmalen Leitfähigkeit zugesprochen wird (Levy *et al.*, 2007). Darüber hinaus bleibt trotz langjähriger Untersuchungen die konkrete Struktur, Zusammensetzung und Funktion von PD-Mikrokanälen weitestgehend unbekannt.

Verschiedene, kürzlich entwickelte genetische und proteomische Ansätze bergen das Potential, strukturelle Komponenten der PDs zu identifizieren und genauere Aufschlüsse über ihre Prozesse zu geben (Cutler *et al.*, 2000; Escobar *et al.*, 2003; Oparka, 2004; Tian *et al.*, 2004). Einen weiteren Beitrag zum besseren Verständnis über Komponenten und Mechanismen von PDs als symplastische Verbindungen der interzellulären Kommunikation könnten die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Mutanten mit veränderten plasmodesmalen Bindungs- und Transporteigenschaften leisten.

1.2 Transport endogener und viraler Moleküle in Pflanzen

1.2.1 Assimilattransport

Der Transport der Photoassimilate ausgehend von den Mesophyllzellen ausgewachsener *source*-Blätter, den Orten ihrer Synthese, zu den Phloemparenchymzellen kleiner Leitbündel erfolgt üblicher Weise über PD-vermittelte, symplastische Diffusion. Gewährleistet wird dieser Transportweg durch das Vorhandensein einer hohen Dichte an PDs zwischen benachbarten Mesophyllzellen sowie zwischen

Zellen von Mesophyll und des vaskulären Parenchyms (McCauley und Evert, 1989; Evert und Russin, 1993). In den meisten höheren Pflanzen bildet Saccharose die hauptsächliche Transportform der photoassimilierten Kohlenhydrate (Zimmermann und Ziegler, 1975) und übernimmt somit eine entscheidende Rolle bei der Regulation zwischen *sink*- und *source*-Geweben (Turgeon, 1989).

Für die anschließende Phloembeladung werden zwei Strategien diskutiert, apoplastische und symplastische Beladung in Geleitzell/Siebelement- (GZ/SE) Komplexe. Sie begründen sich auf der Beobachtung, dass die Anzahl von PDs in kleinen Leitbündeln hoch variabel ist (Gamalei, 1989; Evert und Russin, 1993, van Bel, 1993; Grusak *et al.*, 1996; Gamalei, 2000; Turgeon *et al.*, 2001). Kürzliche Ergebnisse von Turgeon und Medville (2004) deuten darauf hin, dass die symplastische Phloembeladung auf Pflanzenspezies beschränkt ist, die Oligosaccharide größer als Saccharose, wie z. B. Raffinose und Stachyose (Raffinose-Familie Oligosaccharide, sog. ROF), transportieren. Für diese Pflanzen wurde ein thermodynamisch zulässiger Mechanismus, der Polymerfallen-Mechanismus, beschrieben (Turgeon, 1991; Turgeon, 1996). Währenddessen postulieren Voitsekhovkaja *et al.* (2004), dass die Diffusion von Zuckerverbindungen entlang ihres Konzentrationsgefälles wahrscheinlich nicht den Hauptschritt der Phloembeladung darstellt, sondern dass der symplastische Eintritt ins Phloem über Massenstrom erfolgt. Nach den Befunden von Turgeon und Medville (2004) erfolgt bei allen anderen Pflanzen die Beladung apoplastisch und unabhängig davon, wie viele symplastische Verbindungen das Phloem enthält. Dabei gelangt Saccharose in den apoplastischen Raum und wird als elektrisch neutrales Molekül durch einen Protonen/Saccharose-Symport sekundär aktiv durch die Plasmamembran geschleust (Riesmeier *et al.*, 1994). Die dafür notwendige Energie liefert ein Protonengradient an der Plasmamembran, der durch eine Protonen-ATPase aktiv aufgebaut wird. Unter Verwendung verschiedener biochemischer und molekularbiologischer Methoden wurden am apoplastischen Saccharosetransport beteiligte und im GZ/SE-Komplex lokalisierte Transportproteine identifiziert und ihre Bedeutung für Phloembeladung und Assimilatverteilung aufgedeckt (Riesmeier *et al.*, 1994; Stadler *et al.*, 1995; Truernit und Sauer, 1995; Kühn *et al.*, 1996; Lemoine *et al.*, 1996; Bürkle *et al.*, 1998; Gottwald *et al.*, 2000).

Die im Phloemgewebe beladenen Assimilate werden mit dem Massenstrom, der auf der Druckdifferenz im Phloem beruht (Münch, 1930) und auf die Beladung in *source*- und die Entladung in *sink*-Gewebe zurückzuführen ist, über spezialisierte Siebröhren

in der Pflanze verteilt. Die Phloementladung in *sink*-Gewebe, wie Wurzeln, Reproduktions- und Speicherorganen sowie jungen Blättern, setzt sich aus einer komplexen Serie von Kurzstreckentransportereignissen zusammen. Der erste Schritt beinhaltet den Austritt aus den SE (Oparka, 1990). Er kann zum einen über die weit verbreitete, PD-vermittelte symplastische Diffusion aus dem SE/GZ-Komplex erfolgen (Fischer und Oparka, 1996). Im Falle einer apoplastischen Entladung beruht der Austritt aus SE auf dem Assimilattransport über membranständige Transporter (Oparka, 1990). Offenbar gibt es auch Übergangsformen, da mit fortschreitendem Knollenwachstum in Kartoffeln eine entwicklungspezifische Umstellung von apoplastischer zu symplastischer Entladung demonstriert wurde (Viola *et al.*, 2001). Bei der apoplastischen Entladung kann Saccharose über *sink*-spezifische Saccharosetransporter oder nach Hydrolyse in Glukose und Fruktose durch Zellwand-gebundene Monosaccharidtransporter in *sink*-Zellen gelangen (Williams *et al.*, 2000). Doch unabhängig von der Entladungsstrategie trägt letztendlich die Speicherung der Photoassimilate bzw. die direkte metabolische Verwertung zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gradienten bei, wobei der *sink*-Bedarf als weitere wichtige Kontrollinstanz des Assimilattransportes angesehen wird (Ho, 1988).

1.2.2 Transport von endogenen Makromolekülen

Neben dem Austausch von Ionen und Metaboliten ermöglichen PDs den Transport von Makromolekülen. Durch PDs translozierte Proteine werden als Nicht-Zell-Autonome Proteine (NZAPs) bezeichnet und von RNA wird angenommen, dass sie als Ribonukleoproteinkomplex (RNPK) transportiert wird.

Der erste Nachweis, dass Pflanzenproteine durch PDs transportiert werden können, wurde mittels Knotted1- (KN1) Studien erbracht (Jackson und Hake, 1997). Dieser Homeodomänen-Transkriptionsfaktor ist an der Kontrolle der Zelldifferenzierung im pflanzlichen Meristem beteiligt und förderte den raschen Zell-zu-Zell-Transport des Fluoreszenz-markierten Proteins durch die Erhöhung des plasmodesmalen SEL. Zusätzlich war KN1 befähigt, den Transport seiner mRNA zu bewerkstelligen (Jackson und Hake, 1997; Jackson, 2002; Kim *et al.*, 2003a; Kim *et al.*, 2005a). Kragler *et al.* (1998) gelang die Identifizierung eines plasmodesmalen Rezeptors, der die Translokation von KN1 vermittelt und als universaler Bindungspartner für den Transport sowohl von endogenen Molekülen als auch viralen MPs vorgeschlagen

(Sessions *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003). Ein weiterer potentieller Kontrollpunkt für den Transport von NZAPs scheint die Bildung von NZAP-Chaperon-Komplexen darzustellen, die von zellulären Komponenten erkannt und zur PD-Mündung transportiert werden (Kragler *et al.*, 1998) und vom PD-Apparat erkannt werden (Lucas und Lee, 2004). Dem kürzlich isolierten NZAP NCAPP1 aus Kürbis scheint eine Schlüssel-funktion zuzukommen. Es ist in der Lage, *Cucurbita maxima* Phloemprotein16 (CmPP16) und eine große Anzahl weiterer Phloem-NZAPs zu binden. Eine mutierte Version hemmt den Transport zahlreicher NZAPs, akkumuliert im ER in der Nähe von PDs (Lee *et al.*, 2003) und ist identisch zu einem Aldolase-1-Epimerase-verwandten Protein (Heese-Peck und Raikhel, 1998). In den letzten Jahren nahm die Anzahl der identifizierten NZAPs und die Kenntnis ihrer Wirkungsweise zu. Dabei ist erwiesen, dass der Transport von NZAPs und RNPKs häufig zur Zelldifferenzierung beiträgt (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999; Xoxonostle-Cazares *et al.* 1999; Kragler *et al.*, 2000; Sessions *et al.*, 2000; Xoxonostle-Cazares *et al.*, 2000; Nakajima und Benfey, 2001; Haywood *et al.*, 2002; Lucas und Lee, 2004; Gallager und Benfey, 2005; Kurata *et al.*, 2005a; Kurata *et al.*, 2005b).

Allerdings wurde in einigen Untersuchungen belegt, dass der interzelluläre Transport von fluoreszierenden Dextranen an Stelle des symplastischen Austausches auch über das Endomembransystem erfolgen kann (Cantrill *et al.*, 1999).

Von Oparka (2004) wurde ein Modell vorgeschlagen, welches die bekannten strukturellen zellulären und plasmodesmalen Komponenten mit potentiellen regulatorischen Mechanismen verbindet (s. Abb. 1-3). In diesem Modell regulieren Proteinkinasen die Aktivität von plasmodesmalen Hauptkomponenten. Zusätzlich durchspannen helikale Aktinfilamente den plasmodesmalen Kanal und bilden das Gerüst für den aktiven Transport.

1.2.3 Der virale Transport

Die systemische Ausbreitung von Viren in Pflanzen erfordert zwei distinkte Mechanismen: zum einen den erfolgreichen lokalen Transport von Zelle zu Zelle und zum anderen die Verteilung des Virusgenoms bis in weit von der Infektionsstelle entfernte Organe (Carrington *et al.*, 1996; Gilbertson und Lucas, 1996; Oparka und Santa Cruz, 2000). Zu diesem Zweck nutzen Pflanzenviren das vorhandene makromolekulare Transportsystem der Pflanze, bestehend aus PDs und dem vaskulären

Siebröhrensystem im Phloem. So wurde von viral kodierten Transportproteinen („Movement“ Proteinen, MPs) gezeigt, dass sie an sekundäre, verzweigte PDs binden und das basale plasmodesmale SEL zur Zell-zu-Zell-Translokation MP-gebundener viraler Genome durch PDs deutlich erhöhen (Wolf *et al.*, 1989; Wolf *et al.*, 1991; Ding *et al.*, 1992; Waigmann *et al.*, 1994; Itaya *et al.*, 1998; Oparka *et al.*, 1999; Lazarowitz und Beachy, 1999a; Hofius *et al.*, 2001; Lucas, 2006).

Zur effektiven Virusausbreitung über PDs sind zahlreiche, spezifische Interaktionen der MPs mit anderen viralen Faktoren und pflanzlichen Komponenten notwendig (Lazarowitz und Beachy, 1999a; Lazarowitz und Beachy 1999b). Um diese Anforderungen zu erfüllen, wurden in verschiedenen Virusfamilien unterschiedliche Strategien entwickelt (Lazarowitz und Beachy, 1999b; Lucas, 2006):

(1) Vertreter der Virusfamilien *Tobamovirus*, *Dianthovirus* und *Ubravirus* (z. B. *Tobacco mosaic virus*, TMV; *Red clover necrotic mosaic virus*, RCNMV) kodieren ein einzelnes, nicht-strukturelles MP, welches virale RNA in Form eines RNP bindet und durch Modifikation der PDs den Transport des infektiösen Materials in benachbarte Zellen vermittelt.

(2) Geminiviren (u. a. *Bean dwarf mosaic virus*, BDMV; *Squash leaf curl virus*, SqLCV) benötigen zwei MPs, eines für den intrazellulären Transport der viralen DNA und eines, das den Viruskomplex über PDs von Zelle zu Zelle transportiert.

(3) Einige Virusgruppen, wie *Bromovirus*, *Caulimovirus*, *Cucumovirus* und *Tospoviren* (z. B. *Brome mosaic virus*, BMV; *Cowpea chlorotic mottle virus*, CCMV; *Cauliflower mosaic virus*, CaMV; *Cucumber mosaic virus*, CMV; *Tomato spotted wilt virus*, TSWV), verfügen über MPs und Capsid-Proteine (CPs). Das Genom dieser Viren wird über MP-enthaltende Tubuli, die modifizierte PDs ohne Desmotubulus durchspannen, als subvirale oder virale Partikel transportiert.

(4) In der Familie der *Potexviren* (z. B. *Potato virus X*, PVX) werden mehrere verschiedene MPs von einem speziellen, konservierten und als „triple gene block“ bezeichneten Abschnitt des Virusgenoms kodiert und tragen zum interzellulären Transport des infektiösen Materials bei. Dies erfolgt unter Beteiligung eines CP als essentielle Komponente.

(5) Alternativ kodieren Potyviren (*Tobacco etch virus*, TEV; *Lettuce mosaic virus*, LMV) nicht ein bestimmtes MP, sondern verschiedene Virusproteine übernehmen während des Transportes eine multifunktionale Rolle. Dazu zählen ein CP zur Assemblierung (Dolja *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1995) und eine „Helper-component“

Proteinase (HC-Pro). Beide sind befähigt, das plasmodesmale SEL zu erhöhen, durch PDs zu translozieren und den interzellulären Transport von viraler RNA (vRNA) zu vermitteln (Rojas *et al.*, 1997). Zudem wurden Funktionen von einem „Viral Genome-linked“ Protein (VPg), „Cylindrical Inclusion“ (CI) Protein (RNA-Helikase bei der Genomreplikation) und dem 6K2-Protein (Membranverankerung des Replikationskomplexes) beim interzellulären Transport nachgewiesen (Carrington *et al.*, 1998).

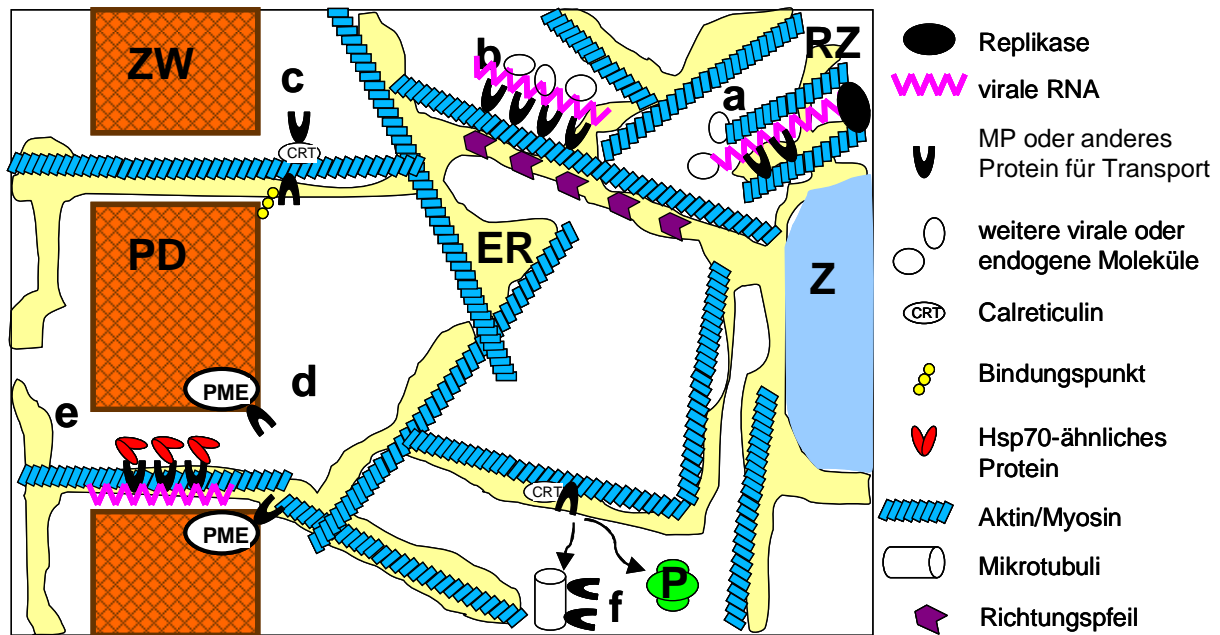


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung einiger Virus-Wirt-Interaktionen während der viralen Ausbreitung

An Replikationszentren (RZ) des Endoplasmatischen Retikulums (ER) neu synthetisierte virale RNA wird von am Transport beteiligten Proteinen gebunden und assembliert zu einem Movement Komplex (MK) aus viralen und endogenen Faktoren (a). Der MK wird mit hoher Geschwindigkeit entlang des ER über Aktin/Myosin zur Zellperipherie transportiert, wie durch die Richtungspfeile angegeben (b). Virale Proteine binden an periphere Marker, wie z. B. Bindungspunkte oder plasmodesmal lokalisierte Proteine (z. B. Calreticulin) (c). Durch die Interaktion mit Zellwandenzymen, wie Pektinmethylesterase (PME), öffnen virale Movement-assoziierte Proteine Plasmodesmen (PDs) in der Zellwand (d) und Hsp70-ähnliche Proteine mögen den MP-RNA-Komplex durch PDs translozieren (e). In späteren Infektionsstadien werden Movement-assoziierte Proteine wahrscheinlich abgebaut. Im Falle von TMV ist Calreticulin von großer Bedeutung beim Ablösen der Movement Proteine (MPs) vom ER zum Proteasom-vermittelten (P) Abbau unter Bindung an Mikrotubuli (f). Z: Zellkern. Modifiziert nach Boevink und Oparka (2005).

Als Modell für den Zell-zu-Zell-Transport viraler Genome in Form von RNPKs dient TMV-MP (Boevink und Oparka, 2005, Abb. 1-4). Zur Bewältigung dieser Funktion wurde gezeigt, dass TMV-MP vom Ort der viralen Replikation und viralen Proteinbiosynthese am ER ausgehend (Heinlein *et al.*, 1998) TMV-RNA bindet (Citovsky *et al.*, 1992) und mit Komponenten des ER (Heinlein *et al.*, 1998; Reichel *et al.*, 1999) und Zytoskeletts, d. h. Mikrotubuli und Aktinfilamente, (Heinlein *et al.*, 1995; McLean

et al., 1995; Boyko *et al.*, 2000a; Ashby *et al.*, 2006) assoziiert, um den RNPK zu PDs zu geleiten. Dabei übernimmt MPB2C die Rolle eines negativen Regulators (Kragler *et al.*, 2003). Zudem modifiziert TMV-MP die Wirtsgenexpression durch die Interaktion u. a. mit dem Transkriptionsfaktor MBF1 (Matsushita *et al.*, 2002). An PDs wurde die Bindung von TMV-MP an Calreticulin (Chen *et al.*, 2005), Pektinmethyl-esterase (PME) (Dorokhov *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000) und einer PD-assoziierten Proteinkinase (PAPK) (Lee *et al.*, 2005) nachgewiesen. In Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus durch PAPK- und PME-Aktivität ist TMV-MP befähigt, das plasmodesmale SEL zu erhöhen, so dass RNPKs hindurchgelangen und benachbarte Zellen infizieren können.

Der *Potato leafroll virus* (PLRV) gehört zur Familie der Phloem-limitierten *Luteoviren*, Untergruppe *Poleoviren*. Sein 5,8 kb großes Einzelstrang-(+)-RNA-Genom wird am 5'-Ende von einem „Genome-linked“ Protein (VPg) geschützt (Mayo *et al.*, 1982). Es wird angenommen, dass das vom Leserahmen 4 (ORF4) kodierte, 17 kDa große MP (MP17) die Zell-zu-Zell-Transportfunktion vermittelt und biochemische Charakterisierungen zeigten, dass MP17 in Analogie zu TMV-MP über eine Domäne zur Nukleinsäurebindung (C-Terminus) und eine für Protein/Protein-Wechselwirkungen (N-Terminus) verfügt (Tacke *et al.*, 1991; Tacke *et al.*, 1993) und von einer Calcium-abhängigen, membranständigen Proteinkinase phosphoryliert wird (Sokolova *et al.*, 1997). Weitere Interaktionen des MP17 mit pflanzlichen Wirtsfaktoren und Prozesse während des interzellulären Transportes sind bislang nicht bekannt.

Die Fähigkeit, in das Langstreckentransportsystem des Phloems zur systemischen Ausbreitung in der Pflanze zu translozieren, scheint für viele Viren kritisch und der entscheidende Schritt bei der Bestimmung der Wirtsspezifität zu sein (Gilbertson und Lucas, 1996). Als Kontrollinstanz für den Ein- und Austritt in bzw. aus GZ/SE werden die PDs zwischen Bündelscheide und Phloemparenchym und GZ/SE-Komplexen angesehen (Stitt, 1996; Ding *et al.*, 1998; Nelson und van Bel, 1998; Wang *et al.* 1998; Qi *et al.*, 2004). Darüber hinaus scheinen für den Langstreckentransport weitere Virusproteine notwendig zu sein, da einige Viren, wie TMV und RCMV, der Mitwirkung von CPs zur Bildung von Viruspartikeln bedürfen (Saito *et al.*, 1990; Vaewhongs und Lommel, 1995; Ding *et al.* 1996). Und in genetischen und Hefe-Zwei-Hybrid-basierten Ansätzen wurde gezeigt, dass die Interaktion von Virusfaktoren mit pflanzlichen Komponenten des Langstreckentransportes eine entscheidende Rolle bei der systemischen Virusausbreitung spielt (Vaewhongs und Lommel,

1995; Xoxonostle-Cazares *et al.*, 1999; Chisholm *et al.*, 2001). Ebenso wie endogene Makromoleküle werden Virusgenome symplastisch über einfache, unverzweigte PDs aus dem SE/GZ-Komplex entladen und unter Mitwirkung spezifischer Transportfaktoren im Postphloemgewebe verteilt (Santa Cruz, 1999).

1.3 Faktoren, die Assimilattransport und Biomasseproduktion beeinflussen

Die beschriebenen Fähigkeiten viraler MPs, an sekundäre PDs zu binden, ist ein weiterer Hinweis, dass PDs eine entscheidende Funktion bei der Regulation von symplastischen Transportprozessen und Ressourcenverteilung übernehmen. Die ektopische Expression der MPs des TMV und CMV in transgenen Tabak-, Kartoffel- und Melonenpflanzen resultierte in der Erweiterung von PDs, die von auffälligen Veränderungen in Kohlenhydratmetabolismus und Biomasseverteilung begleitet war (Lucas *et al.*, 1993; Balachandran *et al.*, 1995; Lucas *et al.*, 1996; Shalitin *et al.*, 2002). Diese MP-vermittelten Veränderungen variierten jedoch wesentlich in Bezug auf Pflanzenspezies, Gewebespezifität des Promotors und Entwicklungsstadium. So führte z. B. die Expression von TMV-MP in transgenen Tabakpflanzen unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors (Balachandran *et al.*, 1995; Olesinski *et al.*, 1995) als auch eines Phloem-spezifischen Promotors in transgenen Kartoffeln (Almon *et al.*, 1997) zu Kohlenhydratakkumulation und geringeren Saccharoseexportraten der *source*-Blätter. Während dessen induzierte die ST-LS1-Promotor-vermittelte TMV-MP-Expression in chloroplastenhaltigen Zellen von Kartoffel geringere Kohlenhydratgehalte bei gleichzeitig erhöhtem Saccharosetransport (Olesinski *et al.*, 1996). Bemerkenswerter Weise traten die MP-vermittelten Effekte in transgenen Kartoffelpflanzen unter entwicklungspezifischer Kontrolle auf und wurden lediglich nach Knollenbildung beobachtet. Eine Reduktion der Kohlenhydratgehalte von *source*-Blättern wurde auch bei Expression von TMV-MP und CMV-MP in transgenen Melonenpflanzen detektiert (Shalitin *et al.*, 2002). Die Expression dieser MPs war begleitet von signifikant erhöhten Saccharosegehalten im Phloemsaft der symplastisch beladenden Melonen. Diese Ergebnisse begründen das Modell, in dem MPs den plasmodesmalen Transport von makromolekularen Signalen, die an Kohlenhydratmetabolismus und Regulation von *sink-source*-Beziehungen beteiligt

sind, beeinträchtigen (Lucas *et al.*, 1996; Lucas und Wolf, 1999). Hingegen zeigte die kürzliche Analyse *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) MP (NS_M)-exprimierender Tabakpflanzen, dass der schwerwiegende, infektiionsähnliche und Saccharose-export-defiziente Phänotyp mit der Hitze-revertierbaren Blockierung NS_M-lokalisierter Mesophyll-PDs durch Kalloseablagerung korrelierte (Rinne *et al.*, 2005). Daraus schlossen die Autoren, dass die Auswirkungen von NS_M auf die Funktion von *source*-Blättern eher die Folge basaler Abwehrmechanismen nach anhaltender MP-Akkumulation an PDs sind als ein direkter Einfluss auf Kohlenhydratmetabolismus und -transport.

In Ergänzung zu den MPs von TMV, CMV und TSWV wurde das 17 kDa-große MP17 des Phloem-limitierten PLRV als weiteres Modell eingeführt, die Folgen veränderter PD-Funktion auf symplastischen Photoassimilattransport und *sink-source*-Beziehungen zu analysieren (Herbers *et al.*, 1997; Hofius *et al.*, 2001). Ein deutlicher Einfluss von PLRV-MP17 auf Kohlenhydrat- und Biomasseverteilung wurde durch die konstitutive Expression einer N-terminal verlängerten Version von MP17 (MP17N) in transgenen Tabaklinien demonstriert (Herbers *et al.*, 1997). Verschiedene MP17N-exprimierende Tabakpflanzen zeigten ernsthafte Wachstumsretardierungen und ein auffälliges Ausbleichen der Interkostalregionen unterer *source*-Blätter, die begleitet waren von drastischen Kohlenhydratakkumulationen, veränderter Genexpression und eingeschränkter Resistenz gegenüber *Potato virus Y* (PVY)-Infektion. Darüber hinaus gaben zellbiologische Untersuchungen MP17N- und nicht-phänotypischer MP17:GFP-exprimierender Tabakpflanzen über eine allgemeine Affinität von MP17 gegenüber verzweigten PDs in vaskulären und nicht-vaskulären Geweben von *source*-Blättern sowie einen Anstieg des plasmodesmalen SEL in Mesophyllzellen Aufschluss (Herbers *et al.*, 1997; Hofius *et al.*, 2001). Dabei scheinen Lokalisierungs- und Durchgangskapazität von MP17 an Mesophyll-PDs unabhängig vom MP17-Proteingehalt zu sein, während Kohlenhydratstatus und Virusresistenz einem Dosis-abhängigen Mechanismus folgten. Bei niedrigen MP17-Expressionsleveln zeigten die transgenen Linien, wahrscheinlich infolge angestiegener PD-Permeabilität, niedrigere Zuckergehalte und eine beschleunigte PVY-Ausbreitung. Hingegen schienen Kohlenhydratakkumulation, Wachstums- hemmung und virale Abwehrreaktionen eher die Folge indirekter metabolischer Effekte bei hohen MP17-Proteingehalten zu sein (Hofius *et al.*, 2001).

So führte bereits die Modifikation individueller enzymatischer Schritte des Kohlenhydratmetabolismus zu Kohlenhydratakkumulationen in Verbindung mit reduzierten Wachstumsraten (Sonnewald, 1992; Lawson *et al.*, 2006). Auch die Beeinflussung der *sink*-Stärke wirkt sich auf die Ressourcenverteilung aus. Zellwandinvertasen sind essentiell für die Entwicklung von *sink*-Speicherorganen verschiedener Spezies (Weschke *et al.*, 2003), wie Samen (Weber *et al.*, 1998) oder Kartoffelknollen (Sonnewald *et al.*, 1995). So stimulierte die erhöhte Aktivität einer apoplastischen Invertase in *Arabidopsis* über die Zunahme der Phloementladung reproduktives Wachstum und Leistung (Heyer *et al.*, 2004). Hingegen war die Expression einer artifiziellen zytoplasmatischen Invertase, für die gezeigt wurde, dass sie den *sink*-Bedarf reduziert (Sonnewald *et al.*, 1995), von gegenteiligen Effekten begleitet (Heyer *et al.*, 2004).

Deutliche Veränderungen in der Entwicklungs- und Reproduktionsleistung waren ebenfalls ein charakteristisches Merkmal bei der Expression von plasmodesmal lokalisierten Pathogenizitäts-bezogenen Genen aus Mais (PRm) in transgenen Tabakpflanzen und standen mit erhöhten Saccharoseexportraten in Verbindung (Murillo *et al.*, 2003).

Diese Beobachtungen verdeutlichen die Bedeutung der Photoassimilatbereitstellung und -verteilung für Pflanzenwachstum und -entwicklung. Neue Erkenntnisse, wie Pflanzen den Fluss dieser energiereichen Verbindungen kontrollieren, könnten zu einem besseren Verständnis der pflanzlichen Zellbiologie beitragen. Darüber hinaus bieten sie für landwirtschaftliche Aspekte das Potential, neue Ansätze zur Verbesserung von Ernteerträgen und -qualität zu entwickeln.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkungsweise des viralen PLRV-MP17 auf plasmodesmal vermittelte Transportmechanismen und die Regulation der Photoassimilatverteilung zwischen *sink*- und *source*-Gewebe in der Modellpflanze *Arabidopsis* untersucht werden.

(1) Im Mittelpunkt des ersten Ansatzes stand die Analyse metabolischer, physiologischer und virologischer Auswirkungen MP-induzierter Veränderungen der plasmodesmalen Transporteigenschaften. Die Untersuchungen sollten in transgenen

Arabidopsis-Pflanzen der Ökotypen Columbia, *Landsberg erecta* und C24 erfolgen, welche konstitutiv eine Fusion des *Potato leafroll virus* MP (MP17) und GFP exprimierten. Sie sollten in verschiedenen Wachstumsstadien durchgeführt und auf Dosis-abhängige Korrelationen mit der MP17:GFP-Proteinmenge analysiert werden. Zur Verifizierung, ob die beobachteten Effekte im Zusammenhang mit dem Molekulargewicht des exprimierten MPs und/oder einer Fusion mit GFP stehen, sollten MP17-transgene *Arabidopsis*-Linien ohne GFP-Fusion auf die gleiche Weise charakterisiert werden. Um zudem zwischen direkter Unterbrechung des symplastischen Transportweges durch MP17-Akkumulation an PDs und Abwehrreaktion der Pflanze durch Kalloseablagerung an PDs unterscheiden zu können, sollten die MP17-vermittelten Änderungen unter Kalloseabbau-induzierenden Bedingungen analysiert werden.

(2) In einem zweiten Ansatz sollten Zelltypen identifiziert werden, denen eine Schlüsselfunktion bei der Ausprägung der MP17-vermittelten Dosis-abhängigen Effekte zukommt. Dazu sollten die entwicklungspezifischen, biochemischen und physiologischen Konsequenzen in transgenen *Arabidopsis*-Linien mit MP17:GFP-Expression in chloroplastenhaltigen, Bündelscheiden- und Geleitzellen charakterisiert werden.

(3) Ein weiterer Aspekt bestand in der genetischen, molekularen, metabolischen und physiologischen Charakterisierung von Mutanten mit potentiellen Defekten in pflanzlichen MP17-Interaktionspartnern, welche ausgehend von einer phänotypischen Col-0-35S-MP17:GFP-16 (Col-0-16, NM) Linie mittels Ethylmethansulfonat- (EMS) Mutagenese erzeugt wurden (Hofius, 2003). Darüber hinaus sollte zur markergestützten Isolierung der zugrunde liegenden Mutation in den genetisch identifizierten Kandidaten ein homozygoter Kreuzungspartner in einem anderen *Arabidopsis*-Ökotyp generiert werden, welcher sich durch die gleichen molekularen, biochemischen und physiologischen Charakteristika auszeichnet wie die phänotypische Parentallinie der EMS-Mutagenese.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

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

2.2 Pflanzenmaterial und Anzucht

2.2.1 *Arabidopsis thaliana*

Saatgut der *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Columbia (Col-0), C24 und *Landsberg erecta* (Ler) wurden von S. Misera, R. Jost (früher IPK Gatersleben) sowie von H. Hillebrand (früher Sungene, Gatersleben) zur Verfügung gestellt. Die Anzucht in Gewebekultur erfolgte nach Stratifizierung der Aussaat (zwei Tage Dunkelheit, 4°C) unter einem 16 h Licht / 8 h Dunkelrhythmus bei 21°C, 50% Luftfeuchte sowie einer Belichtung von 150 µE auf modifiziertem Murashige Skoog (MS) Medium (Sigma) ergänzt durch Gamborg's Vitaminlösung (1:1000, Sigma). Die Anzucht von *Arabidopsis* unter Kurztagbedingungen erfolgte in einem Klimaraum bei 21°C, 9 h Licht (120 µE) und 60% relativer Luftfeuchte mit einer Nachtabenkung auf 18°C. Pflanzen für virologische Analysen wurden unter vergleichbaren Anzuchtbedingungen in einem Klimaschrank kultiviert. Die *Arabidopsis*-Pflanzen für Phänotyp-Reversionsexperimente wurden unter Kurztagbedingungen bei permanent 32°C in einem Klimaschrank gehalten.

Nach Kultivierung im Klimaraum wurden die Pflanzen für physiologische Analysen während der generativen Wachstumsphase und von Harvest-Parametern im Gewächshaus bei 16 h Licht mit Zusatzbeleuchtung (ca. 95 μE) und 8 h Dunkelheit angezogen. Sofern nicht anders spezifiziert wurden die Arbeiten zur Charakterisierung von Ethylenmonosulfat-Mutanten (EMS) unter Langtagbedingungen im Gewächshaus durchgeführt.

2.2.2 *Nicotiana tabacum*

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. Varietät Samsun NN) wurden von Vereinigte Saatzuchten EG (Ebster) bezogen und in Gewebekultur unter vergleichbaren Licht-/Feuchte-Bedingungen wie *Arabidopsis*, aber bei 24°C und auf MS-Medium mit 2% (w/v) Saccharose und geeigneten Hormonen und Antibiotika gehalten. Im Gewächshaus wurden die Pflanzen bei 16 h Licht mit Zusatzbeleuchtung (ca. 300 μE) und 8 h Dunkelheit kultiviert. Die relative Luftfeuchte lag zwischen 60 und 70%, die Temperatur betrug 22°C während der Lichtperiode und 20°C während der Dunkelphase. Die Tabakpflanzen für Phänotyp-Reversionsexperimente wurden unter Langtagbedingungen bei permanent 32°C in einem Klim aschrank gehalten.

2.3 Bakterienstämme und Vektoren

Für allgemeine Klonierungsverfahren und Pflanzentransformation wurden die in Tabelle 2-1 aufgeführten Bakterienstämme und die in Tabelle 2-2 aufgeführten Vektoren eingesetzt.

Tabelle 2-1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	relevanter Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>recA1 endA, gyrA96 thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac [F', proAB, lac^fZΔM15, Tn10 (Tet^r)]^c</i>	(Bullock <i>et al.</i> , 1987) Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10F'	<i>F (tet^r) mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 ceoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rspL(Str^R) end A1 nupG</i>	Invitrogen

<i>Stamm</i>	<i>relevanter Genotyp</i>	<i>Herkunft/Referenz</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pGV2260 in C58C1	(Deblaere <i>et al.</i> , 1985)

Tabelle 2-2: Verwendete Plasmide

<i>Bezeichnung</i>	<i>Verwendung/Resistenz</i>	<i>Herkunft/Referenz</i>
pBi101	binärer Vektor mit GUS, Kan ^r	(Jefferson <i>et al.</i> , 1986)
pBinAR	binärer Vektor, Kan ^r	(Höfgen und Willmitzer, 1990)
pBlueskript SK ⁻	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Amp ^r	Stratagene
pCR-Blunt	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Amp ^r	Invitrogen
pCR2.1	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Kan ^r	Invitrogen

2.4 Pflanzentransformation

2.4.1 Stabile Pflanzentransformation

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

Arabidopsis-Pflanzen (Ökotypen Col-0, C24, *Ler*) wurden zur Transformation etwa 4 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und danach zur Blüteninduktion in den Langtag transferiert (s. 2.2.1). Blütensprosse 6-8 Wochen alter Pflanzen wurden mit *Agrobacterium*-Suspension [OD₆₀₀=0,8; 5% (w/v) Saccharose; 0,05% (v/v) Silvet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, USA)] entweder nach der Vakuum-Infiltrationsmethode von (Bechthold *et al.*, 1993) oder nach dem Protokoll von

(Clough und Bent, 1998) transformiert, wobei bei letzterer Methode der Blütenstand ohne Anlegen eines Vakuums für ca. 5 s in die *Agrobacterium*-Suspension eingetaucht wurde („floral dip“). Die Pflanzen wurden anschließend unter einer abgedunkelten Haube für 24 h bei RT stehen gelassen und danach im Gewächshaus bis zur Samenreife gehalten. Das reife Saatgut (T1-Generation) wurde sterilisiert (s. 2.5), zur Selektion der transgenen Pflanzen auf MS-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml) ausplattiert und unter Langtagbedingungen kultiviert. Kanamycin-resistente Keimlinge wurden auf MS-Medium umgesetzt und nach 2-3 Wochen ins Gewächshaus in Erdkultur transferiert.

2.4.2 Transiente Pflanzentransformation durch *Agrobacterium*-Infiltration

Zu 50 ml der *Agrobacterium*-Kultur wurden Endkonzentrationen von 10 mM MES pH 5,2 (KOH) und 20 µM Acetosyringon (in Dimethylsulfoxid gelöst) gegeben. Nach 15 min Zentrifugation bei 2000 g wurde das Pellet in 10 mM MgCl₂ gelöst, so dass bei 600 nm Wellenlänge eine optische Dichte von 0,7 bis 1,0 eingestellt wurde. Die Suspension wurde mit Endkonzentrationen von 10 mM MES pH 5,2 (KOH) und 100 µM Acetosyringon versetzt und zwei bis drei Stunden bei RT geschüttelt. Mittels einer Spritze ohne Nadel wurde die Bakterien-Suspension in die Unterseite fast ausgewachsener Blätter gespritzt.

2.5 Sterilisierung von Samen

Zur Sterilisierung von Tabak- oder *Arabidopsis thaliana*-Samen wurden diese in ein dünnes Gewebe eingeschlagen. Tabaksamen wurden 3 min in 70% (v/v) Ethanol und 10 min in 1% (v/v) NaOCl inkubiert, anschließend dreimal kurz in H₂O gewaschen. *Arabidopsis thaliana* Samen wurden 2 min in 70% (v/v) Ethanol und 5 min in 5% (v/v) NaOCl inkubiert und anschließend fünfmal kurz mit H₂O gewaschen.

2.6 Kreuzen von *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis-Pflanzen (Ökotypen Col-0, *Ler*) wurden zur Kreuzung etwa 2 Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert und danach zur Blüteninduktion in den Langtag transferiert (s. 2.2.1). An den ca. 5 Wochen alten Pflanzen wurden die jeweils 8-10 am besten geeigneten, vollständig geschlossenen Blüten des weiblichen Elter für die Bestäubung identifiziert und alle folgenden Arbeiten am Binokular mit einer Feinpinzette durchgeführt. Ohne Beschädigung des Karpells wurden Sepalen, Petalen und Antheren der ungeöffneten Knospen des weiblichen Elter entfernt. Anschließend wurden alle anderen Knospen entfernt, um Selbstungen zu verhindern. Die präparierten Knospen wurden ein bis zwei Tage weiter kultiviert, bis die Narbe für den männlichen Pollen empfänglich war. Reife Staubblätter vollständig geöffneter Blüten des männlichen Elters wurden entfernt, und mit der konvexen Seite der Anthere wurde der Pollen des männlichen Elters auf die stigmatische Oberfläche der Narbe des präparierten weiblichen Elters gestrichen und danach im Gewächshaus bis zur Samenreife gehalten. Das reife Saatgut wurde im Gewächshaus in Erdkultur kultiviert.

In den Rückkreuzungen zur Bestimmung des Dominanzverhältnisses diente die zu untersuchende Pflanze als weiblicher Elter und die Ausgangslinie für die Mutagenese, der männliche Elter, wurde als genetischer Hintergrund eingesetzt (Weigel und Glazebrook, 2002). Die Mutanten wurden zwei Rückkreuzungszyklen mit der nicht-mutagenisierten Ausgangslinie (NM16) unterzogen, um Seitenmutationen zu entfernen, bevor sie genetisch charakterisiert wurden (Scheible *et al.*, 2003). Kreuzungen zum Test der Allelizität der Mutationen wurden in beide Richtungen durchgeführt.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Allgemeine Verfahren der Nukleinsäure-Manipulation

Grundlegende Techniken der Nukleinsäure-Manipulation wie z.B. Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Schneiden von DNA mit Restrik-

tionsenzymen, Verknüpfen von DNA mit Hilfe von Ligasen, Reinigung von DNA-Fragmenten, Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon-Membranen, Anzucht von Bakterien, Transformation von *E. coli*-Zellen, Präparation von Plasmiden, und die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten zur Verwendung als Hybridisierungssonde wurden nach (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

2.7.2 Oligonukleotide und Sequenzierungen

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

2.7.3 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen

Für die Präparation genomischer DNA nach (Reichardt und Rogers, 1993) wurde das nicht-ionische Detergenz Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) verwendet. 0,25 g Pflanzenmaterial wurden unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert. In einem vorgewärmten zweiten Mörser wurde das Pulver mit 1 ml 65°C-warmem CTAB I-Puffer [100 mM Tris-HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% (w/v) CTAB] versetzt und homogenisiert. Der Extrakt wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und 30 min bei 65°C im Thermomixer inkubiert. Nach zweimaliger Extraktion in je 1 Vol. Chloroform/Octanol (24:1) wurde zu dem Überstand 1/10 Vol. 65°C-warmer CTAB II-Puffer [0,7 M NaCl; 10% (w/v) CTAB] gegeben und erneut mit 1 Vol. Chloroform/Octanol extrahiert. Der Überstand aus der 5-minütigen Zentrifugation bei 7.500 g und RT wurde mit 1 Vol. vorgewärmtem CTAB III [50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 1% (w/v) CTAB] solange bei 65°C inkubiert, bis die DNA in Flocken ausfiel (ca. 30 min). Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 5.000 g und 4°C wurde die DNA in 250-750 µl vorgewärmtem CTAB IV [10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 M NaCl] gelöst und anschließend bei -20°C in 2,5 Vol. 100% (v/v) Ethanol über Nacht (ü. N.) gefällt. Der Zentrifugation bei 7.500 g

und 4°C folgten zwei Waschschr tte mit je 1 ml 70% (v/v) Ethanol. Anschließend wurde das Sediment 15 min bei RT getrocknet und in 50 µl TE-Puffer pH 7,5 mit 100 µg/ml RNase A bei RT resuspendiert.

2.7.4 Southern-Analyse

30 µg genomische DNA (s. 2.7.3) wurde mit *Kpn*I, *Bam*HI bzw. *Hind*III und in einem einprozentigen TBE-Gel aufgetrennt. Zur Mobilisierung großer DNA-Fragmente wurde das Gel anschließend 20 min in 0,25 N HCl inkubiert, kurz in Wasser gewaschen, 20 min in 0,4 N NaOH inkubiert und abschließend noch einmal kurz mit Wasser gewaschen.  ber mindestens 14 Stunden wurde die DNA mit 0,4 N NaOH auf „Hybond-N+“ Membran (Amersham)  bertragen. Geeignete cDNA-Sonden wurden mittels „High Prime“ Kits (Boehringer Mannheim) und [α -³²P]-dCTP (Amersham) radioaktiv markiert. Die Hybridisierung der Membranen in „Church“-Puffer (Church und Gilbert, 1984) wurde wie bei (Herbers *et al.*, 1995) beschrieben durchgeführt. Transkript-spezifische Signale wurden durch Exposition gegen einen Röntgenfilm (Kodak, Stuttgart) detektiert oder mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji FLA-3000, Fuji, Tokio, Japan) sichtbar gemacht.

2.7.5 Isolierung pflanzlicher RNA, Northern-Analyse

RNA aus Pflanzengewebe wurde nach der Methode von (Logemann *et al.*, 1987) isoliert. Zwischen 20 und 40 µg Gesamt-RNA wurden nach einem Denaturierungsschritt in einem 1,5% (w/v) Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und durch Kapillarttransfer  . N. auf GeneScreen Membranen (NEN, Boston, USA)  bertragen. Die radioaktive Markierung von cDNA Fragmenten erfolgte durch Verwendung des „High Prime“ Kits (Boehringer Mannheim) und [α -³²P]-dCTP (Amersham). Die Hybridisierung der Membranen in „Church“-Puffer (Church und Gilbert, 1984) wurde wie bei (Herbers *et al.*, 1995) beschrieben durchgeführt. Transkript-spezifische Signale wurden durch Exposition gegen einen Röntgenfilm (Kodak, Stuttgart) detektiert oder mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji FLA-3000, Fuji, Tokio, Japan) aufgenommen.

2.7.6 Reverse Transkription

Die reverse Transkription pflanzlicher RNA und Amplifizierung der einzelsträngigen cDNA über PCR erfolgte nach dem Protokoll der M-MLV (H-) Reversen Transkriptase (Promega, Madison, USA). 20 µg pflanzlicher RNA wurden zunächst mit DNase (Boehringer Mannheim) bei 37°C für 45 min behandelt und anschließend 10 min bei 65°C inaktiviert. Nach Reinigung mit PhenoI/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde die RNA mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,2 gefällt, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und in 100 µl DEPC-behandeltem H₂O gelöst. Die cDNA Erststrang-Synthese wurde in einem Ansatz mit 12,5 µl DNase-behandelter RNA, 5 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl dNTPs (2,5 mM), 1 µl Oligo-dT-Primer (50 mM; dT_[30]V[G/C/A]) und 2,5 µl DEPC-behandeltem H₂O nach Inkubation für 5 min bei 65°C, dann für 5 min bei 37°C, und schließlich nach Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase [M-MLV (H-), Promega] und 1 µl RNase-Inhibitor (Boehringer Mannheim) bei 37°C für 60 min durchgeführt. Nach Hitzeinaktivierung für 5 min bei 95°C wurde die cDNA als Matrize für anschließende PCR-Reaktionen mit rTaq DNA-Polymerase (Takara Shouzo, Japan) eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde parallel mit genspezifischen Primern und Kontrollprimern für Aktin (D256 und D257, s. Anhang I) durchgeführt. Es wurden mehrere Amplifikationen mit unterschiedlicher Zyklenzahl (25-35 Zyklen) durchgeführt, Aliquots des PCR-Ansatzes (1/10 des Gesamtvolumens) gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Signalstärke der PCR-Produkte verglichen, um den Bereich exponentieller Amplifikation zu bestimmen.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Western-Analyse

Gewebeproben gleicher Blattfläche (0,81 cm²) von Tabak- und *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in 2x SDS-Probenpuffer [50 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 10% (v/v) Glycerin; 2% (w/v) SDS] homogenisiert. Nach Hitzedenaturierung für 10 min wurden die Zelltrümmer pelletiert und gleiche Volumen des Überstandes auf 12,5% (v/v) SDS-Polyacrylamidgelen durch Gelelektrophorese

getrennt (Lämmli, 1970). Die Proteine wurden auf Nitrocellulose-Membranen (Porablot, Macherey-Nagel, Düren) transferiert.

Die Entwicklung der Membranen erfolgte alternativ auf zwei verschiedene Weisen. Dabei wurde TBS/T-Puffer aus 20 mM Tris, 500 mM NaCl und 0,1% (v/v) Tween 20 (Sigma) verwendet.

2.8.1.1 Entwicklung mittels Chemilumineszenz durch Meerrettich-Peroxidase und Quantifizierung von Immunosignalen

Die Membran wurde für eine Stunde in TBS/T-Puffer mit 5% (w/v) filtriertem Magermilchpulver abgesättigt und nachfolgend dreimal mit TBS/T-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem spezifischen ersten Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:3000 bis 1:5000 in TBS/T mit 1% (w/v) filtriertem Magermilchpulver für 1 h bei RT oder ü. N. bei 4°C. Die Entwicklung der Immunoblots erfolgte mit dem „SuperSignal West Dura Extended Duration“-Substrat (Pierce, Rockford, USA) nach 1 h Inkubation mit an Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem sekundären Antikörper (Pierce, Verdünnung 1:100000 in TBS/T mit 1% (w/v) Milchpulver). Antikörper-spezifische Signale wurden durch Exposition gegen Röntgenfilme (Kodak, Stuttgart) detektiert oder mit Hilfe einer CCD-Kamera und dem ChemiDoc-System (Bio-Rad, München) in Echtzeit aufgenommen und quantifiziert. Die Normalisierung der Western-Blots erfolgte, wie bei Badur (1998) beschrieben, durch eine zusätzliche Beprobung und Quantifizierung mit dem ersten Antikörper anti-Transketolase Antiserum (Verdünnung 1:5000 in TBS/T mit 1% (w/v) Milchpulver).

2.8.1.2 Entwicklung mittels Farbreaktion durch alkalische Phosphatase

Die Membran wurde für eine Stunde in TBS/T-Puffer mit 3% (w/v) Rinderserum-Albumin (BSA) abgesättigt und dreimal mit TBS/T-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem spezifischen ersten Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:3000 in TBS/T mit 1% (w/v) BSA für 1 h bei RT oder bei 4°C ü. N. Nach drei 5-minütigen Waschschritten mit TBS/T wurde der zweite, biotinylierte Antikörper (Amersham) in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS/T mit 1% (w/v) BSA zugegeben und eine Stunde inkubiert. Nach drei 5-minütigen Waschschritten wurde die Membran für

30 min mit Streptavidin-alkalischer Phosphatase (Amersham), 1:1000 verdünnt in TBS/T, behandelt und erneut dreimal 5 min gewaschen. Durch Zugabe der Substrate Nitro Blue Tetrazolium (NBT) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat-p-toluidin (BCIP) in 0,017 bzw. 0,033 prozentiger Verdünnung in Diethanolamin-Puffer (10% (v/v) Diethanolamin; 1 mM MgCl₂; 0,002% (w/v) Na₃; pH 9,6 mit HCl) wurden die Bindungsstellen des ersten Antikörpers markiert.

2.8.2 Proteinfärbung mit Coomassie Brillantblau

Die auf SDS-Polyacrylamidgelen (Lämmli, 1970) aufgetrennten Proben (s. 2.8.1) wurden für 5-30 min in einer Lösung aus 0,2% (w/v) Coomassie R250, 42,3% (v/v) Wasser, 42,5% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure und 5% (v/v) Methanol gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in einer Lösung aus 10% (v/v) Essigsäure und 50% (v/v) Methanol.

2.9 Physiologische Untersuchungen

2.9.1 Biomasse und Ertragsparameter

Die *Arabidopsis*-Samen wurden auf Erdkultur ausgelegt und unter kontrollierten Kurztagbedingungen in einem Klimaraum (s. 2.2.1) angezogen. Nach etwa 10 Tagen wurden 35 Pflanzen pro Linie vereinzelt und in neue Töpfe überführt. Anschließend wurden die Pflanzen für weitere 32 Tage unter den beschriebenen Kurztagbedingungen kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die gesamten Rosettenblätter von jeweils 10 Pflanzen vom Wurzelsystem entfernt für die Bestimmung der Blattfläche ausgewachsener *source* Blätter mit Hilfe des Portable Area Meter LI-3000 (Lambda Instruments Corporation, Lincoln, USA) sowie von Blattfrischgewicht und Blattanzahl während der nicht-induktiven, vegetativen Wachstumsphase. Durch Trocknen der Rosetten für zwei Tage bei 50°C wurde das Trockengewicht ermittelt. Unmittelbar darauf wurden die verbleibenden Pflanzen ins Gewächshaus transferiert und für einen Zeitraum von 10-20 Tagen unter den beschriebenen Langtagbedingungen kultiviert (s. 2.2.1), bis sich der Hauptspross ausbildete. Zu Beginn der Sprossbildung

wurden erneut die Rosettenblätter von jeweils 10 Pflanzen vom Wurzelsystem entfernt für die Bestimmung der Blattfläche ausgewachsener *source*-Blätter sowie von Blattfrischgewicht und Blattanzahl während der induktiven, generativen Wachstumsphase. Anschließend wurden die verbleibenden Pflanzen in Aracons (Lehle Seeds, Round Rock, USA) verpackt, weitere zwei Wochen gegossen und dann trocken gehalten, bis die Pflanzen vollständig seneszent waren und sich die Samenanlagen zu öffnen begannen. Das Gesamtgewicht der trockenen Rosettenblätter sowie von Spross und Samen wurde pro Topf bestimmt. Das Samengewicht von jeder individuellen Pflanze wurde ermittelt und zur Bestimmung des Ernte-Indexes vom Gesamtgewicht abgezogen. Weiterhin wurde zur Berechnung des 1000 Korngewichtes das Gewicht von 100 einzeln abgezählten Samen bestimmt. Ausgehend von ermittelter Schotenzahl, Ertrag und 1000 Korngewicht jeder individuellen Pflanze wurde die Samenanzahl pro Samenanlage errechnet. Die Anzahl der Samenanlagen wurde von Pflanzen ermittelt, deren Blüten vollständig in den Samenstand übergegangen waren. Zur Bestimmung des Blühinduktionszeitpunktes wurden die Pflanzen 6 Wochen unter nicht induktiven Kurztagbedingungen angezogen. Nach Transfer ins Gewächshaus mit induktiven Bedingungen wurden die Tage ausgezählt, bis die Petalen der ersten Blüte am Hauptspross sichtbar wurden (Alonso-Blanco *et al.*, 1998).

2.9.2 Bestimmung von löslichen Kohlenhydraten und Stärke

Für die Bestimmung von löslichen Zuckern und Stärke transgener Tabak- und *Arabidopsis*-Pflanzen wurde Blattgewebe identischer Fläche ($0,33 \text{ cm}^2$) mit 80% (v/v) Ethanol (20 mM HEPES-KOH pH 7,5) bei 80°C für 2 h extrahiert. Die Bestimmung von Glukose, Fruktose und Saccharose im Überstand erfolgte mit einem gekoppelten optisch-enzymatischen Test wie bei (Stitt *et al.*, 1989) beschrieben. Zur Stärkebestimmung wurde das extrahierte Gewebe mit 0,2 N KOH für 1 h bei 95°C aufgeschlossen und anschließend der pH-Wert mit 1 N Essigsäure auf 5,5-6,0 eingestellt. Die Quantifizierung der Stärke erfolgte nach Hydrolyse mit Amyloglukosidase (2 U/ml, Boehringer, Mannheim) für 2 h bei 55°C über die Messung der Glukoseeinheiten.

Die qualitative Analyse der Stärkeverteilung in Blättern transgener Pflanzen wurde mit Hilfe der Jodfärbung durchgeführt. Blätter wurden zunächst mit 80% (v/v) Ethanol

im Wasserbad bei 55°C vollständig entfärbt und anschließend für 5-10 min mit Lugol'scher Lösung [0,3% (w/v) Jod; 0,7% (w/v) Kaliumiodid] inkubiert. Die Färbung wurde schließlich durch Waschen der Blätter mit H₂O gestoppt.

Die Bestimmung von Phloemexudaten erfolgte zu drei verschiedenen Zeitpunkten zum einen mit Pflanzen, die 6 Wochen unter Kurztag (vegetative Wachstumsphase) zum anderen mit Pflanzen, die 6 Wochen unter Kurztag und zwei Wochen Langtag (generative Wachstumsphase) sowie mit Pflanzen, welche eine weitere Woche unter Langtag (beginnende Blattseneszenz) kultiviert wurden. Phloemexudate wurden von jeweils 5 Pflanzen pro Linie erhalten. Pro Pflanze wurden zwei ausgewachsene *source*-Blätter mit einer Rasierklinge an der Petiolbasis abgetrennt. Die Blätter wurden in ein 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß mit 200 µl 5 mM EDTA überführt. Die Exudation unter 150 µE Zusatzbeleuchtung und Wasser-gesättigter Atmosphäre (Corbesier *et al.*, 1998) wurde über einen Zeitraum von 6 Stunden durchgeführt. Aliquots wurden nach einer, zwei, vier und 6 Stunden abgenommen und die löslichen Zucker, wie oben beschrieben, gemessen.

2.9.3 Virusinfektion und immunologische Bestimmung des Virustiters

Für die Infektion von *Arabidopsis*-Pflanzen wurde ein *Turnip Mosaic Virus* (TuMV) Isolat von der Bundesanstalt für Züchtungsforschung und Kulturpflanzen (Aschersleben) erhalten und Virusextrakt durch Homogenisieren von infiziertem Blattmaterial in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 (~ 1 g Blattmaterial in 20 ml Puffer) hergestellt. Zur Pflanzeninokulation wurden untere *source*-Blätter mit Carborundum (SiC, Sigma) bestreut, der Virusextrakt mit einem Pistill auf der Blattoberfläche gleichmäßig verrieben, und die behandelten Blätter nach wenigen Minuten Einwirkzeit mit Wasser abgespült. Virussympptome konnten in systemischen Blättern etwa 10-12 Tage nach der Inokulation detektiert werden.

Zur Quantifizierung des Virustiters wurde Blattmaterial identischer Fläche (0,66 cm²) in PBS-Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20, 2% (w/v) PVP 25000 und 0,2% (w/v) BSA homogenisiert. Serielle Verdünnungen des Pflanzenextraktes (1:1-1:64) wurden mittels Doppeltem Antikörper Sandwich (DAS)-ELISA unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen TuMV (BIOREBA, Reinach, Schweiz) analysiert. Der ELISA-Test wurde dabei nach dem Protokoll von BIOREBA durchgeführt und

Extinktionen bei 405 nm mit dem ELISA-Lesegerät 340 ATTC (SLT, Crailsheim) bestimmt (vergl. Auch (Herbers *et al.*, 1996a)).

2.9.4 Bestimmung von Kallose

Die Kalloseextraktion und -bestimmung wurde nach dem Protokoll von (Köhle *et al.*, 1985) durchgeführt. Blattgewebe gleicher Fläche (0,81 cm²) von transgenen Tabak- und *Arabidopsis*-Pflanzen wurde mit 80% (v/v) Ethanol (5 mM EDTA) homogenisiert und mindestens 1 h bis ü. N. auf Eis inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 8000 g wurden die Zelltrümmer erneut in 80% (v/v) Ethanol (5 mM EDTA) homogenisiert und pelletiert. Das Sediment wurde mit Aceton gewaschen und anschließend das Pellet für 15 min im Vakuum getrocknet. Danach wurde das Sediment in 1 M NaOH gelöst, für 20 min bei 80°C inkubiert und die Zelltrümmer durch 5 min Zentrifugation bei 8000 g entfernt. Parallel mit dem Anhydroglukosestandard Pachyman (Megazyme, Bray, Irland) wurde der Überstand mit 0,1% (w/v) Anilinblau versetzt. Nach Zugabe von 1 N HCl wurde mit 1 M Glycin (pH 9,5) neutralisiert. Anschließend wurde der Ansatz 20 min bei 50°C und 50 min bei RT inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im ELISA-Lesegerät Synergy HAT (Bio-Tek, Bad Friedrichshall) bei einer Anregung von 400 nm und Emission von 510 nm.

2.10 Mikroskopische Techniken

2.10.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von GFP-Fusionsproteinen in transgenen Pflanzen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (Carl Zeiss, Jena) und dem konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena). Die Signaldetektion erfolgte mit Hilfe von geeigneten Filtersätzen in den aufgeführten Wellenlängenbereichen (s. Tabelle 2-3).

Tabelle 2-3: Filtersätze mit Wellenlängenbereichen zur Anregung und Detektion von GFP und Chlorophyllfluoreszenz

	Aiovert135		LSM 510 META	
	Anregung	Emission	Anregung	Emission
GFP	450-490 nm	515-565 nm	488 nm	510-525 nm
Chlorophyll	450-490 nm	517-700 nm	488 nm	645-700 nm

2.10.2 Transmissionselektronenmikroskopie und Immunolokalisierung

Elektronenmikroskopische Techniken wurden von Dr. Twan Rutten und Dr. Michael Melzer am IPK Gatersleben durchgeführt. Gewebeproben wurden in HM20- oder Spurr-Harz (Plano GmbH, Marburg) fixiert. Die Untersuchung der Objekte erfolgte an einem Zeiss CEM 902A Transmissionselektronenmikroskop bei 80 kV.

2.11 Statistische Analyse

Die Rohdaten wurden in Microsoft Excel-Tabellen (Microsoft Inc., Redmond, WA, USA) abgelegt.

Ein Teil der erhaltenen Daten wurde mittels Student's t-Test in der SigmaPlot 7.1-Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) auf statistisch signifikante Werte hin analysiert (Matros *et al.*, 2006).

Zur statistischen Absicherung von Spaltunzzahlen wurde der Chi²-Test angewendet (Sachs, 2004). Er vergleicht die beobachteten Werte mit den erwarteten. Mit dem aus der Chi²-Tabelle abgelesenen Wahrscheinlichkeitswert P für die entsprechenden Freiheitsgrade wurde die Übereinstimmung zwischen Hypothese und Beobachtung überprüft.

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Auswirkung des *Potato leafroll virus* Movement Proteins (PLRV-MP17) auf das Wachstum transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen ist Dosis-abhängig

Pflanzenviren kodieren Transportproteine, so genannte virale Movement Proteine (MPs), welche den Zell-zu-Zell-Transport des viralen Genoms für eine erfolgreiche systemische Infektion der Pflanze vermitteln (Ghoshroy *et al.*, 1997; Lazarowitz und Beachy, 1999a). Dabei interagieren sie mit strukturellen Komponenten der Plasmodesmen (PDs) und modifizieren die plasmodesmale Leitfähigkeit. Die stabile Expression von MPs in transgenen Pflanzen wird begleitet von Veränderungen des Kohlenhydratmetabolismus und der Photoassimilatverteilung sowie von Änderungen in der Biomasseproduktion (Lucas *et al.*, 1993; Balachandran *et al.*, 1995; Olesinski *et al.*, 1995; Olesinski *et al.*, 1996; Almon *et al.*, 1997; Lucas und Wolf, 1999; Hofius *et al.*, 2001; Shalitin *et al.* 2002). Dies resultierte in der Hypothese, dass virale MPs mit endogenen Molekülen (Protein, RNA) um das plasmodesmale Transportsystem konkurrieren oder symplastische Netzwerke verändern und damit in *sink/source*-Interaktionen eingreifen (Lucas und Wolf, 1999). Somit bieten MP-transgene Pflanzen ein geeignetes System, um die Wirkungsweise von MPs auf PD-vermittelte Transportmechanismen und die Regulation der Photoassimilatverteilung zwischen *sink* und *source* zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde aufbauend auf bisherigen Untersuchungen, die im Wesentlichen in *Nicotiana tabacum* und *Solanum tuberosum* erfolgten, das PLRV-MP17-System in dem Model-Organismus *Arabidopsis thaliana* etabliert (Hofius, 2003).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit lag ein wesentlicher Schwerpunkt in der weiteren zellbiologischen, biochemischen und physiologischen Analyse der MP17:GFP-exprimierenden Columbia-Linien (Col-0). Dies sollte in Ergänzung zu neu transformierten, MP17:GFP-exprimierenden Linien in den *Arabidopsis*-Ökotypen C24 und *Landsberg erecta* (*Ler*) erfolgen. Damit sollte der Einfluss von MP17 auf den Kohlenhydratmetabolismus, die Biomasseverteilung, die *sink/source*-Beziehungen

und die Virusanfälligkeit in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen untersucht werden. Hierdurch sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Sind die in anderen Organismen beobachteten Effekte auch auf *Brassicaceae* übertragbar und damit eine generelle Eigenschaft der MP17-PD-Interaktion?
- Gibt es in verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen eine ähnliche Wirkungsweise?
- Unterliegen die Veränderungen in Assimilattransport, Kohlenhydrat- und Ressourcenverteilung sowie in der Resistenz gegenüber Virusinfektion einer Korrelation mit der MP17-Proteinmenge?

3.1.1 Primärcharakterisierung von MP17:GFP-transgenen *Arabidopsis thaliana*-Linien

Zu Beginn der Arbeit standen konstitutiv MP17:GFP-exprimierende *Arabidopsis*-Pflanzen des Ökotyps Col-0 bereit. Sie wurden im Vorfeld von Dr. Daniel Hofius über Vakuuminfiltration mit dem binären Konstrukt p35S-1 (Hofius *et al.*, 2001, Abb. 1A), transformiert und homozygotes Saatgut generiert (Hofius, 2003).

Um die Frage zu beantworten, ob die Auswirkungen der MP17-Expression auf pleiotrope Effekte oder spezifische Modifikationen von PDs zurückzuführen und diese auf verschiedene *Arabidopsis*-Ökotypen zu übertragen sind, wurden Wildtyp-Pflanzen der Ökotypen C24 und *Ler* stabil transformiert. Die Transformation wurde mit dem oben genannten Konstrukt mittels Vakuuminfiltration (s. 2.4.1) nach *Agrobacterien*-vermittelter Transformation durchgeführt. Das gewonnene T1-Saatgut wurde auf Kanamycin selektiert und resistente Keimlinge über Western-Analysen mit Hilfe des anti-MP17 Antiserums (Tacke *et al.*, 1993) bzw. über Fluoreszenzmikroskopie auf Expression von MP17:GFP durchmustert. Von 18 Transformanden im *Ler*-Ökotyp war bei 11 Pflanzen ein spezifisches Signal in einer Laufhöhe von 45 kDa nachweisbar, was dem berechneten Molekulargewicht für das Fusionsprotein von 17 kDa (MP17) und 27 kDa (GFP) entsprach. Im C24-Ökotyp wurden 150 Kanamycin-resistente Primärtransformanden erhalten und mittels Fluoreszenzmikroskopie 70 Pflanzen identifiziert, welche eine punktuelle GFP-Fluoreszenz im plasmodesmalen Zellwandbereich von Epidermiszellen zeigten.

Transgene Pflanzen der Linien C24-35S-MP17:GFP 74, 81 und 84, die sich durch unterschiedlich starke Fluoreszenzsignale auszeichneten und im Folgenden als C24-81, -84 und -74 bezeichnet werden, wurden nach Verifizierung der MP17-Expression in der T2-Generation analysiert. Von den beiden Linien *Ler*-35S-MP17:GFP 1 und 12

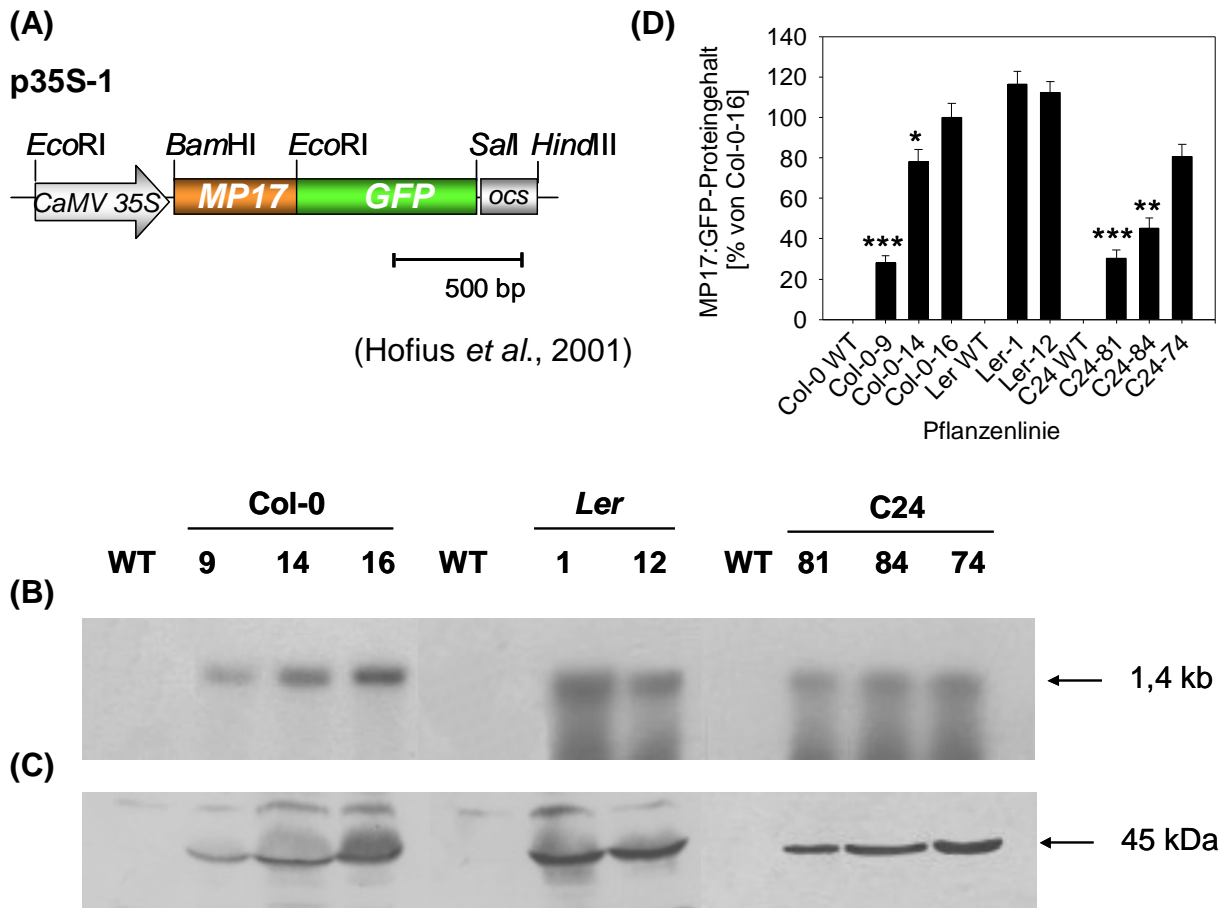


Abbildung 3-1: Expressionsanalyse von MP17:GFP in transgenen *Arabidopsis*-Linien der Ökotypen Columbia (Col-0), *Landsberg erecta* (*Ler*) und C24

(A) Schematische Darstellung der binären Expressionskassette p35S-1, die zur Transformation von *Arabidopsis* eingesetzt wurde. GFP wurde am 5'-Ende von MP17 fusioniert und die gesamte kodierende Region (1209 bp) zwischen den CaMV-35S-Promotor und den *ocs*-Terminator des Bin19-Vektors in die *Bam*HI/*Sal*I-Schnittstellen inseriert.

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

(C) Western-Analyse der MP17:GFP-Proteinakkumulation in verschiedenen transgenen Linien und der jeweiligen WT-Kontrolle. Auf jede Spur wurden identische Mengen an Gesamtprotein (20 µg) aufgetragen und unter Verwendung eines polyklonalen anti-MP17-Antiserums (1:5000 Verdünnung) sowie eines sekundären HRP-konjugierten IgG-Antikörpers (1:100000) analysiert.

(D) Quantifizierung der MP17:GFP-Proteingehalte in den transgenen *Arabidopsis*-Linien. Die Proteingehalte sind als prozentuale Mittelwerte ± Standardfehler von 4 Pflanzen bezogen auf die Referenzlinie Col-0-16 angezeigt. Unter Verwendung des Student's t-Test wurde die Verschiedenheit von der Bezugslinie Col-0-16 bestimmt. Signifikante Unterschiede sind als * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ angegeben.

(*Ler-1* und *Ler-12*), die in der Western-Analyse das stärkste MP17:GFP-Signal zeigten, wurde Saatgut gewonnen und über mehrere Generationen so vermehrt, dass für die Analysen Pflanzenmaterial mit einheitlichem Phänotyp erhalten wurde. Die Untersuchungen der transgenen Linien im *Ler*- und C24-Hintergrund wurden parallel zu den bereits homozygot MP17:GFP-exprimierenden Linien 9, 14 und 16 im Col-0-Ökotyp durchgeführt.

In Abb. 3-1 ist die Expressionsanalyse ausgewählter transgener *Arabidopsis*-Linien dargestellt, welche für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet wurden. Bis zur Probennahme für die Bestimmung der MP17:GFP-Expression wurden die Pflanzen 6 Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert.

Es konnte bestätigt werden, dass im Col-0-Ökotyp die Linie 16 sowohl in der Northern- als auch der Western-Analyse das stärkste MP17-Expressionssignal aufweist. Aus diesem Grund wurde die Linie Col-0-16 als Referenzlinie ausgewählt und bei der Bestimmung des MP17-Proteingehaltes in den verschiedenen transgenen Linien der drei *Arabidopsis*-Ökotypen wurden alle Werte auf den Proteingehalt von Col-0-16 bezogen.

Die Quantifizierung der MP17:GFP-Proteinmengen erfolgte über quantitative Western-Analyse unter Verwendung des polyklonalen anti-MP17-Antikörpers. Zum Abgleich des Gesamtproteingehaltes der verschiedenen Extrakte wurde eine zusätzliche Beprobung der Western-Blots mit dem anti-Transketolase-(anti-TK) Antiserum (Henkes *et al.*, 2001) durchgeführt. Mögliche Unterschiede in der Signalstärke zwischen einzelnen Blots wurden durch jeweils drei unabhängige Positivkontrollen ausgeglichen. Die Proteingehalte wurden als prozentuale Werte über 4 Pflanzen gemittelt und der Standardfehler bestimmt. Dabei wurde die Verschiedenheit von der Referenzlinie Col-0-16 mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt.

Die Analysen ergaben, dass innerhalb des Col-0-Ökotyps das MP17:GFP-Expressionsniveau in den Linien 9 und 14 signifikant niedriger war als das von Col-0-16. Dabei akkumulierten die beiden Linien MP17:GFP mit 28% (Col-0-9) im niedrigeren und mit 78% (Col-0-14) im mittleren Expressionsbereich. Auch im transgenen C24-Hintergrund war die Expression gegenüber der Bezugslinie deutlich vermindert, und es ergab sich ein ähnliches Bild wie in Col-0. Der MP17:GFP-Proteingehalt in den ausgewählten Linien erreichte 30% (C24-81), 45% (C24-84) und 80% (C24-74) im Verhältnis zur Bezugslinie Col-0-16 und war für C24-81 und C24-84

statistisch signifikant niedriger. Im Gegensatz dazu überschritten beide transgene Linien im *Ler*-Ökotyp das MP17:GFP-Proteinexpressionsniveau von Col-0-16 um 12% bzw. 16%.

Die Expressionsanalyse zeigte, dass die *MP17:GFP*-spezifischen RNA-Signale der Linien Col-0-16, *Ler-1* und *Ler-12* mit hohem Proteinexpressionslevel stärker markiert waren als in den schwächer exprimierenden C24-Linien, Col-0-9 und Col-0-14. Somit konnte festgestellt werden, dass die Expressionsstärke des Fusionsproteins mit der *MP17:GFP*-Transkriptmenge korrelierte. Daher sollte mittels Southern-Analyse überprüft werden, ob die hohen Transkriptmengen der stark exprimierenden Linien durch mehrere Insertionen des binären Konstruktes p35S-1 bedingt wurden. Dazu wurden als Restriktionsenzyme *KpnI*, *BamHI* und *HindIII* ausgewählt. Sie schneiden innerhalb der Expressionskassette an distinkten Restriktionsschnittstellen und führen somit zum Herausschneiden des Fusionskonstruktes bzw. zur Linearisierung der DNA. Die so behandelte genomische DNA von 5 Wochen alten Pflanzen wurde mit einem radioaktiv markierten *MP17*-Fragment als Sonde hybridisiert.

In der geschnittenen DNA von Col-0-14 wurde ein komplexes Bandenmuster markiert, welches vermutlich auf multiple Insertionen der binären Expressionskassette zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt). Hingegen tragen die Linien Col-0-9, Col-0-16 vermutlich nur eine Kopie.

Auffällig in den Southern-Analysen war, dass bei gleichmäßig aufgetragenen Mengen an genomischer DNA die Banden in Col-0-16 und den beiden *Ler*-Linien eine deutlich geringere Signalstärke aufwiesen als in Col-0-9 und -14.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass kein Zusammenhang zwischen Anzahl an Insertionen der binären Expressionskassette und Expressionsstärke von *MP17:GFP* besteht.

3.1.2 Kohlenhydratstatus in *MP17:GFP*-transgenen *Arabidopsis* Col-0, *Ler* und C24

Aus den Berichten einiger Autoren zu Untersuchungen TMV-MP30-transgener Pflanzen, die hauptsächlich in Kartoffel und Tabak erfolgten, sind Veränderungen in Kohlenhydratmetabolismus und -verteilung bekannt (Lucas *et al.*, 1993; Balachandran *et al.*, 1995; Olesinski *et al.*, 1995; Olesinski *et al.*, 1996; Almon *et al.*,

1997; Lucas und Wolf, 1999). Auch für das MP17 des Phloem-limitierten *Potato leafroll virus* (PLRV) wiesen Herbers *et al.* (1997) in Tabakpflanzen nach, dass die Expression in einer Akkumulation von Kohlenhydraten und reduzierten photosynthetischen Kapazität in *source*-Blättern resultierte. Hofius *et al.* (2001) konnten zeigen, dass die Modulationen des Kohlenstoffhydrathaushaltes mit der Menge an MP17-Protein korrelierte. Wohingegen die Veränderung des Größenausschlussvolumens der PD unabhängig von der Expressionshöhe erfolgte. Weiterhin war die konstitutive Expression des plasmodesmal lokalisierten, Pathogenresponsiven Proteins PRms aus Mais in transgenen Tabakpflanzen mit der Aktivierung des Saccharose-Effluxes aus photosynthetisch aktiven Blättern verbunden (Murillo *et al.*, 2003).

Daher wurde in Ergänzung zur Expressionsanalyse der MP17:GFP-transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen ihr Kohlenhydratgehalt bestimmt, um zu überprüfen, ob diese Linien und verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen ebenfalls Dosis-abhängigen Veränderungen in Kohlenhydratmetabolismus und -verteilung unterliegen.

Die Gehalte an löslichen Zuckern und Stärke wurden in ausgewachsenen *source*-Blättern von 5 Wochen alten Pflanzen homozygoter Col-0- und *Ler*-Linien gemessen. Vor der Probennahme in den C24-Linien wurden zunächst alle T2-Pflanzen über Western-Analyse getestet und nur solche selektiert, die MP17:GFP-Protein exprimieren.

Wie in Abb. 3-2 dargestellt, konnten frühere Beobachtungen zur Photoassimilatverteilung in den transgenen Col-0-Linien bestätigt werden (Hofius, 2003) und belegen somit die Übertragbarkeit der an *Solanaceae* erhobenen Daten auf *Arabidopsis*.

In Übereinstimmung mit den Daten aus Col-0-16 wiesen die beiden *Ler*-Linien, die sich ebenfalls durch ein hohes MP17:GFP-Expressionsniveau auszeichneten, auch signifikante Mengen an löslichen Kohlenhydraten und Stärke in *source*-Blättern auf. Allerdings war die Akkumulation von Stärke gegenüber der entsprechenden WT-Kontrolle nicht so ausgeprägt wie in Col-0-16. In diesem Zusammenhang war in den stark exprimierenden Linien das Verhältnis von löslichen Zuckern zu Stärke um das 1,9- bis 2,6-fache erhöht.

Dagegen konnte in den schwächer exprimierenden C24-Linien 81 und 84 ein tendenziell geringerer Gehalt an löslichen Zuckern beobachtet werden. Jedoch erwiesen sich die Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen WT-Referenz nicht als

statistisch signifikant. Lediglich im Stärkegehalt von C24-74 konnte ein minimaler und ebenfalls nicht statistisch abgesicherter Anstieg gegenüber der WT-Kontrolle verzeichnet werden, während der Gehalt an Hexosen und Saccharose unverändert blieb.

Die Werte der einzelnen Kohlenhydratmessungen sind mit den ermittelten Signifikanzen tabellarisch im Anhang II zusammengefasst.

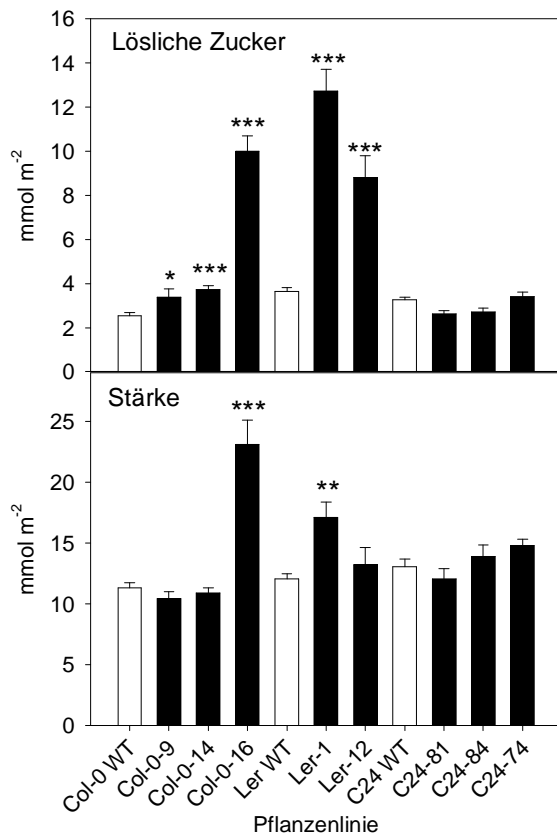


Abbildung 3-2: Kohlenhydratgehalte in MP17:GFP-transgenen Linien der Ökotypen Columbia (Col-0), Landsberg erecta (Ler) und C24 im Vergleich zur jeweiligen Wildtyp-Kontrolle (WT)

Die Pflanzen wurden 5 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen. 8 Stunden nach Beginn der Lichtphase wurden Proben von jeweils zwei vollständig entwickelten *source*-Blättern pro Pflanze genommen. Es wurden lösliche Zucker und Stärke bestimmt. Die Daten wurden von jeweils 10 Pflanzen erhalten, wobei die beiden Werte von jeder Pflanze gemittelt wurden. In der Abbildung sind die Mittelwerte von 10 Pflanzen pro Linie mit Fehlerbalken, der den Standardfehler kennzeichnet, angegeben. Mittels Student's t-Test wurde die Verschiedenheit von der jeweiligen WT-Kontrolle ermittelt. Signifikante Unterschiede sind als * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ dargestellt.

3.1.3 Verifizierung von Phänotyp und Biomasseverteilung

Da die Änderungen im Kohlenhydrathaushalt infolge von MP-Expression häufig von phänotypischen Ausprägungen begleitet werden (Lucas *et al.*, 1993; Balachandran *et al.*, 1995; Olesinski *et al.*, 1995; Lucas *et al.*, 1996; Olesinski *et al.*, 1996; Almon *et al.*, 1997; Balachandran *et al.*, 1997; Lucas und Wolf, 1999; Hofius *et al.*, 2001; Shalitin *et al.*, 2002; Rinne *et al.*, 2005) wurde im nächsten Schritt die Verteilung der Biomasse in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht.

3.1.3.1 Änderung der vegetativen Blattbiomasse nach MP17-Expression

Zu diesem Zweck wurden jeweils 35 Pflanzen der ausgewählten transgenen Linien in den drei Ökotypen Col-0, *Ler* und C24 unter Kurztagbedingungen in einer Phyto-kammer angezogen. Repräsentative, 5 Wochen alte Vertreter der homozygoten Linien im Col-0- und *Ler*-Hintergrund sowie MP17:GFP-exprimierende Linien des C24-Ökotyps in der T2-Generation sind in Abb. 3-3 dokumentiert. Sie zeigten erhebliche Veränderungen in der Verteilung der oberirdischen Biomasse.

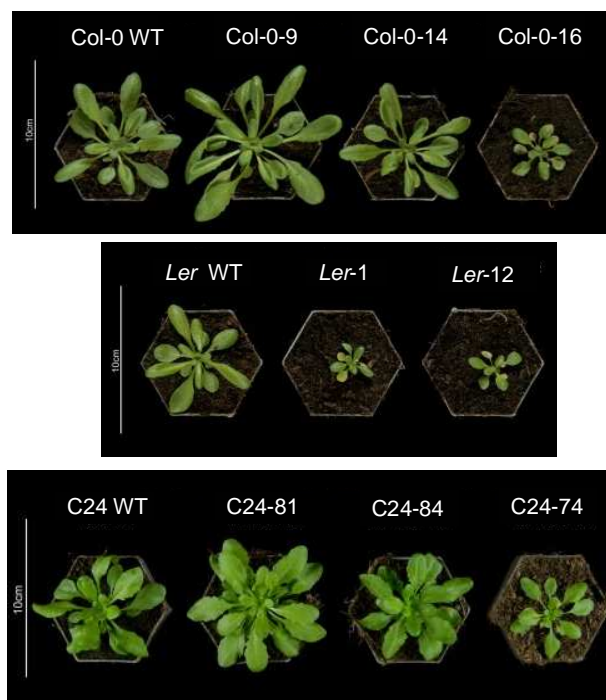


Abbildung 3-3: Phänotyp MP17:GFP-transgener *Arabidopsis*-Linien der Ökotypen Columbia (Col-0), *Landsberg erecta* (*Ler*) und C24 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (WT) nach 5 Wochen unter Kurztagbedingungen

Die Linien Col-0-16, *Ler-1*, *Ler-12* und C24-74 mit einem hohen MP17:GFP-Expressionsniveau zeichneten sich, wie bereits bei Hofius (2003) für Col-0-16 beschrieben, durch einen verminderten Wuchs und ein auffälliges Ausbleichen der Interkostalregionen in den unteren *source*-Blättern aus. Hingegen schienen die Pflanzen der schwächer exprimierenden Linien Col-0-9 und C24-81 größer zu sein als der entsprechende WT, während Col-0-14 und C24-84 mit einem mittleren MP17:GFP-Expressionsniveau unverändert aussahen.

Um diese Veränderungen zu verifizieren, wurden die MP17:GFP-exprimierenden Linien der drei *Arabidopsis*-Ökotypen Col-0, *Ler* und C24 nach 6 Wochen

Kultivierung unter Kurztagbedingungen analysiert (s. Tab. 3-1). Dazu wurden von jeweils 5-10 Pflanzen pro Linie durch Abtrennen der Rosettenblätter vom Wurzelsystem die Blattfrischgewichte ermittelt, die Gesamtblätter pro Pflanze ausgezählt und mittels Portable Area Meter die Blattfläche von zwei repräsentativen *source*-Blättern je Pflanze bestimmt. Im Col-0-Hintergrund wurden die Werte über drei unabhängige Anzuchten (Set 1, 3 und 4) gemittelt, die im Anhang III angegeben sind.

Tabelle 3-1: Analyse der vegetativen Blattbiomasse von MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen

Linie	Blattfrischgewicht [g]	Blattzahl	Blattfläche [cm ²]
Col-0 WT	1,923 ± 0,076	32,800 ± 0,520	5,062 ± 0,412
Col-0-9	2,226 ± 0,078*	34,000 ± 0,500	5,159 ± 0,128
Col-0-14	1,754 ± 0,069	32,800 ± 0,412	4,799 ± 0,550
Col-0-16	0,264 ± 0,017***	20,600 ± 0,424***	1,890 ± 0,175***
<i>Ler</i> WT	2,414 ± 0,136	30,286 ± 0,768	4,992 ± 0,301
<i>Ler</i> -1	0,155 ± 0,017***	16,200 ± 0,265***	1,632 ± 0,117***
<i>Ler</i> -12	0,204 ± 0,024***	18,000 ± 0,316***	1,783 ± 0,055***
C24 WT	1,350 ± 0,022	35,500 ± 0,224	3,835 ± 0,217
C24-81	1,900 ± 0,146*	35,000 ± 1,470	4,022 ± 0,167
C24-84	1,383 ± 0,099	30,000 ± 1,058	3,302 ± 0,175
C24-74	0,400 ± 0,071***	18,714 ± 0,539***	1,814 ± 0,218***

Aufgeführt sind Blattfrischgewicht, Gesamtblattzahl und über zwei Blätter pro Pflanze gemittelte Blattfläche der transgenen Linien im Vergleich zur jeweiligen WT-Kontrolle. Die Pflanzen wurden 6 Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert und die Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler von 5-10 Pflanzen von *Landsberg erecta* (*Ler*) und C24. Die Werte des Columbia-Ökotyps (Col-0) wurden aus drei unabhängigen Datensets ermittelt. Signifikante Unterschiede von der jeweiligen Kontrolle (* P < 0,05, ** P < 0,01 und *** P < 0,001) wurden unter Verwendung des Student's t-Test bestimmt.

Die Analyse der oberirdischen Biomasse während der vegetativen, nicht-induktiven Wachstumsphase ergab, dass das Blattfrischgewicht in Col-0-16 nur 14% vom WT-Niveau betrug und damit aufgrund einer deutlich geringeren Blattzahl bei gleichzeitig wesentlich kleineren Blättern statistisch signifikant reduziert war. Weil die Blattanzahl auf 63% reduziert war und die Blattflächen 37% vom WT ausmachten, müssen die einzelnen Blätter signifikant leichter sein. Ähnlich verhielt es sich in den beiden *Ler*-Linien (Datenset 4), die ebenfalls ein sehr hohes MP17:GFP-Expressionsniveau

aufwiesen. Bei ihnen erreichte die Blattbiomasse sogar nur 6% bzw. 8% vom zugehörigen WT und stand gleichfalls mit einer signifikanten Reduktion von Blattzahl, -fläche und -gewicht in Zusammenhang. Auch in der Linie C24-74 war mit 30% der WT-Blattbiomasse das Wachstum deutlich gehemmt.

Im Gegensatz dazu produzierten die schwächer exprimierenden Linien Col-0-9 und C24-81 mehr Blattbiomasse (116% und 141%) als die entsprechenden WT-Kontrollen. In Übereinstimmung damit deutete sich an, dass Col-0-9 und C24-81 tendenziell aber nicht statistisch signifikant mehr und größere Blätter ausbildeten als der jeweilige WT. Daraus konnte errechnet werden, dass die Blätter in diesen Linien signifikant schwerer sein müssen.

Insgesamt fiel auf, dass die höchste MP17:GFP-Expression und stärkste Akkumulation von löslichen Zuckern und Stärke in den *source*-Blättern von Col-0-16, *Ler-1* und *Ler-12* von der geringsten Biomasseproduktion begleitet war. Ein etwas schwächeres Expressionsniveau und eine weniger ausgeprägte Wachstumshemmung in C24-74 waren nur mit einem minimalen Anstieg des Gesamtkohlenhydratgehaltes verbunden. Demgegenüber schien die erhöhte vegetative Blattbiomasse in den schwächer exprimierenden Linien Col-0-9 und C24-81 mit einer leichten Reduktion von Saccharose und Stärke in Zusammenhang zu stehen.

3.1.3.2 Bestimmung von generativer Blattbiomasse und Blühinduktionszeitpunkt

Um weiterhin aufzuklären, ob neben den beobachteten Veränderungen in vegetativer Blattbiomasse und der Photoassimilatverteilung auch der Übergang der MP17:GFP-transgenen Linien von vegetativem zu generativem Wachstum betroffen ist, wurde die oberirdische Blattbiomasse im generativen, induktiven Entwicklungsstadium untersucht (s. Abb. 3-4). Dazu wurden die verbleibenden 25 Pflanzen jeder Linie unmittelbar nach 6 Wochen Kurztag unter Langtagbedingungen transferiert.

Etwa zwei Wochen nach Transfer begann die Sprossbildung. In diesem Stadium näherte sich die Gesamtblattzahl der transgenen Linien dem Ökotyp-spezifischen WT-Niveau an. Das traf sowohl auf die schwächer exprimierenden als auch die stark MP17:GFP-akkumulierenden Linien zu. Lediglich in allen transgenen Linien des C24-Ökotyps war die Anzahl der Blätter gegenüber der WT-Kontrolle deutlich erniedrigt.

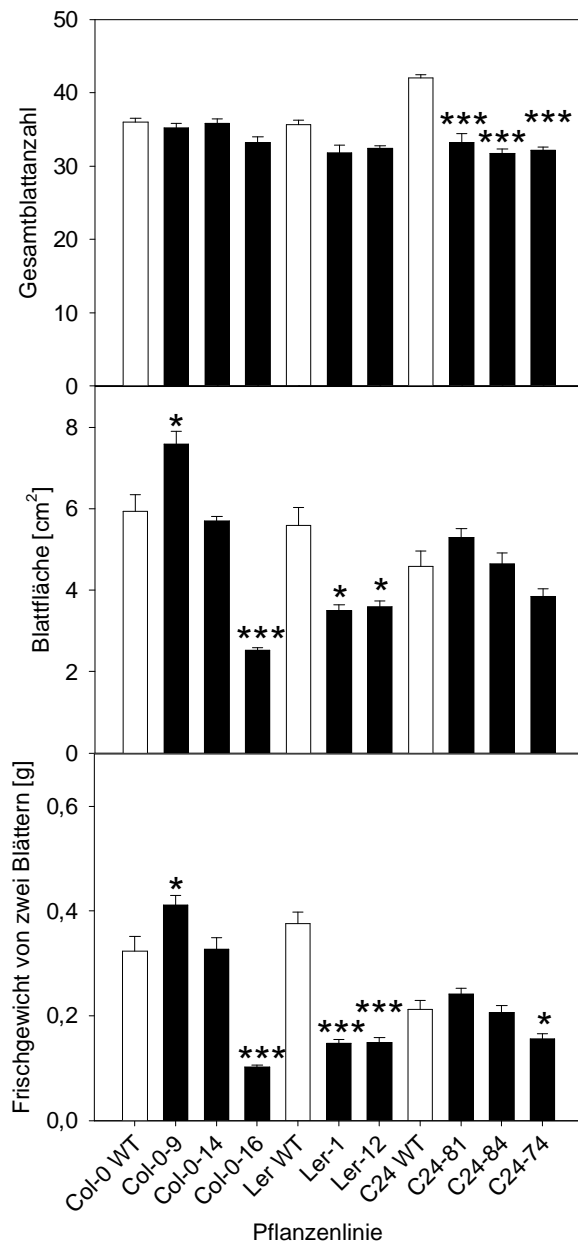


Abbildung 3-4: Analyse der generativen Blattbiomasse von MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen der Ökotypen Columbia (Col-0), *Landberg erecta* (Ler) und C24 im Vergleich zur WT-Kontrolle

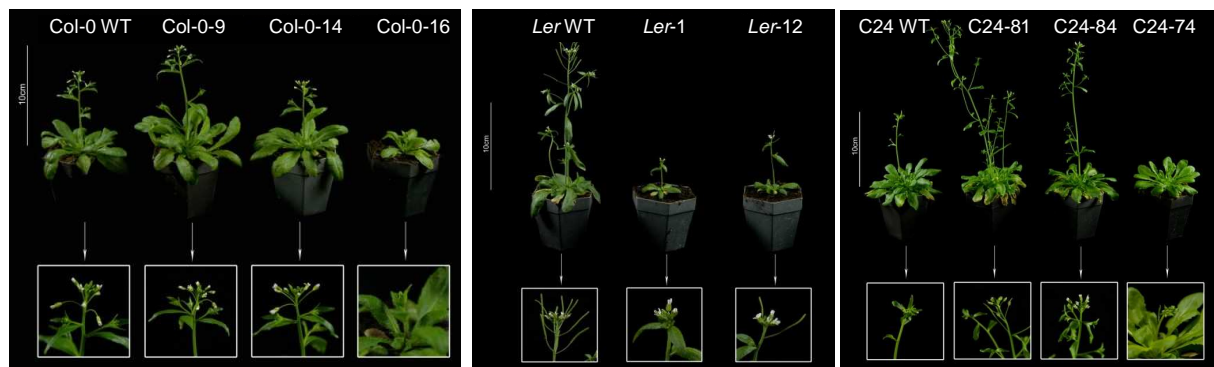
Die Pflanzen wurden 6 Wochen unter Kurztag angezogen und unmittelbar darauf unter Langtagbedingungen transferiert. Etwa nach zwei Wochen unter Langtag setzte die Sprossbildung ein. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Gesamtblattanzahl pro Pflanze ausgezählt, die Blattfläche unter Verwendung eines Portable Area Meter über zwei repräsentative *source*-Blätter gemittelt und das Blattfrischgewicht der zwei *source*-Blätter bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von 5-10 Pflanzen je Linie. Unter Verwendung des Student's t-Test wurde die Verschiedenheit zur jeweiligen WT-Kontrolle bestimmt. Signifikante Unterschiede sind als * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ angegeben.

Im Gegensatz dazu blieben die spezifischen Unterschiede der transgenen Linien in Fläche und Gewicht von zwei repräsentativen *source*-Blättern pro Pflanze auch während der generativen Wachstumsphase weitestgehend bestehen. Die *source*-Blattfläche der schwach exprimierenden Linien Col-0-9 und C24-81 war gegenüber dem entsprechenden WT um 28% bzw. 16% erhöht. Dies war begleitet von einem größeren Frischgewicht dieser Blätter als in der dazugehörigen Kontrolle. In der statistischen Analyse erwies sich die Erhöhung in Größe und Gewicht der *source*-Blätter von Col-0-9 als signifikant.

Demgegenüber war die Blattgröße der stark exprimierenden Linien Col-0-16, *Ler*-1 und *Ler*-12 signifikant auf 42%, 62% bzw. 64% im Vergleich zum jeweiligen WT

reduziert, was sich auch auf das Gewicht auswirkte. Im Zusammenhang mit dem Anstieg in der Gesamtblattzahl während der generativen Wachstumsphase würde sich in diesen Linien eine geringere Reduktion im Gesamtfrischgewicht der oberirdischen Biomasse ergeben als im vegetativen Stadium. Es fiel auf, dass das Wachstum in Form von Blattfläche und -frischgewicht der mittelhoch exprimierenden Linie C24-74 um etwa 16% bzw. 27% gehemmt war und die Inhibierung der

(A)



(B)

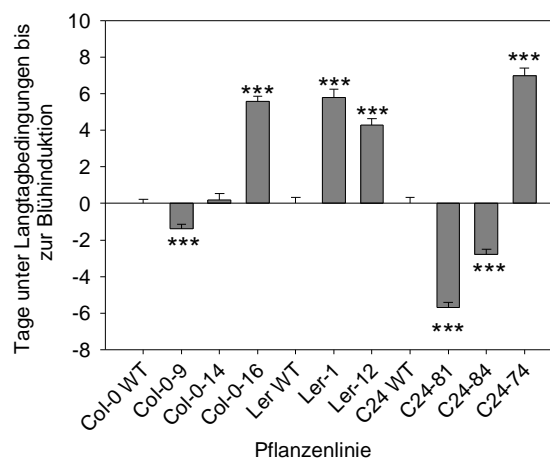


Abbildung 3-5: Blühverhalten MP17:GFP-transgener *Arabidopsis*-Linien der Ökotypen Columbia (Col-0), *Landsberg erecta* (Ler) und C24 im Vergleich zur entsprechenden WT-Kontrolle

Die Pflanzen wurden 6 Wochen unter Kurztag angezogen, anschließend unter Langtagbedingungen transferiert und die Anzahl der Tage unter Langtag bis zum Öffnen der ersten Blüte ermittelt. Unter (A) ist die Dokumentation 14 Tage (Col-0), 15 Tage (Ler) und 10 Tage (C24) nach Transfer unter Langtag abgebildet. Der Hauptspross wurde heraus vergrößert und der Größenmaßstab gibt 10 cm an. Unter (B) ist die Differenz des Blühinduktionszeitpunktes im Verhältnis zum Ökotyp-spezifischen WT als Mittelwert \pm Standardfehler von 10 Pflanzen pro Linie angegeben (Col-0 WT = 11,9, Ler WT = 8,8, C24 WT = 10,1 Tage unter Langtag bis Blühinduktion). Unter Verwendung des Student's t-Test wurde die Verschiedenheit zur jeweiligen WT-Kontrolle bestimmt. Signifikante Unterschiede sind als *** $P < 0,001$ angegeben.

Ausbildung von oberirdischer Biomasse während der generativen Wachstumsphase damit ebenfalls deutlich geringer ausfiel als in Col-0-16, Ler-1 und Ler-12. In der

statistischen Analyse erwies sich diese Reduktion lediglich für das Blattfrischgewicht als statistisch signifikant. Während dessen war in den Linien Col-0-14 und C24-84 mit einem mittleren Expressionsniveau kein Unterschied gegenüber der WT-Kontrolle zu beobachten.

Das mit dem Übergang von vegetativer zu generativer Wachstumsphase verbundene Blühverhalten war in den MP17:GFP-transgenen Linien ebenfalls verändert. Dabei wurden nach 6-wöchiger Kultivierung unter Kurztag und anschließendem Transfer unter Langtagbedingungen die Tage unter Langtag bis zum Öffnen der ersten Blüte am Hauptspross von jeweils 10 Pflanzen ausgezählt. In den niedrigen und mittelstark exprimierenden Linien C24-81, C24-84 und Col-0-9 war der Blühinduktionszeitpunkt um ungefähr sechs, drei und einen Tag(e) im Vergleich zum entsprechenden WT vorverlegt (s. Abb. 3-5). Die statistische Analyse ergab, dass diese Linien mit einer Wahrscheinlichkeit von $P < 0,001$ signifikant früher blühen als die Kontrolle. Währenddessen war die Induktion des Blühzeitpunktes in den stark MP17:GFP-akkumulierenden Linien C24-74, Col-0-16, *Ler-1* und *Ler-12* gegenüber der Ökotyp-spezifischen WT-Kontrolle signifikant um sieben, sechs und vier Tage verzögert.

Trotz dieser ähnlichen Tendenzen im Blühverhalten in Abhängigkeit von der MP17:GFP-Expressionsstärke war zu beobachten, dass sich der Zeitpunkt der Blühinduktion in den verschiedenen Ökotypen spezifisch unterscheidet. Der Mittelwert unter Langtagbedingungen bis zum Öffnen der ersten Blüte lag im Col-0 WT bei etwa 12 Tagen, im *Ler* WT bei fast 8 Tagen und für den C24 WT betrug er 10 Tage.

3.1.3.3 Untersuchungen zum Samenertrag und Ernteindex

Die Verschiebung des Blühinduktionszeitpunktes deutete an, dass der Dosis-abhängige Einfluss des MP17:GFP-Gehaltes auf die Kohlenhydratverteilung im Zusammenhang mit der Akkumulation von vegetativer und generativer Biomasse mit spezifischen Veränderungen der reproduktiven Leistung verbunden sein könnte. Aus diesem Grund wurde der Samenertrag von 5-10 Pflanzen pro transgener Linie und WT bestimmt, die nach der Untersuchung von vegetativer und generativer Blattbiomasse verblieben waren. Die Schoten am Hauptspross begannen sich zu öffnen und die Pflanzen waren alle vollständig seneszent, nachdem sie zunächst 6

Wochen unter Kurztag angezogen und anschließend unter Langtag transferiert wurden.

Wie in Abb. 3-6 gezeigt, war die hohe MP17:GFP-Expression der stark im Wachstum gehemmten Linie Col-0-16 in drei unabhängigen Anzuchten (Set 1, 3 und 4) mit einer konsistenten und signifikanten Zunahme im Samenertrag um durchschnittlich 29% bezüglich der WT-Kontrolle verbunden. Zur Verifizierung, ob der Samenertrag auch in den beiden stark exprimierenden *Ler*-Linien 1 und 12 verbessert ist, wurden im unabhängigen Anzuchtset 4 die Col-0- und *Ler*-Linien parallel kultiviert. In Übereinstimmung mit den Daten aus Col-0-16 war die Samenproduktion in diesen beiden Linien ebenfalls signifikant um 49% bzw. 26% erhöht.

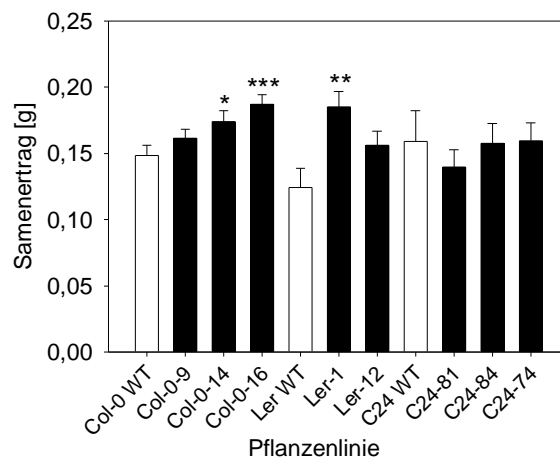


Abbildung 3-6: Samenertrag MP17:GFP-transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

Die reproduktive Leistung wurde von 5-10 vollständig seneszenten Pflanzen der Ökotypen *Landsberg erecta* (*Ler*) und C24 bestimmt. Im Columbia-Ökotyp (Col-0) resultieren die Daten aus drei unabhängigen Anzuchten mit jeweils 10 Pflanzen pro Linie. Angegeben sind die Mittelwerte des Samenertrages pro Pflanze. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Unter Verwendung des Student's t-Test wurde die Verschiedenheit zur jeweiligen WT-Kontrolle bestimmt. Signifikante Unterschiede sind als * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ angegeben.

Hingegen erschien der Samenertrag in den schwächer exprimierenden Linien Col-0-9 und Col-0-14 nur leicht erhöht. Währenddessen war er in den C24-Linien, deren Daten aus einer unabhängigen Anzucht stammen, entweder unverändert oder in Linie C24-84, welche unter Kurztagbedingungen die höchste Akkumulation an vegetativer Blattbiomasse zeigte, sogar leicht reduziert.

Die Werte der einzelnen Datensets von Col-0 und *Ler* sind im Anhang III angegeben. Um die Frage zu beantworten, worin die Ursache der Veränderungen im Samenertrag liegt, wurde in einem weiteren Datenset mit jeweils 5-10 Pflanzen pro

Linie die Anzahl der Schoten ausgezählt sowie von vollständig seneszenten Pflanzen

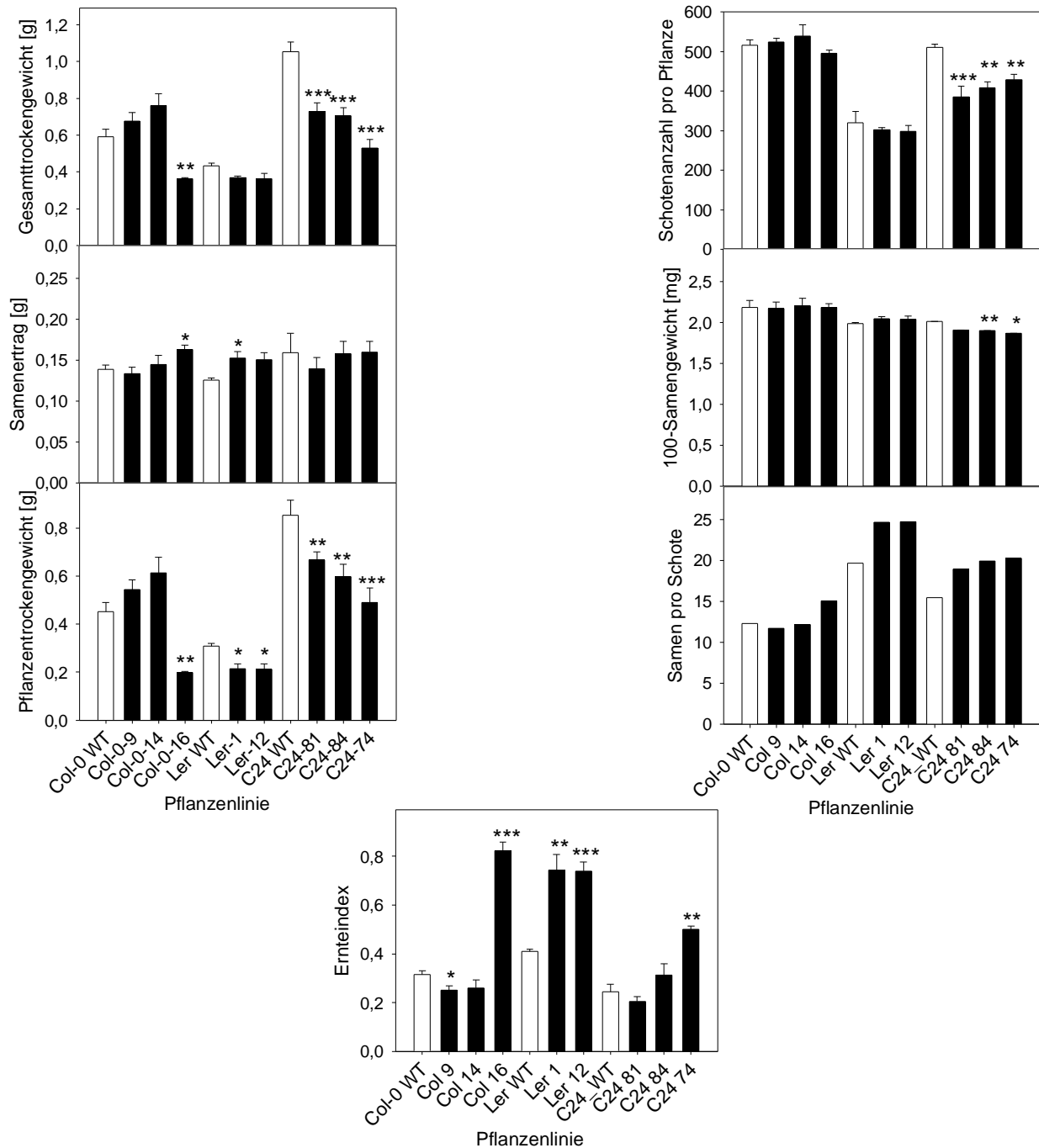


Abbildung 3-7: Analyse der Ressourcenverteilung zum Erntezeitpunkt von MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien der Ökotypen Columbia (Col-0), *Landsberg erecta* (Ler) und C24

Die Untersuchungen wurden mit jeweils 5-10 Pflanzen pro Linie durchgeführt. Das Auszählen der Schotenanzahl erfolgte an Pflanzen, deren Blüten in den Samenstand übergegangen waren. Zum Zeitpunkt der Ernte waren die Pflanzen vollständig seneszent. Es sind Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die Verschiedenheit zur jeweiligen WT-Kontrolle wurde mittels Student's t-Test bestimmt. Signifikante Unterschiede sind als * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ gekennzeichnet.

die Auswirkungen auf die Verteilung der reproduktiven Biomasse und den Ernteindex untersucht. Der Ernteindex ist definiert als das Verhältnis von Samen- zu Pflanzengewicht. Damit ist er ein wichtiger Indikator für die Ressourcenverteilung in erntefähigen Organen und ein entscheidender landwirtschaftlicher Parameter für die Ertragsfähigkeit einer Sorte. Zur Vergleichbarkeit der Daten wurden die zu untersuchenden Pflanzen identisch zu den Linien für die Bestimmung des Samenertrages angezogen.

Die in Abb. 3-7 dargestellte Produktion an Gesamttrockengewicht veranschaulicht, dass Col-0-16, *Ler-1* und *Ler-12* ca. 44%, 69% und 70% der jeweiligen WT-Biomasse akkumulierten. Dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass die Induktion des generativen Entwicklungsstadiums die dramatische Hemmung in der Bildung von vegetativer Biomasse dieser transgenen Linien teilweise kompensiert. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen manifestierte sich das verbesserte reproduktive Wachstum in allen drei Linien ebenfalls in einer erhöhten Samenproduktion. Dies resultierte in einer wesentlichen und statistisch signifikanten Erhöhung des Ernteindex um das 2,8-fache bei Col-0-16 und um das 1,8-fache für die beiden *Ler*-Linien 1 und 12 im Vergleich zur Ökotyp-spezifischen WT-Kontrolle.

Für die Verifizierung des erhöhten Samenertrages infolge hoher MP17:GFP-Proteinexpression wurde das 100-Samengewicht von je 5 Pflanzen pro Linie bestimmt und für alle Linien wurde kein größerer Unterschied zur WT-Referenz gefunden. Das wies auf einen Anstieg der Samenanzahl in den stark exprimierenden Linien Col-0-16, *Ler-1* und *Ler-12* hin. Das Auszählen der Schoten pro Pflanze ließ eine kontinuierliche Abnahme in den transgenen Linien im Verhältnis zum jeweiligen WT erkennen. Der Mittelwert der Schoten pro Pflanze betrug 498 in Col-0-16 vs. 516 im Col-0 WT, 302 in *Ler-1* und 298 in *Ler-12* vs. 320 im *Ler* WT. Folglich zeichnete sich der Trend ab, dass die durchschnittliche Anzahl von Samen pro Schote von etwa 12 in der Col-0 WT-Kontrolle auf 15 in Col-0-16 und von 20 in der *Ler* WT-Referenz auf 25 in den beiden Linien *Ler-1* und *Ler-12* anstieg. Diese Werte wurden rechnerisch aus den Mittelwerten von Schotenzahl, Samenertrag und 100-Samengewicht ermittelt.

Für die niedriger exprimierenden Linien Col-0-9 und Col-0-14 zeichnete sich ab, dass das Pflanzentrockengewicht leicht aber nicht statistisch signifikant erhöht war, während der Samenertrag keinen Unterschied im Vergleich zur WT-Kontrolle zeigte. Das führte zu einer schwachen Reduktion im Ernteindex, die sich in der statistischen Analyse für Col-0-9 als signifikant erwies, in der bereits die vegetative und generative

Blattbiomasse erhöht war. Da das 100-Samengewicht dieser beiden Col-0-Linien gegenüber der Kontrolle unverändert und parallel dazu ein minimaler Anstieg in der Schotenzahl nachweisbar war, resultierte daraus rechnerisch eine tendenziell geringere Samenanzahl pro Schote.

In den MP17:GFP-transgenen C24-Linien mit geringerem Expressionsniveau als in Col-0-16 zeigte sich ein etwas anderes Bild. Sie wiesen generell ein deutlich geringeres Trockengewicht als ihre Ökotyp-spezifische WT-Referenz auf. Dabei war dennoch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den beiden anderen Ökotypen die Tendenz erkennbar, dass das Trockengewicht mit zunehmender Expressionsstärke abnahm und gleichzeitig der Samenertrag umgekehrt proportional dazu minimal anstieg. Er unterschied sich jedoch nicht signifikant von der WT-Kontrolle. Aus deutlich geringerer Schotenanzahl und 100-Samengewicht ließ sich somit ein Anstieg in der Samenanzahl pro Schote errechnen.

3.1.4 Resistenzeigenschaften gegenüber der Infektion mit TuMV

Die Veränderungen der transgenen *Arabidopsis*-Linien in der Akkumulation von Biomasse, die sich während des gesamten Generationszyklus bis hin zur reproduktiven Leistung beobachten lassen, sowie in der Photoassimilatverteilung legen einen Eingriff von MP17:GFP in den Kohlenhydratmetabolismus bzw. Assimilattransport nahe. Zudem wurde in MP17-exprimierenden Tabaklinien eine eingeschränkte Resistenz gegenüber dem nicht-verwandten *Potato virus Y* (PVY)-Potyvirus nachgewiesen (Herbers *et al.*, 1997), wobei die erhöhten Resistenzeigenschaften von der MP17-Dosis abhängig waren und nur in transgenen Pflanzen auftraten, die sich durch Kohlenhydratakkumulation und Wachstumsretardierung auszeichneten (Hofius *et al.*, 2001).

Aus diesem Grund sollte im Rahmen der Charakterisierung quantitativ bestimmt werden, ob sich auch in den MP17:GFP-transgenen *Arabidopsis*-Linien Veränderungen in der Virusanfälligkeit zeigen. Für das Virusinfektionsexperiment wurden aufgrund der Ökotyp-unabhängigen Effekte der MP17:GFP-Expression lediglich die Linien im Col-0- und *Ler*-Hintergrund ausgewählt.

Die Infektion erfolgte mit dem RNA-Virus *Turnip mosaic virus* (TuMV), da es Hinweise gab, dass dieser Potyvirus *Brassicaceae* wie *Arabidopsis* befällt (Kaneko *et al.*, 2004).

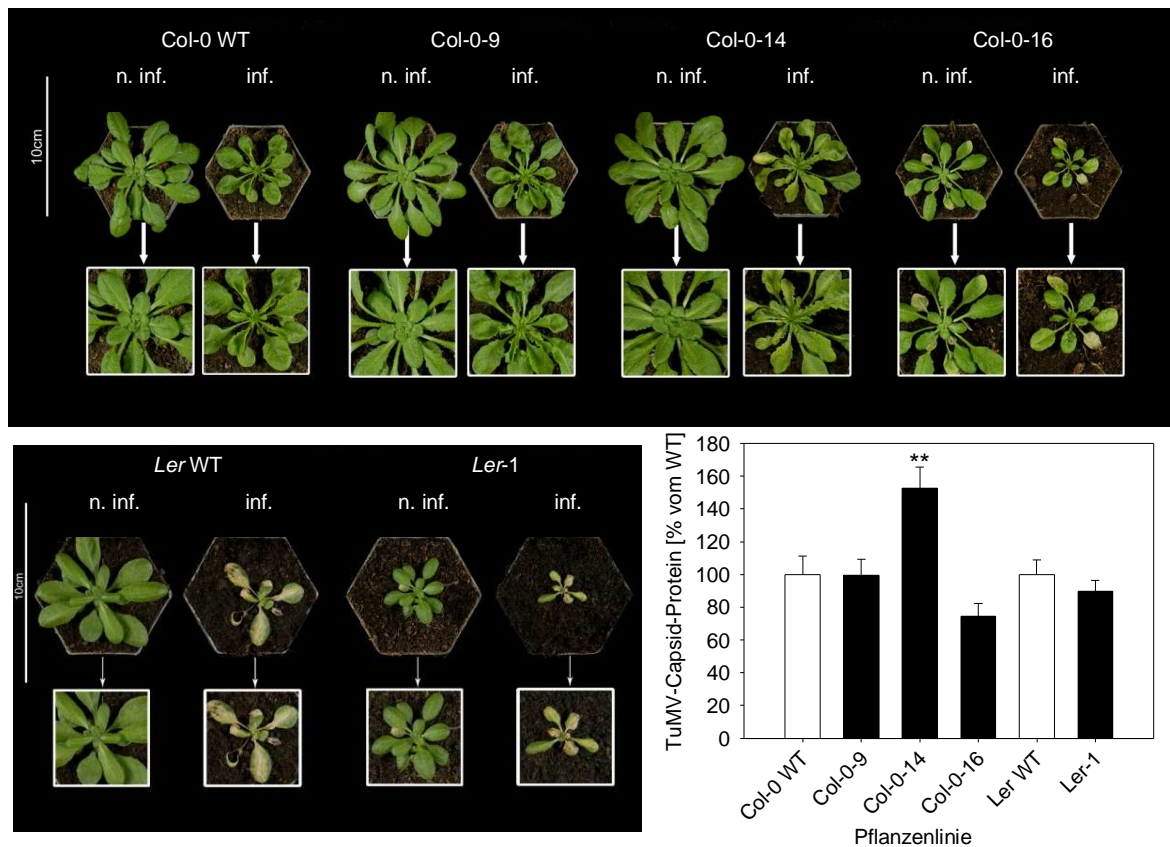


Abbildung 3-8: TuMV-Infektion von MP17:GFP-transgenen *Arabidopsis*-Linien

Die Aufnahmen dokumentieren die Symptome TuMV-infizierter *Arabidopsis*-Pflanzen der Ökotypen Columbia (Col-0) und *Landsberg erecta* (*Ler*) in Gegenüberstellung zu nicht infizierten Pflanzen und den entsprechenden WT-Kontrollen. Im Diagramm ist die Quantifizierung der TuMV-Capsid-Proteingehalte 18 Tage nach Infektion in systemischen Blättern mittels ELISA-Virustiterbestimmung dargestellt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte von 20 Pflanzen \pm Standardfehler und sind in Prozent des WT-Gehaltes angegeben. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der TuMV-Infektion drei Wochen alt und hatten 8-12 Blätter ausgebildet. Der Größenmaßstab gibt 10 cm an. n. inf.: nicht infiziert, inf.: infiziert.

Der TuMV-Virusextrakt wurde auf drei untere *source*-Blätter pro Pflanze aufgetragen (n=20 Pflanzen pro Linie). Zum Zeitpunkt der Infektion waren die Pflanzen drei Wochen alt und hatten 8 bis 12 Blätter ausgebildet. Zwei Wochen nach Infektion traten erste Infektionssymptome auf (s. Abb. 3-8). Erste Anzeichen einer Infektion sind vorzeitige Gelbfärbung und der Verlust älterer Blätter. Jüngere Blätter, die nach der Infektion gebildet werden, sind verkümmert und eingerollt.

Die ELISA-Bestimmung der Virustiter 18 Tage nach Infektion ergab in den systemischen Blättern von Col-0-14, welche einen MP17:GFP-Proteingehalt von 78% im Vergleich zur Referenzlinie Col-0-16 aufwies, eine signifikante Erhöhung des TuMV-Levels um 52% gegenüber der WT-Kontrolle. Dabei fiel auf, dass nur in Col-0-

14 der Gehalt an löslichen Zuckern leicht erhöht war, während die Stärke unverändert blieb. Ein geringerer MP17:GFP-Expressionslevel in Linie Col-0-9 hatte keinen Einfluss auf die TuMV-Ausbreitung. Dagegen führte ein sehr hohes MP17:GFP-Expressionsniveau in den Linien Col-0-16 und *Ler-1*, welche drastische Mengen an Kohlenhydraten akkumulierten und eine drastische Wachstumsretardierung zeigten, zu einer deutlichen, aber nicht signifikanten Reduktion des TuMV-Capsid-Proteins um 25% bzw. 11%.

3.1.5 Korrelationsanalyse der MP17:GFP-induzierten Veränderungen

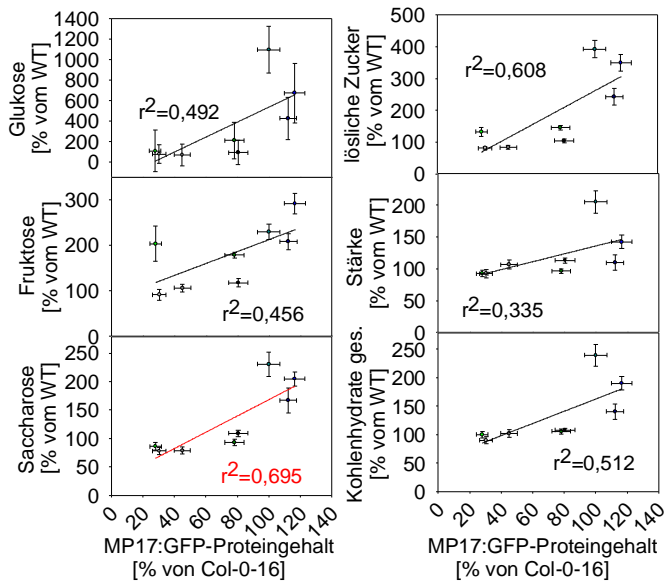
Zur Verifizierung des direkten Verhältnisses von MP17:GFP-Proteingehalt, veränderter Kohlenhydratverteilung, Virustransport, Biomasse, Samenproduktion, Ernteindex und Blühinduktion wurden die relativen Werte der transgenen Col-0-, *Ler*- und C24-Linien (angegeben als Prozente der Ökotyp-spezifischen WT-Kontrolle) gegeneinander aufgetragen.

Die in Abb. 3-9 dargestellte lineare Regressionsanalyse offenbarte, dass keine Korrelation zwischen MP17:GFP-Expressionsniveau und TuMV-Virusausbreitung ($r^2=0,063$) besteht. Das lässt darauf schließen, dass der Virustransport in diesen Pflanzen einer Optimumskurve der MP17:GFP-Expressionsstärke zu folgen scheint. Dagegen zeigte sich eine hoch signifikante negative Korrelation zwischen MP17:GFP-Proteingehalt und Blattfrischgewichtproduktion sowohl unter vegetativen Kurztagbedingungen ($r^2=0,889$) als auch in der generativen Wachstumsphase ($r^2=0,864$), während der Samenertrag positiv mit dem Proteinlevel korrelierte ($r^2=0,678$). Es fällt dabei auf, dass die negative Korrelation der MP17:GFP-Expressionsstärke mit der Biomasseverteilung im Falle des generativen Pflanzentrockengewichtes deutlich auf $r^2=0,167$ abnahm.

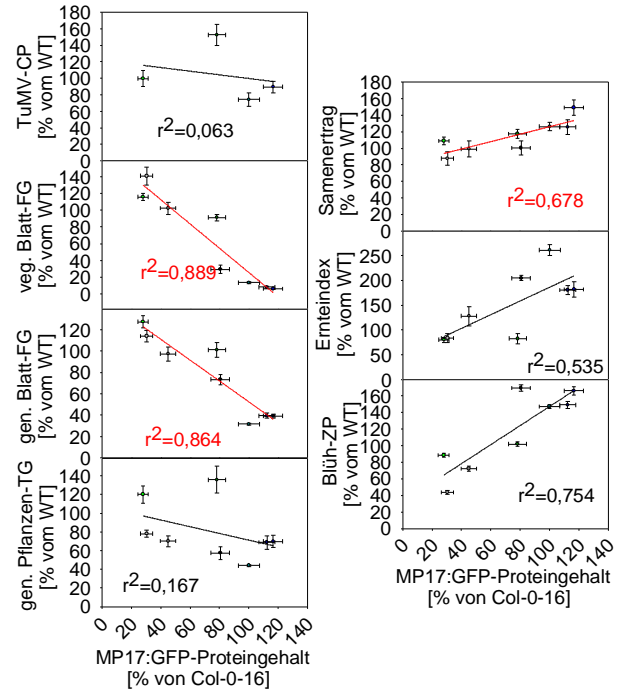
Bemerkenswerter Weise zeigte sich, dass die Saccharosegehalte in gleicher Art und Weise mit dem vegetativen und generativen Blattfrischgewicht sowie dem Samenertrag korrelierten wie der MP17:GFP-Proteingehalt. Die negative Korrelation mit vegetativem und generativem Blattfrischgewicht betrug 0,728 bzw. 0,852. Für die positive Korrelation mit dem Samenertrag ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r^2=0,669$. In diesem Zusammenhang ließ sich eine positive Korrelation von MP17:GFP-Proteinexpressionsniveau und Saccharosegehalt ($r^2=0,695$) nachweisen. Weiterhin konnte auch für die Auftragung der Fruktosegehalte gegen den

Samenertrag eine positive Korrelation ($r^2=0,916$) festgestellt werden.

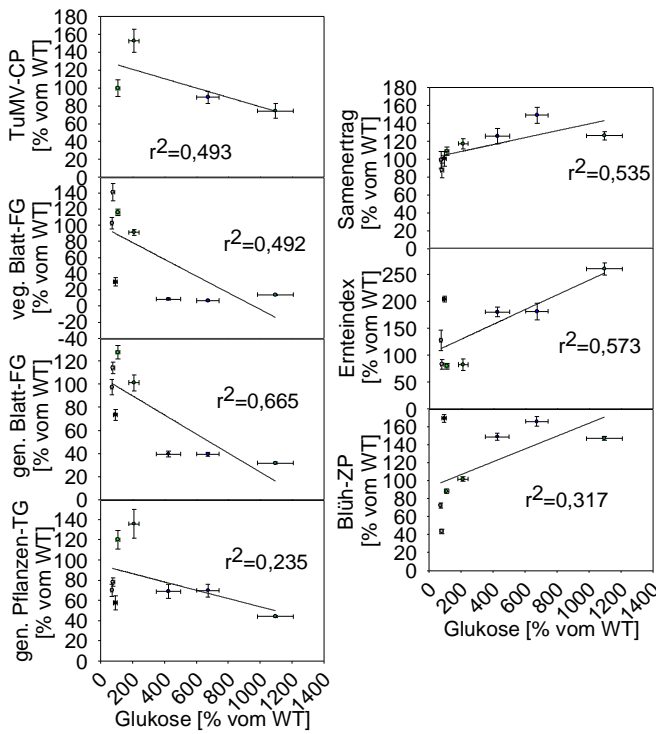
(A)



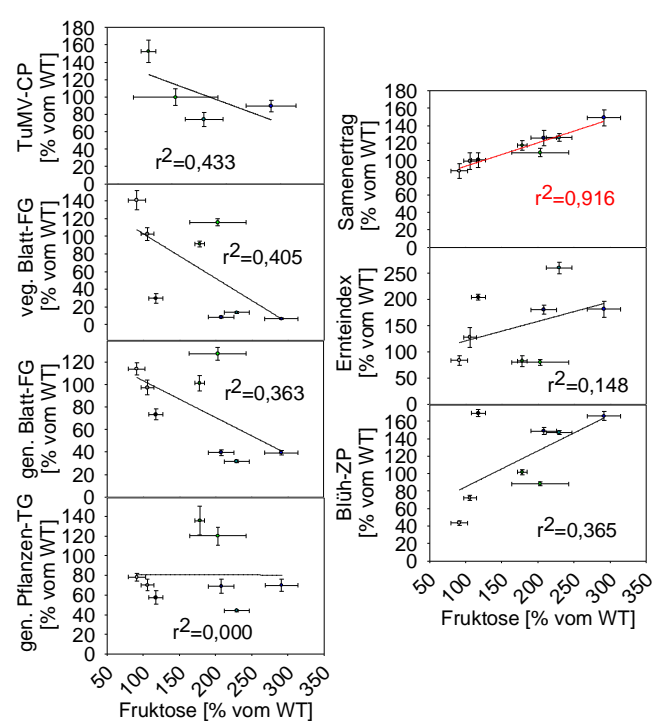
(B)



(C)



(D)



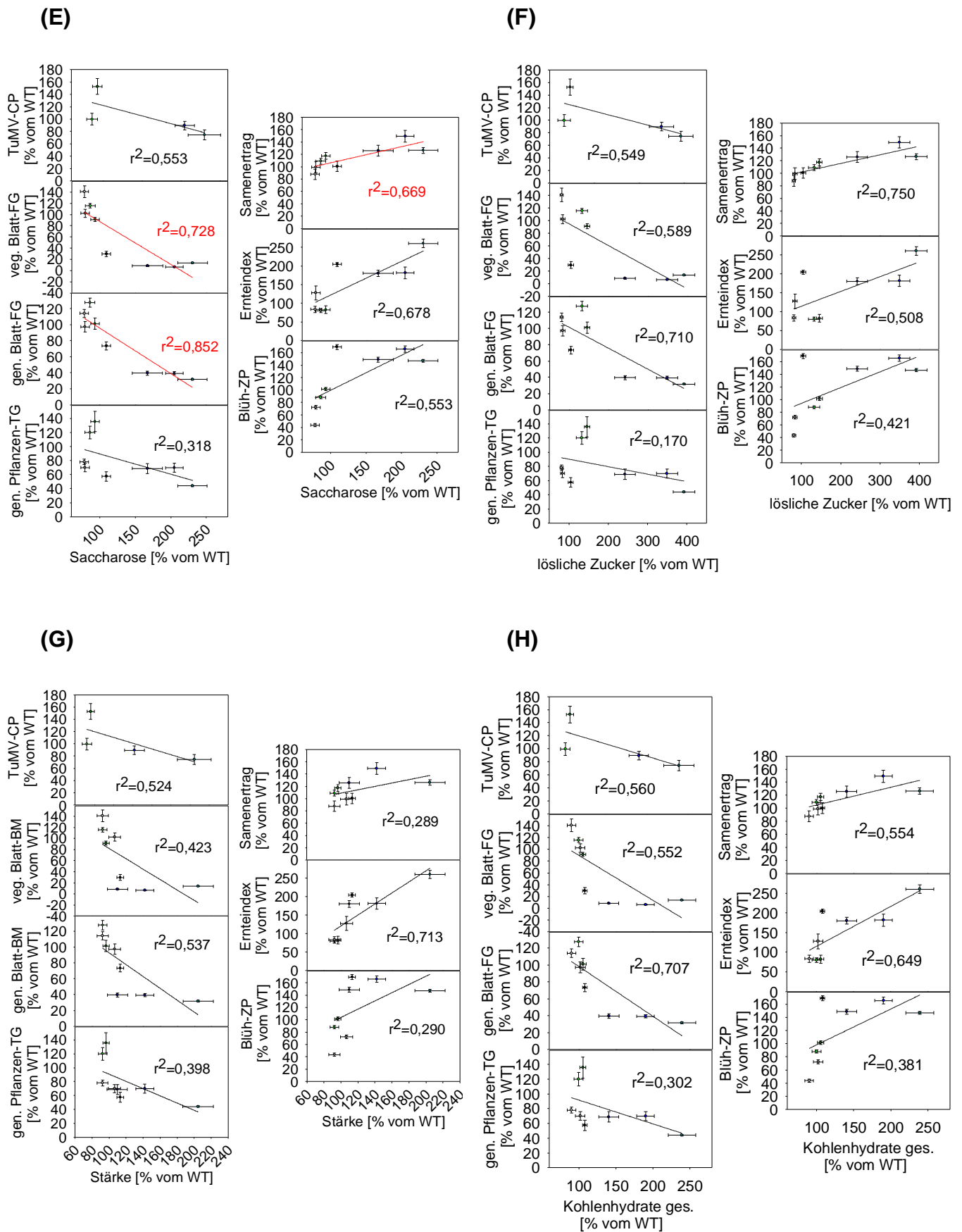


Abbildung 3-9: Korrelationsanalyse der Veränderungen in MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen der Ökotypen Columbia, *Landsberg erecta* und C24 im Vergleich zur entsprechenden WT-Referenz

Es wurden aufgetragen: **(A)** MP17:GFP-Proteingehalte vs. Kohlenhydrate, **(B)** MP17:GFP-Proteingehalte vs. TuMV-Virusausbreitung und Biomasse, **(C)** Glukosegehalte vs. TuMV-Virusausbreitung und Biomasse, **(D)** Fruktosegehalte vs. TuMV-Virusausbreitung und Biomasse, **(E)** Saccharosegehalte vs. TuMV-Virusausbreitung und Biomasse, **(F)** Gehalte löslicher Zucker vs. TuMV-Virusausbreitung und Biomasse, **(G)** Stärkegehalte vs. TuMV-Virusausbreitung und Biomasse, **(H)** Gesamtkohlenhydratgehalte vs. TuMV-Virusausbreitung und Biomasse. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler und sind in Prozent bezogen auf die Ökotyp-spezifische WT-Kontrolle dargestellt. Unter Verwendung der SigmaPlot 7.1-Software wurde die Korrelation ermittelt und der Korrelationskoeffizient ist mit r^2 angegeben. Miteinander signifikant korrelierende Faktoren wurden rot hervorgehoben. gen.: generativ, veg.: vegetativ, ges.: gesamt, CP: Capsid-Protein, FG: Frischgewicht, TG: Trockengewicht, ZP: Zeitpunkt.

3.1.6 Wachstumsspezifische Änderungen der Saccharoseexportraten

Wie die Bestimmung von Kohlenhydratgehalten und Biomasseverteilung zeigten, vermittelte die konstitutive MP17:GFP-Expression in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen phänotypische Änderungen. Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen dem Dosis-abhängigen und gegensätzlichen Einfluss von MP17 auf Blattbiomasse- und Samenproduktion mit der Assimilatbereitstellung zu untersuchen, wurde die Saccharosetransportkapazität der *source*-Blätter ermittelt. Dies erfolgte im Vergleich zur Ökotyp-spezifischen WT-Kontrolle mit jeweils 10 Proben pro Linie während vegetativer und reproduktiver Wachstumsphase. Dazu wurden die Pflanzen unter identischen Bedingungen angezogen wie bei Analysen zu vegetativem und generativem Wachstum. Im vegetativen (6 Wochen Kurztag), generativen (6 Wochen Kurztag und etwa zwei Wochen Langtag) und beginnenden seneszenten Blattentwicklungsstadium (6 Wochen Kurztag und etwa drei Wochen Langtag). Die Abgabe löslicher Kohlenhydrate von an der Petiole abgetrennten *source*-Blättern wurde über einen Zeitraum von 6 Stunden gemessen.

Wie in Abb. 3-10 dargestellt, waren in Übereinstimmung mit der erhöhten Produktion von vegetativer Blattbiomasse in den *Arabidopsis*-Linien Col-0-9 und C24-81 mit niedrigem MP17:GFP-Expressionsniveau etwa 20% höhere Saccharoseexportraten zu verzeichnen als im Vergleich zum jeweiligen WT. Im Gegensatz dazu zeigten die im Wachstum gehemmten Linien *Ler-1*, *Ler-12*, Col-0-16 und C24-74 nach 6 Stunden Exudation deutlich geringere Saccharosekonzentrationen im Phloemexudat. Sie erreichten lediglich 29%-48% der entsprechenden WT-Kontrolle.

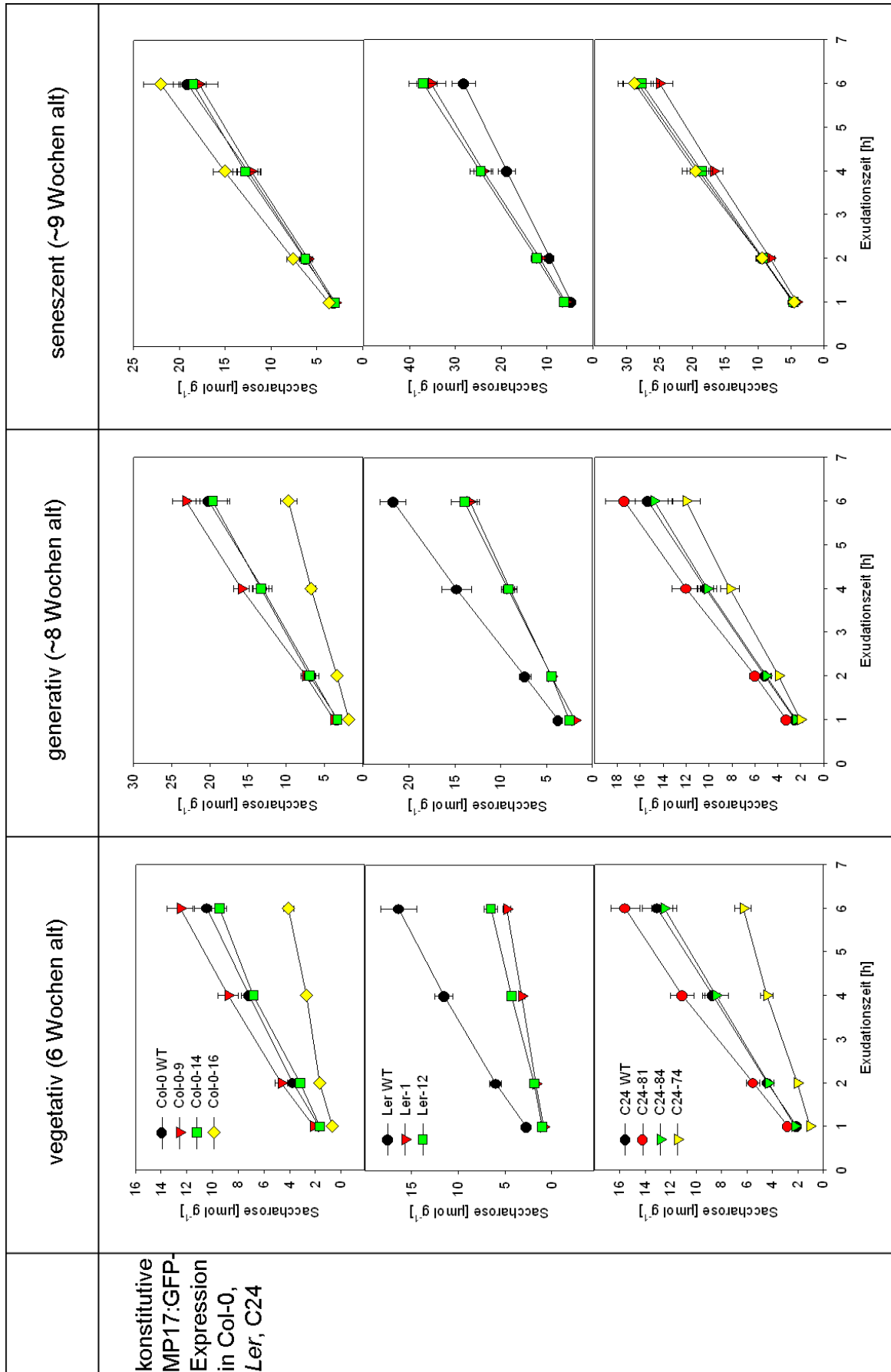


Abbildung 3-10: Saccharoseefflux von *source*-Blättern MP17:GFP-exprimierender *Arabidopsis*-Linien der Ökotypen Columbia (Col-0), *Landsberg erecta* (*Ler*) und C24 Vergleich zur jeweiligen WT-Kontrolle

Die Phloemexudate wurden von jeweils 10 ausgewachsenen Blättern pro Linie im vegetativen (6 Wochen Kurztag), generativen (6 Wochen Kurztag und etwa zwei Wochen Langtag) und beginnenden seneszenten Blattentwicklungsstadium (6 Wochen Kurztag und etwa drei Wochen Langtag) gesammelt. Die Saccharosegehalte wurden nach 1, 2, 4 und 6 h Exudationszeit ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

Nachdem die Pflanzen anschließend unter Langtagbedingungen transferiert und für zwei Wochen kultiviert wurden war ein leichter Anstieg der Saccharosekonzentration im Phloemexudat der phänotypischen Linien auf 48%-78% zu beobachten (Abb. 3-10, generativ). Dieser Anstieg führte nach einer weiteren Woche unter blühinduzierenden Bedingungen sogar zu einer Erhöhung des Saccharosegehaltes von Col-0-16, *Ler*-1 und *Ler*-12 um 15%, 25% bzw. 31% gegenüber den Ökotypspezifischen Kontrollen (s. Abb. 3-10, senszent). Während dessen traten keine wesentlichen Unterschiede der schwächer MP17:GFP-exprimierenden Linien Col-0-9, Col-0-14, C24-81, C24-84 und C24-74 im Vergleich zur entsprechenden WT-Kontrolle auf.

3.2 Einfluss der Größe des Movement Proteins auf die Phänotyp-Ausbildung

Die konstitutive Expression von MP17:GFP führte in *Arabidopsis*-Pflanzen der Ökotypen Col-0, *Ler* und C24 zu auffälligen Veränderungen in Biomasse- und Kohlenhydratverteilung (vergl. Abschn. 3.1). Weil eine direkte Abhängigkeit dieser Merkmalsausprägungen vom MP17:GFP-Proteingehalt nachgewiesen wurde, sollte untersucht werden, ob eine mögliche Ursache für diesen Effekt in der Größe des exprimierten Proteins und/oder der Fusion mit GFP besteht. Grundlage hierfür stellten Beobachtungen dar, dass Mitochondrien, welche membrangebundenes Hxk::GFP oder HxkN::GFP überexprimierten, zur Ausbildung von Konglomeraten neigten (Giese, 2005). Dabei schien aktives GFP alleiniger Verursacher des Phänomens zu sein.

Aus diesem Grund wurden von Dr. D. Hofius bereitgestellte *Arabidopsis*-Pflanzen des C24-Ökotyps, welche mit dem Plasmid pET15 (Herbers *et al.*, 1997) transformiert wurden, für diese Analysen ausgewählt. Bereits in transgenen

Tabakpflanzen führte die pET15-vermittelte hohe Expression des N-terminal um 24 Aminosäuren verlängerten MP17-Proteins zu den beschriebenen phänotypischen Änderungen (Herbers *et al.*, 1997; Hofius, 2003). Auch die transgenen C24-Linien waren von den MP17-induzierten Effekten betroffen (Hofius, 2003). Die Linien C24-35S-MP17-12, -14 und -16, welche im Folgenden als C24-12, -14, und -16 bezeichnet werden, wurden im Vergleich zur Referenzlinie Col-0-16 in Bezug auf MP17-Proteingehalt, Verteilung der Biomasse in verschiedenen Entwicklungsstadien und Assimilatverfügbarkeit verifiziert.

3.2.1 Expressionsanalyse in MP17-transgenen *Arabidopsis* C24

In Abb. 3-11 ist die Expressionsanalyse der MP17-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien des C24-Ökotyps dargestellt, wobei die homozygoten C24-Pflanzen der T6-

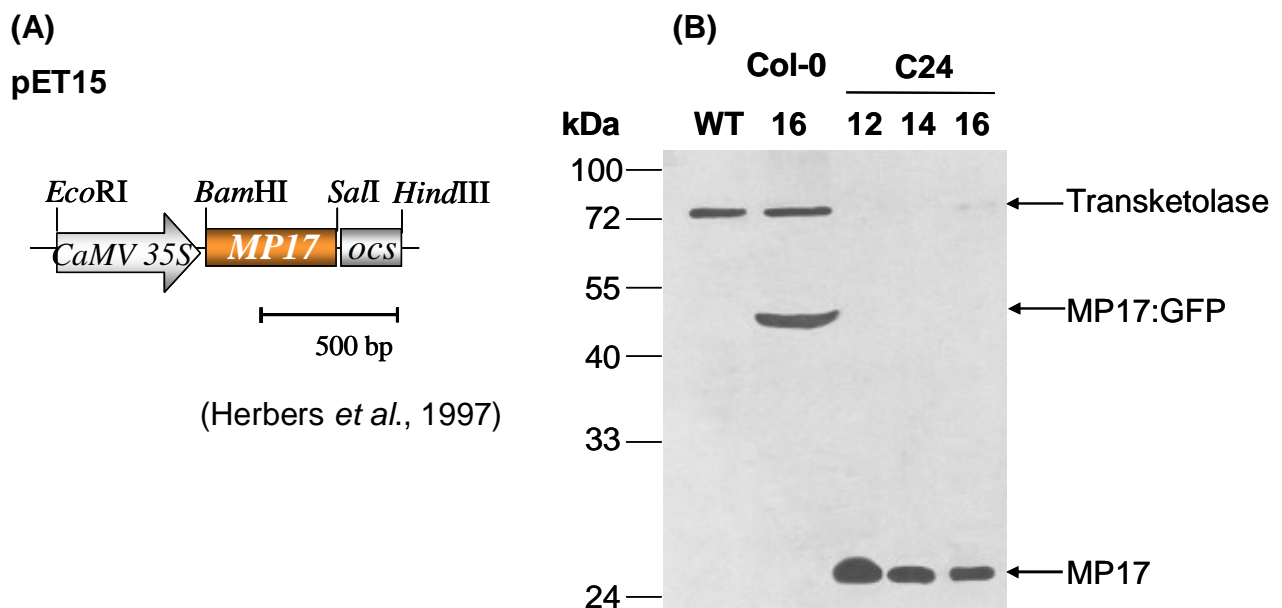


Abbildung 3-11: Expressionsanalyse von MP17 in transgenen C24-Linien im Vergleich zur MP17:GFP-exprimierenden Referenzlinie 16 im Columbia-Hintergrund (Col-0)

(A) Schematische Darstellung der binären Expressionskassette pET15, die zur Transformation von *Arabidopsis* C24 eingesetzt wurde. Die Konstruktion des N-terminal um 24 Aminosäuren verlängerten PLRV-MP17 wurde, wie bei Tacke *et al.*, 1996 beschrieben, durchgeführt.

(B) Western-Analyse der MP17-Proteinakkumulation in transgenen C24-Linien im Vergleich zur WT-Kontrolle und der Referenzlinie Col-0-16. Auf die Spuren der Kontrollen wurden 30 μ l und die Spuren der transgenen C24-Linien wurden 3 μ l Gesamtprotein aufgetragen. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines polyklonalen anti-MP17-Antiserums (1:5000 Verdünnung) sowie eines sekundären HRP-konjugierten IgG-Antikörpers (1:100000).

Generation bis zur Probennahme 6 Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden. Das MP17:GFP-spezifische Proteinsignal der Kontrolllinie Col-0-16 war in einer Höhe von 45 kDa nachweisbar, während im C24-Hintergrund das MP17 ohne Fusionspartner in einer Höhe von etwa 25 kDa migrierte (s. Abb. 3-11 B).

Das war in Übereinstimmung mit MP17-transgenen Kartoffel- (Schmitz *et al.*, 1997) und Tabakpflanzen (Herbers *et al.*, 1997) und wurde auf mögliche post-transkriptionale Modifizierungen, wie z. B. Phosphorylierung des 17kDa-großen MP17 zurückgeführt. Dabei waren in den C24-Linien, von denen 90% weniger Gesamtproteinextrakt aufgetragen wurde als in den Kontrollen, mindestens ebenso starke MP17-spezifische Proteinsignale detektierbar wie in der Col-0-16-Referenz. Somit war das MP17-Expressionsniveau im C24-Ökotyp um ein Vielfaches höher als in der Col-0-16-Kontrolle. Die hohe MP17-Expressionsstärke verhinderte eine Quantifizierung der Proteingehalte. Dennoch war erkennbar, dass C24-12 das höchste und C24-16 das niedrigste MP17-Expressionsniveau innerhalb des C24-Ökotyps aufwies.

3.2.2 Phänotyp und Kohlenhydratstatus

Die Transformation mit dem pET15-Konstrukt vermittelte ein hohes MP17-Expressionsniveau in transgenen *Arabidopsis*- und Tabakpflanzen, was sich als Voraussetzung für die Entwicklung des pleiotropen Phänotyps erwies (Herbers *et al.*, 1997; Hofius, 2003). Um zu verifizieren, inwieweit diese phänotypischen Änderungen an den MP17-Proteingehalt gebunden sind, wurden pro ausgewählter transgener C24-Linie 35 Pflanzen unter Kurztagbedingungen angezogen und je 5-10 davon in Bezug auf Kohlenhydratstatus und vegetative Blattbiomasse analysiert.

Diese Untersuchungen wurden parallel zur MP17:GFP-exprimierenden Linie Col-0-16 und den Ökotyp-spezifischen WT-Kontrollen durchgeführt.

Repräsentative, 5 Wochen alte Vertreter der homozygoten Linien im C24-Ökotyp, die sich analog den MP17:GFP-transgenen Linien ebenfalls durch Veränderungen in der Verteilung der oberirdischen Biomasse auszeichneten, sind in Abb. 3-12 dokumentiert. Die Linie C24-12 mit dem höchsten MP17-Expressionsniveau zeigte in Übereinstimmung mit der Kontrolllinie Col-0-16 gleichfalls eine deutliche Reduktion im Wachstum und ein auffälliges Ausbleichen der Interkostalregionen in den unteren

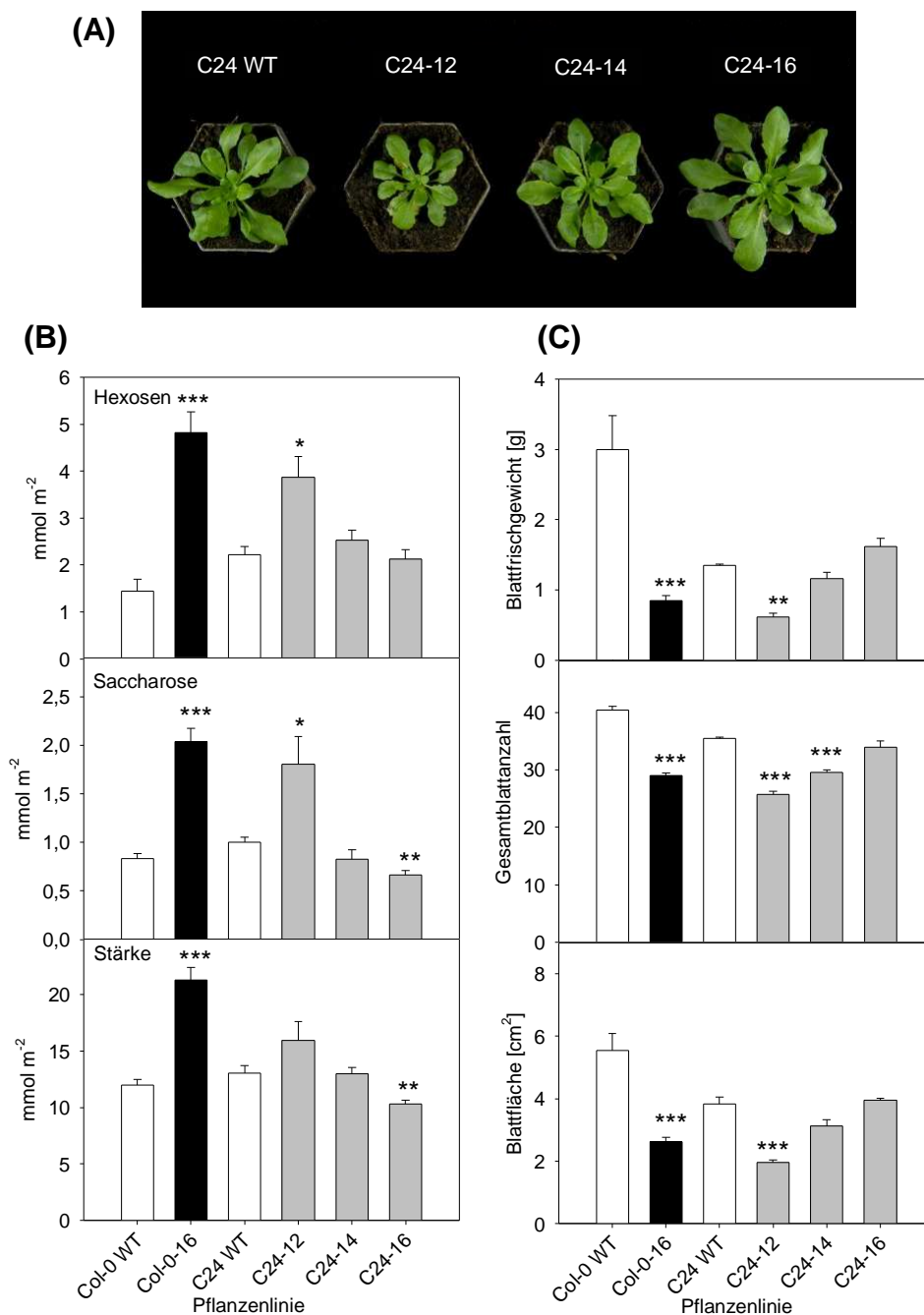


Abbildung 3-12: Phänotyp und Kohlenhydratgehalte MP17-transgener *Arabidopsis*-Pflanzen des Ökotyps C24 im Vergleich zur MP17:GFP-exprimierenden Referenzlinie 16 im Columbia-Hintergrund (Col-0) und entsprechenden WT-Kontrollen

Unter (A) ist die Dokumentation nach 5 Wochen unter Kurztagbedingungen abgebildet. (B) zeigt die Kohlenhydratgehalte 5 Wochen alter Pflanzen. 8 Stunden nach Beginn der Lichtphase wurden Proben von jeweils zwei vollständig entwickelten *source*-Blättern pro Pflanze genommen. Es wurden lösliche Zucker und Stärke bestimmt. Die Daten wurden von jeweils 5-10 Pflanzen erhalten, wobei die beiden Werte von jeder Pflanze gemittelt wurden. (C) fasst die Verteilung der vegetativen Blattbiomasse von je 5-10 Pflanzen zusammen, die 6 Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden. Die Blattfläche wurde über zwei *source*-Blätter pro Pflanze gemittelt. In der Abbildung sind die Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Signifikante Unterschiede von der jeweiligen WT-Kontrolle (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$) wurden unter Verwendung des Student's t-Test bestimmt.

source-Blättern. Auch in den MP17-exprimierenden Linien deutete sich an, dass ein geringeres Expressionsniveau, wie in C24-16, mit einer leichten Zunahme der Blattbiomasse verbunden zu sein scheint, während C24-14 mit einem mittleren MP17-Proteingehalt unverändert aussah.

Die Analyse der Blattbiomasse während der nicht induktiven, vegetativen Wachstumsphase von 6 Wochen alten Pflanzen belegte (s. Abb. 3-12 C), dass C24-12 nur 46% vom WT-Niveau an Blattfrischgewicht produzierte. Damit war die oberirdische Biomasse aufgrund einer deutlich geringeren Blattzahl bei gleichzeitig wesentlich kleineren Blättern statistisch signifikant reduziert. Weil die Blattzahl auf 72% reduziert war und die Blattflächen 50% vom WT ausmachten, müssen die einzelnen Blätter signifikant leichter gewesen sein. Damit verhielt sich C24-12 analog zu der phänotypischen Referenzlinie Col-0-16 mit hohem MP17:GFP-Proteingehalt. In der Linie C24-14 mit mittlerem Expressionsniveau war das Blattfrischgewicht um 14% gegenüber der WT-Kontrolle reduziert und konnte auf weniger, kleinere und leichtere Blätter zurückgeführt werden. Aufgrund dessen kann sie mit der MP17:GFP-transgenen Linie Col-0-14 verglichen werden. Demgegenüber war das Blattfrischgewicht von C24-16 infolge tendenziell größerer und schwerer Blätter sogar leicht, aber nicht statistisch signifikant, um 20% gegenüber der WT-Kontrolle erhöht. Somit ist C24-16, die Linie mit der geringsten MP17-Expressionsstärke, ähnlich den schwach exprimierenden Linien Col-0-9 und C24-81.

Die Kohlenhydratgehalte in ausgewachsenen *source*-Blättern der transgenen C24-Linien nach 5 Wochen unter Kurztagbedingungen (s. Abb. 3-12 B) zeigten parallel zu der Ausprägung des MP17-vermittelten Phänotyps eine deutliche Akkumulation von löslichen Zuckern und Stärke in der Linie C24-12. In der weniger stark MP17-exprimierenden und nur leicht im Wachstum reduzierten Linie C24-14 konnte ebenfalls eine generelle Erhöhung an Hexosen und Stärke nachgewiesen werden, die im Vergleich zum WT jedoch nicht signifikant war. Hingegen war die erhöhte Biomasseproduktion von C24-16, entsprechend den Daten in Col-0-9 und C24-81, von einer leichten Reduktion der Saccharose- und Stärkegehalte begleitet.

3.2.3 Verteilung der generativen Biomasse

Um zu untersuchen, ob sich diese Veränderungen der MP17-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen des Ökotyps C24 auch im generativen Wachstum fortsetzen,

wurden die verbleibenden Pflanzen im Anschluss an die Analysen der vegetativen Blattbiomasse unter Langtagbedingungen transferiert.

3.2.3.1 Untersuchung von generativer Blattbiomasse und Blühinduktionszeitpunkt

Die Analyse der generativen Blattbiomasse (s. Abb. 3-13) von 5-10 Pflanzen pro Linie zwei Wochen nach Transfer der Pflanzen in Langtagbedingungen offenbarte, dass sich zu Beginn der Sprossbildung die Gesamtblattzahl der transgenen Linien dem WT-Niveau annäherte, wie bereits in den MP17:GFP-transgenen Col-0-, *Ler*- und C24-Linien beobachtet. Lediglich in der besonders stark MP17-exprimierenden C24-12 blieb die Anzahl der Blätter gegenüber der WT-Kontrolle deutlich erniedrigt.

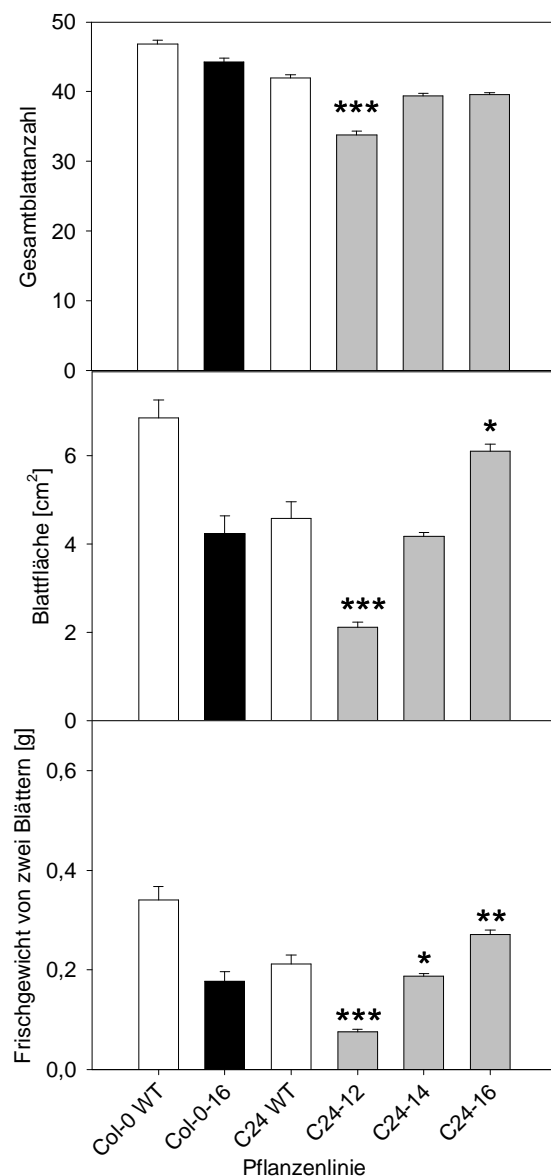


Abbildung 3-13: Analyse der generativen Blattbiomasse von MP17-transgenen Arabidopsis-Pflanzen des C24-Hintergrunds

Im Vergleich zur MP17:GFP-exprimierenden Kontrolllinie 16 im Columbia-Ökotyp (Col-0) wurden die Pflanzen 6 Wochen unter Kurztag und anschließend zwei Wochen unter Langtag kultiviert. Zu Beginn der Sprossbildung wurde die Gesamtblattanzahl pro Pflanze ausgezählt, die Blattfläche unter Verwendung eines Portable Area Meter über zwei repräsentative *source*-Blätter gemittelt und das Blattfrischgewicht der zwei *source*-Blätter bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von 5-10 Pflanzen je Linie. Unter Verwendung des Student's t-Test wurde die Verschiedenheit zur jeweiligen WT-Kontrolle bestimmt. Signifikante Unterschiede sind als * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ dargestellt.

Die spezifischen Unterschiede der transgenen Linien in Bezug auf Fläche und Gewicht von zwei repräsentativen *source*-Blättern pro Pflanze blieben, ähnlich den MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen, während der generativen Wachstumsphase ebenfalls weitestgehend bestehen. Die *source*-Blattfläche der schwächer exprimierenden C24-16-Linie war gegenüber der WT-Kontrolle signifikant um 33% erhöht. Parallel dazu war auch das Frischgewicht dieser Blätter deutlich größer als im WT. Diese Faktoren wirkten sich auf einen mindestens gleich starken Anstieg der Gesamtblattbiomasse gegenüber der WT-Kontrolle aus wie nach 6 Wochen Kurztagbedingungen.

Demgegenüber war die Blattgröße der stark exprimierenden C24-12 signifikant auf 46% im Vergleich zum WT reduziert. Das führte zu einem deutlich geringeren Gewicht der untersuchten *source*-Blätter. Weil die Gesamtblattzahl während der generativen Wachstumsphase weiterhin geringer als in der WT-Referenz war, würde sich für diese Linie eine ähnliche Reduktion im Gesamtfrischgewicht der oberirdischen Biomasse ergeben wie im vegetativen Stadium.

Zudem war ebenfalls eine tendenzielle Reduktion in Blattfläche und -frischgewicht der mittelstark exprimierenden Linie C24-14 gegenüber der WT-Kontrolle zu beobachten, die mit den Ergebnissen während der vegetativen Wachstumsphase vergleichbar war.

Das induktive, generative Wachstumsstadium ist mit der Entwicklung von Spross und Blütenstand gekennzeichnet. Wie in Abb. 3-14 dargestellt, zeigten sich auch in der Blütenentwicklung deutliche Unterschiede zwischen den transgenen Pflanzen und der WT-Kontrolle. Während der WT bereits einen ausgeprägten Blütenstand mit geöffneten Blüten und jungen Schoten aufwies, war der Spross bei den stark MP17-exprimierenden Linien C24-12 und C24-14 gerade erst hervorgetreten. Das Auszählen der Tage unter Langtag bis zum Öffnen der ersten Blüte am Hauptspross von jeweils 10 Pflanzen offenbarte ebenfalls eine signifikante Entwicklungsverzögerung der C24-Linien mit einem sehr hohen MP17-Proteingehalt um 9 bzw. 6 Tage. Demgegenüber bildete die Linie C24-16 mit dem niedrigsten MP17-Expressionsniveau den Blütenstand vorzeitiger aus und blühte einen Tag eher als die WT-Kontrolle. Das war in Übereinstimmung mit den MP17:GFP-transgenen Linien C24-81, C24-84 und Col-0-9, welche sich durch einen niedrigen bzw. mittelstarken Proteinlevel auszeichneten.

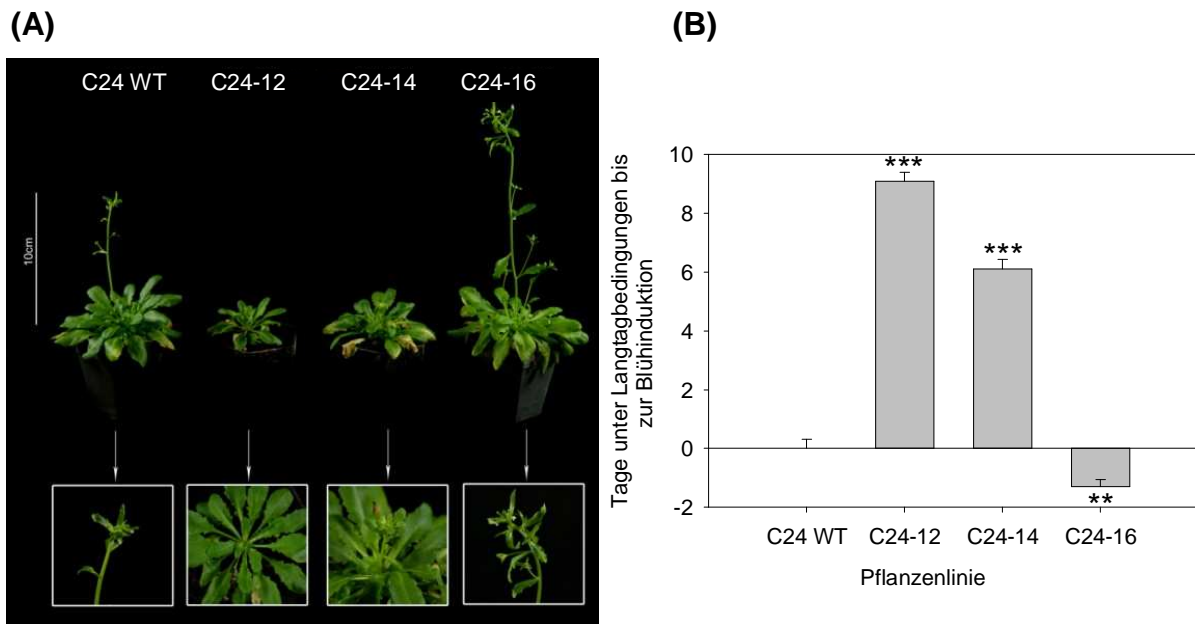


Abbildung 3-14: Blühverhalten MP17-exprimierender *Arabidopsis*-Linien C24 im Vergleich zur WT-Kontrolle

Die Pflanzen wurden 6 Wochen unter Kurztag angezogen, anschließend unter Langtagbedingungen transferiert und die Anzahl der Tage unter Langtag bis zum Öffnen der ersten Blüte ermittelt. Unter **(A)** ist die Dokumentation 10 Tage nach Transfer unter Langtag dargestellt. Der Hauptspross wurde heraus vergrößert und der Größenmaßstab gibt 10 cm an. Unter **(B)** ist die Differenz des Blühinduktionszeitpunktes im Verhältnis zum WT als Mittelwert \pm Standardfehler von 10 Pflanzen pro Linie angegeben (C24 WT = 10,1 Tage unter Langtag bis Blühinduktion). Die Verschiedenheit zur entsprechenden WT-Kontrolle wurde mittels Student's t-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede sind als ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ gekennzeichnet.

3.2.3.2 Untersuchungen zum Samenertrag und Ernteindex

In den konstitutiv MP17-exprimierenden C24-Linien deutete sich eine ähnlich Dosis-abhängige Wirkungsweise des MP17-Proteinlevels auf die Kohlenhydratverteilung, begleitet von Verschiebungen in Biomasseproduktion und Blühinduktionszeitpunkt, an wie in den MP17:GFP-transgenen *Arabidopsis*-Linien. Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt die Auswirkung auf die reproduktive Leistung analysiert werden. Die von den vorherigen Untersuchungen verbliebenen Pflanzen waren zu diesem Zeitpunkt vollständig seneszent und die Schoten am Hauptspross begannen sich zu öffnen.

Abb. 3-15 zeigt, dass im Gegensatz zu den stark MP17:GFP-exprimierenden Linien Col-0-16, *Ler-1* und *Ler-12* für die Linie C24-12 mit einem hohen MP17-Expressionsniveau kein Anstieg im Samenertrag nachgewiesen werden konnte.

Vielmehr zeichnete sich C24-12 durch eine drastische Abnahme der reproduktiven

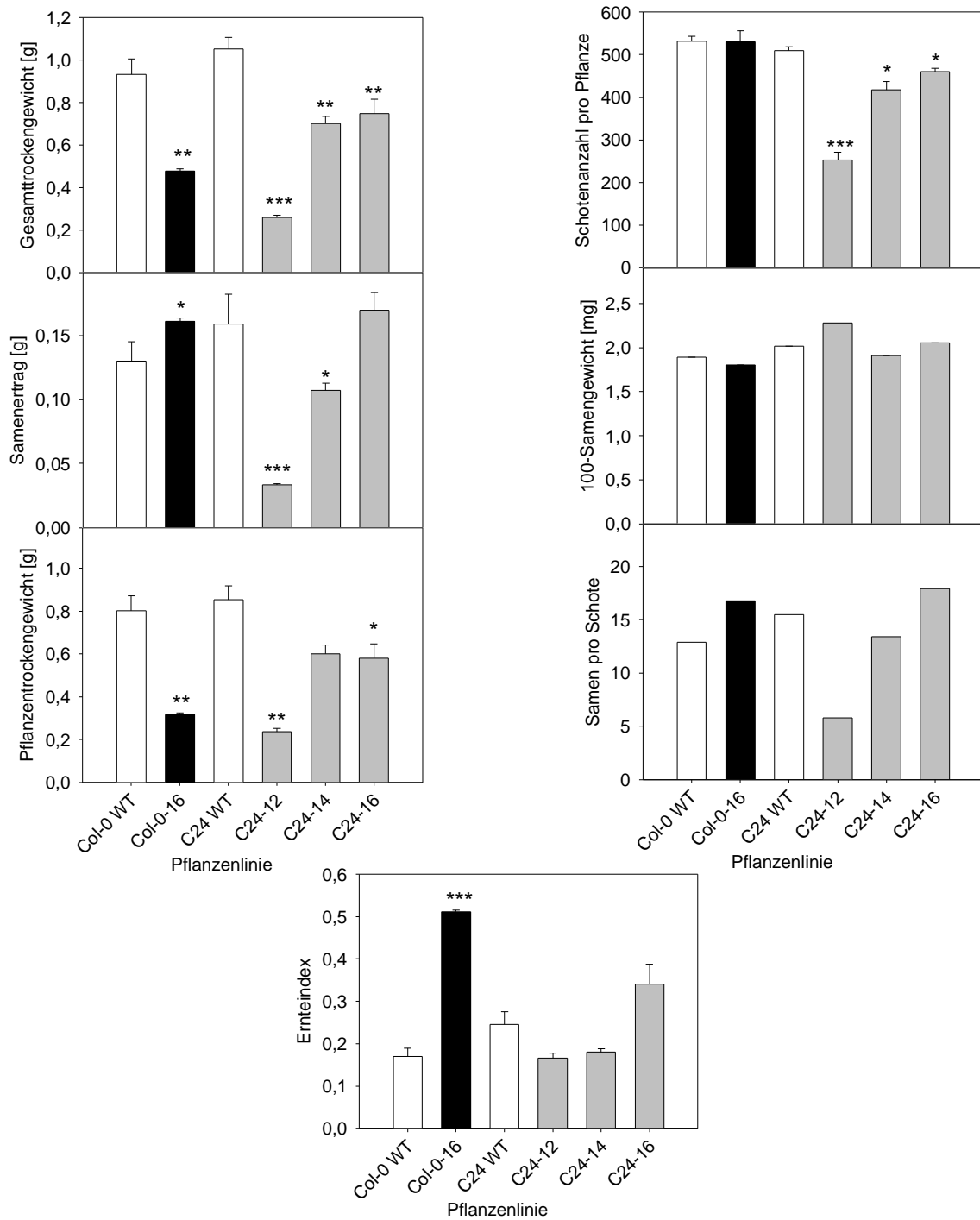


Abbildung 3-15: Analyse der Ressourcenverteilung zum Erntezeitpunkt von MP17-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien des C24-Ökotyps im Vergleich zur MP17:GFP-transgenen Linie Col-0-16

Die Untersuchungen wurden mit jeweils 5-10 Pflanzen pro Linie durchgeführt. Das Auszählen der Schotenanzahl erfolgte an Pflanzen, deren Blüten in den Samenstand übergegangen waren. Zum Zeitpunkt der Ernte waren die Pflanzen vollständig seneszent. Es sind Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die Verschiedenheit zur entsprechenden WT-Kontrolle wurde mittels Student's t-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede sind als * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ gekennzeichnet.

Leistung aus, die im Vergleich zur WT-Kontrolle auf 21% gesunken war. Das Auszählen der Schoten pro Pflanze und die Bestimmung des 100-Samengewichts legten offen, dass die geringere Samenproduktion aus einer signifikant geringeren Schotenanzahl (253 in C24-12 vs. 510 im C24 WT) und rechnerisch ermittelt etwa 10 weniger gebildeten Samen pro Schote resultierte. Das manifestierte sich auch in einem deutlich niedrigeren Trockengewicht, infolge dessen eine leichte Abnahme des Ernteindex zu verzeichnen war.

Es ließ sich feststellen, dass mit sinkender MP17-Expressionsstärke der Samenertrag in einem umgekehrt proportionalen Verhältnis dazu anstieg. Während C24-14 noch signifikant weniger Samenertrag produzierte, lag die reproduktive Leistung von C24-16 im WT-Bereich. Parallel dazu war ein leichter Anstieg in der Schotenanzahl zu beobachten, die jedoch weiterhin deutlich unterhalb des WT-Niveaus blieb. Die Bestimmung des 100-Samengewichts ließ keinen Unterschied der transgenen Linien C24-14 und C24-16 gegenüber dem WT erkennen. Folglich ließ sich aus den Mittelwerten von Schotenzahl, Samenertrag und 100-Samengewicht berechnen, dass die durchschnittliche Zahl an Samen pro Schote von 13 in C24-14 auf 18 in C24-16 im Vergleich zu 15 im C24 WT tendenziell anstieg. Weil das Pflanzentrockengewicht dieser niedriger exprimierenden Linien leicht und lediglich für C24-16 statistisch signifikant reduziert war, während sich der Samenertrag der WT-Produktion annäherte, ergab sich daraus ein tendenzieller Anstieg im Ernteindex.

3.3 Der MP17-vermittelte Phänotyp ist nicht Hitze-revertierbar

Vergleichbar den phänotypischen Änderungen in MP17- und MP17:GFP-transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen induzierte die konstitutive Expression von NS_M-MP des *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in *Nicotiana tabacum* ernste, Infektions-ähnliche Symptome (Rinne *et al.*, 2005). Unter Anwendung verschiedener Techniken wurde gezeigt, dass diese Symptome mit dem Verschluss NS_M-gebundener Mesophyll-PDs im *source*-Gewebe durch die Ablagerung von 1,3-β-D-Glukan bzw. Kallose korrelierten. Das Umsetzen der transgenen Pflanzen von 22°C auf permanent 32°C hob die Effekte durch Wiederherstellung der plasmodesmalen Transportkapazität infolge des Kallase-vermittelten Kalloseabbaus wieder auf.

Aufgrund dieser Hinweise sollte untersucht werden, ob der MP17-vermittelte Phänotyp auf einen Verschluss der PDs bedingt durch Kalloseablagerungen zur

Pathogenabwehr oder die Bindung großer Mengen von MP17, die einen direkten Einfluss auf Kohlenhydratmetabolismus und -transport ausübt, zurück zu führen ist. Für diese Analysen wurden sowohl phänotypische *Arabidopsis*-Linien im Col-0-Hintergrund als auch Tabaklinien des SNN-Ökotyps in Betracht gezogen, um auszuschließen, dass es sich bei der möglichen Phänotypreversion ausschließlich um einen Effekt in MP-transgenen Tabakpflanzen handelt. Die verwendeten phänotypischen Tabaklinien wurden von Dr. D. Hofius (Hofius, 2003) bereitgestellt.

Die transgenen Pflanzen wurden im Vergleich zur jeweiligen WT-Kontrolle zunächst 5 Wochen entsprechend *Arabidopsis*- und Tabak-spezifischer Anzuchtbedingungen (vergl. Abschn. 2.2) kultiviert bis Wachstumsretardierung und auffälliges Ausbleichen der Interkostalregionen in den unteren *source*-Blättern deutlich sichtbar wurden. Anschließend wurde ein Teil der Pflanzen für drei Wochen unter permanent 32°C angezogen.

In Abb. 3-16 B ist das Erscheinungsbild der unter 32°C transferierten *Arabidopsis*- und Tabakpflanzen im Vergleich zu den unter 20°C bzw. 22°C kultivierten Linien dokumentiert. Die transgenen Linien zeichneten sich weiterhin durch die drastische Wuchshemmung und einen chlorotischen Phänotyp aus. Die Immunolokalisierung von Kallose in *source*-Blättern von *Arabidopsis*-WT und transgener Col-0-16 (s. Abb. 3-16 C), die mit Hilfe von Immunogoldmarkierungen unter Verwendung des anti-Kallose-Antikörpers erfolgte (durchgeführt von Dr. T. Rutten), ließ keine augenscheinlichen Unterschiede in der Anzahl der Kallose-markierenden Goldkörner erkennen, sowohl zwischen WT und transgener Linie als auch Anzucht unter 20°C und 32°C. Auch die Messung der Kallosegehalte in *source*-Blättern zwei Wochen nach Transfer unter 32°C offenbarte, dass alle untersuchten Pflanzen vergleichbare Mengen an Kallose enthielten (s. Abb. 3-16 D, oben).

Um zu überprüfen, ob die beibehaltenen phänotypischen Änderungen mit MP17-Expressionsniveau und Kohlenhydratstatus korrelierten, wurden die Pflanzen zwei Wochen nach Transfer auf Akkumulation von MP17- bzw. MP17:GFP-Protein sowie von löslichen Zuckern und Stärke analysiert. Die Untersuchungen bestätigten ein unverändert hohes MP17-Expressionsniveau der phänotypischen *Arabidopsis*- und Tabakpflanzen (s. Abb. 3-16 A). In diesem Zusammenhang fiel auf, dass in Übereinstimmung mit den Beobachtungen in transgenen *Arabidopsis*-Linien auch in den MP17-exprimierenden Tabakpflanzen ein deutlich höherer Proteingehalt

notwendig war, um zu einem ähnlichen Phänotyp zu führen wie in Col-0-16. Infolge

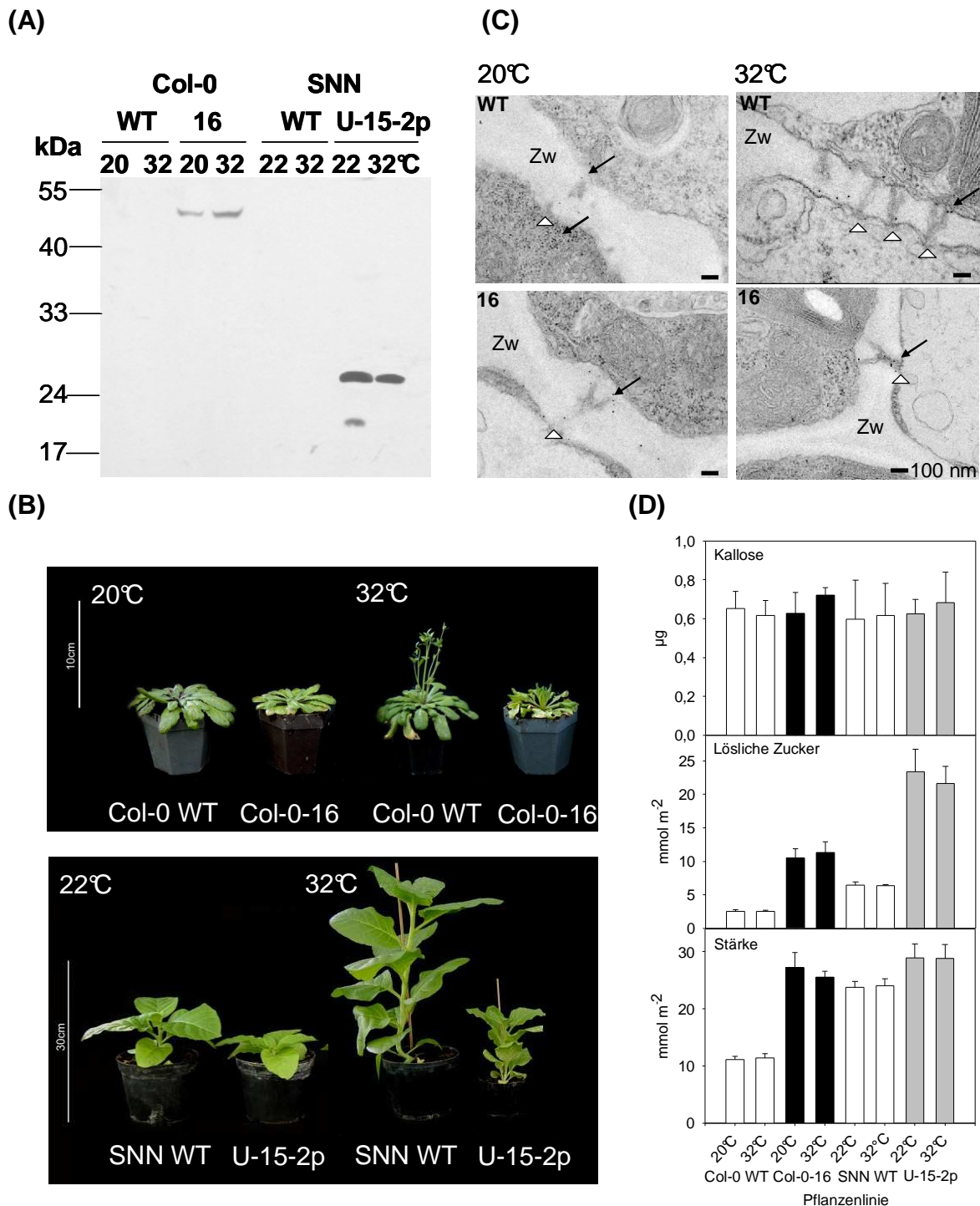


Abbildung 3-16: Analyse der MP17-vermittelten Phänotypreversion MP17-transgener Tabak- (SNN) und MP17:GFP-exprimierender *Arabidopsis*-Pflanzen (Columbia, Col-0) nach Transfer unter 32°C im Vergleich zu den Kontrollen (WT und Kultivierung unter herkömmlichen Anzuchtbedingungen)

Die Pflanzen wurden 5 Wochen unter spezifischen Bedingungen kultiviert (20°C Kurztag *Arabidopsis*, 22°C Langtag Tabak) und anschließend unter permanent 32°C angezogen. **(A)** Western-Analyse der MP17- und MP17:GFP-Expression mittels eines polyklonalen anti-MP17-Antiserums (1:5000). Der Größenstandard ist in kDa angegeben. Unter **(B)** ist der Phänotyp drei Wochen nach Transfer dargestellt. Der Maßstab zeigt 10 cm bzw. 30 cm. **(C)** Immunogoldmarkierung in *source*-Blättern von *Arabidopsis*-WT und transgener Col-0-16. Kallose wurde mit polyklonalem anti-Kallose-Antikörper und

Gold (10nm)-konjugiertem Protein A detektiert. Pfeile geben Kallosemarkierungen an, Dreiecke markieren Plasmodemesmen, Zw: Zellwand. Der Maßstab zeigt 100 nm an. **(D)** Kallose- und Kohlenhydratgehalte zwei Wochen nach Transfer. Die Proben wurden 8 Stunden nach Beginn der Lichtphase von jeweils zwei *source*-Blättern pro Pflanze genommen und lösliche Zucker, Stärke und Kallose bestimmt. Daten repräsentieren Mittelwerte (n=5) ± Standardfehler.

der starken MP17- bzw. MP17:GFP-Akkumulation konnte ein drastischer Anstieg an löslichen Zuckern und Stärke im Vergleich zum entsprechenden WT nachgewiesen werden (s. Abb. 3-16 D, unten). Die Gehalte der transgenen Col-0-16-Linie an löslichen Zuckern und Stärke waren um das 4,4- bzw. 2,4-fache gegenüber der WT-Kontrolle erhöht. Auch in den phänotypischen Tabakpflanzen konnte eine generelle Erhöhung um 244% für lösliche Zucker und um 121% für Stärke gezeigt werden. Somit konnte die von Rinne *et al.* (2005) beschriebene Reversion des MP-vermittelten Phänotyps durch Reversion der Kalloseablagerungen zur Abwehr gegen Virusinfektionen nicht mit MP17-transgenen *Arabidopsis*- und Tabakpflanzen beobachtet werden.

3.4 Zellspezifische MP17:GFP-Expression *Arabidopsis*

Die Bindung von MP17 an PDs in konstitutiv MP17- und MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen erwies sich als entscheidender Faktor, um je nach Expressionsstärke über die Transportkapazität von PDs gegenüber Photoassimilaten und Signalmolekülen einen fördernden oder nachteiligen Einfluss auf vegetatives und reproduktives Wachstum in *Arabidopsis* auszuüben.

Es gibt Hinweise, dass PDs in einzelnen Zelltypen eine besondere Bedeutung im symplastischen Transport zukommt. Insbesondere von Bündelscheidenzellen wird angenommen, dass sie als Kontrollpunkte für den PD-vermittelten Transport von Assimilaten und Makromolekülen zwischen vaskulärem und nicht-vaskulärem Gewebe dienen (Russin *et al.*, 1996; Ding, 1998; Nelson und van Bel, 1998; Botha *et al.*, 2000; Hofius *et al.*, 2001; Provencher *et al.*, 2001). Zudem übernehmen PDs zwischen Siebelement und Geleitzellen ebenfalls spezifische Funktionen (van Bel, 1993; Cronin *et al.*, 1995; Kasschau *et al.*, 1997; Lucas, 1999; Oparka und Turgeon, 1999).

Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob und inwieweit sich die Expression von MP17:GFP in spezifischen Zellen von *Arabidopsis* auf Assimilatverteilung und Biomasseproduktion auswirkt. Zu diesem Zweck stellt die Zell-spezifische Expression

in transgenen Pflanzen über ausgewählte Promotoren eine alternative Strategie zur konstitutiven Expression dar, um die Wirkungsweise von MPs auf symplastische Transportprozesse und Assimilatverteilung zu analysieren und Zellen mit einer eventuellen Schlüsselfunktion zu identifizieren. Daher sollten die in Abschn. 3.1 beschriebenen Analysen mit *Arabidopsis*-Linien durchgeführt werden, die MP17:GFP unter der Kontrolle Zell-spezifischer Promotoren exprimieren.

Zur Verifizierung, ob und welchen Einfluss die Bündelscheiden-spezifische Expression von MP17:GFP auf Assimilatverteilung sowie vegetatives und generatives Wachstum ausübt, wurde der TPA-Promotor ausgewählt. Er trägt das *gdcS*-Gen aus *Flaveria anomala* und seine Bündelscheidenspezifität wurde über Deletionskonstrukte in Fusion mit dem *GUS*-Reporter gen in transgenen Tabakpflanzen charakterisiert (Chu, 1996).

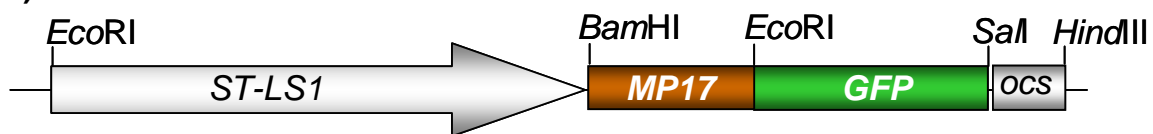
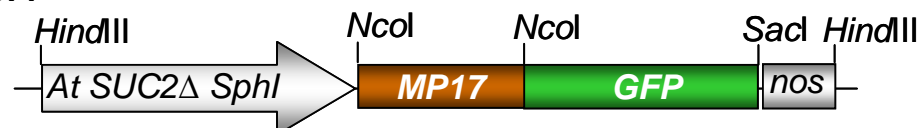
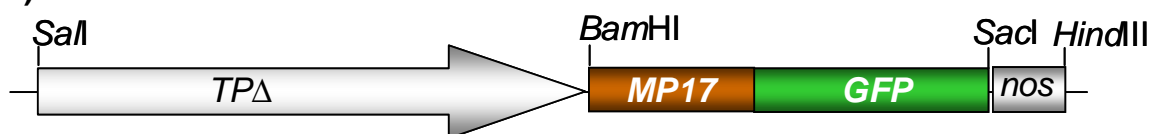
Die Untersuchung des Einflusses der MP17:GFP-Expression in Geleitzellen von *Arabidopsis* sollte unter Kontrolle des Geleitzell-spezifischen Promotors AtSUC2 erfolgen. Histochemische Analysen belegten, dass das Protein AtSUC2 ausschließlich in der Plasmamembran von Geleitzellen nachweisbar war (Stadler und Sauer, 1996).

Weiterhin wurde für die Analysen das Konstrukt pBin-L700 ausgewählt, um zu überprüfen, ob die spezifische Expression von MP17:GFP in chloroplastenhaltigen Zellen ausreichend ist, um ähnliche phänotypische Veränderungen wie bei konstitutiver Expression zu induzieren. Im Rahmen der Diplomarbeit von Dr. D. Hofius (Hofius, 1998) wurde das Konstrukt pBin-L700 hergestellt, welches die Expression des N-terminal um die Aminosäuren Methionin und Gluthamin verlängerten MP17:GFP unter Kontrolle des ST-LS1-Promotors vermittelt (s. Abb. 11 A) und als L700-MP17:GFP bezeichnet wird. Die Spezifität dieses aus *Solanum tuberosum* stammenden Promotors für chloroplastenhaltige Zellen wurde von Stockhaus *et al.* (1989) nachgewiesen.

3.4.1 Konstrukte zur Zell-spezifischen Expression von MP17:GFP

Zur Zell-spezifischen Expression von MP17:GFP in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen wurden binäre Konstrukte mit den ausgewählten Promotoren AtSUC2 und TPA erstellt (s. Abb. 3-17).

Der AtSUC2-Promotor weist eine hohe Zellspezifität für Geleitzellen in *source*-Blättern auf und vermittelt zudem eine stärkere Expression als der ebenfalls Geleitzell-spezifische rolC-Promotor. Daher wurde von R. Stadler und N. Sauer (Universität Erlangen) ein Plasmid erhalten, das eine Fusion aus dem deletierten AtSUC2-Promotor (903 bp; AtSUC2 Δ SphI) und GFP enthielt. Unter Verwendung der Oligonukleotide D98/D197 wurde MP17 mittels PCR amplifiziert, so dass an den 5'- und 3'-Enden NcoI-Restriktionsschnittstellen eingeführt wurden. Als Matrize diente dabei das binäre Plasmid p35S-1 mit der MP17:GFP-Fusion unter Kontrolle des 35S-Promotors (vergl. 3.1.1). Das MP17-Fragment wurde anschließend in die NcoI-Schnittstelle am N-Terminus von GFP inseriert und die gesamte Kasette aus AtSUC2 Δ SphI-MP17:GFP im Austausch gegen GUS über HindIII/SacI in den binären Vektor pBi101 kloniert. Die positiven Plasmide wurden über Sequenzanalyse verifiziert. Das Konstrukt wurde als PEP-MP17:GFP bezeichnet und über *Agrobacterien*-vermittelten Gentransfer mittels „floral dip“ (vergl. 2.4.1) in *Arabidopsis* Col-0 transferiert.

(A) L700-MP17:GFP**(B) PEP-MP17:GFP****(C) TP Δ -MP17:GFP**

500 bp

Abbildung 3-17: Konstrukte zur Zell- und Gewebe-spezifischen Expression von MP17:GFP in *Arabidopsis*

Schematische Darstellung der binären Expressionskassetten, die zur spezifischen Expression des Fusionsproteins in chloroplastenhaltigen Zellen **(A)**, Geleitzellen **(B)** und Bündelscheidenzellen **(C)** eingesetzt wurden. Die gesamte kodierende Region wurde zur Expression in chloroplastenhaltigen Zellen zwischen den ST-LS1-Promotor aus *Solanum tuberosum* und den ocs-Terminator in die BamHI/SalI-Schnittstellen des pBin-L700-Vektors inseriert (Hofius, 1998). Zur Expression in Geleitzellen und Bündelscheide wurden die Konstrukte in den pBi101-Vektor kloniert. Die Richtungspfeile markieren den ausgewählten Promotor und grau unterlegt ist der entsprechende Terminator abgebildet. Außerdem eingezeichnet sind einige interne Schnittstellen der Konstrukte. Der Größenmaßstab gibt 500 bp an.

Da von C. Chu (1996) gezeigt werden konnte, dass die $TP\Delta$ -Promotorregion des *gdc5T*-Gens 1500-1600 bp stromaufwärts des Start-ATG ausreichend für die Spezifität der Expression in Bündelscheidenzellen war, wurde über PCR mit den Oligonukleotiden D213/D214 ein *Bam*HI/*Sac*I-gelinktes $TP\Delta$ -Fragment von 1644 bp erhalten. Dieses Fragment wurde zunächst stromaufwärts des *GUS*-Gens in den pBi101-Vektor kloniert. Das Konstrukt zur Bündelscheiden-spezifischen Expression der MP17:GFP-Fusion wurde über den Austausch des *GUS*-Gens durch ein *Bam*HI/*Sac*I-flankiertes *MP17:GFP*-Fragment erhalten, welches unter Verwendung von p35S-1 als Matrize und den Oligonukleotiden D221/D222 PCR-amplifiziert wurde. Das durch Sequenzierung überprüfte und als $TP\Delta$ -MP17:GFP bezeichnete Plasmid wurde schließlich mittels *Agrobacterien*-vermittelten Gentransfer über „floral dip“ in *Arabidopsis*-Pflanzen des Ökotyps Col-0 transformiert und Kanamycin-resistente Transformanten regeneriert.

3.4.2 Verifizierung der MP17:GFP-Expression in transgenen *Arabidopsis*-Linien

Nach Transformation von L700-MP17:GFP in Col-0 wurden 40 Kanamycin-resistente Pflanzen erhalten, von denen 14 Pflanzen eine deutliche Akkumulation des Fusionsproteins in der Western-Analyse zeigten (Daten nicht gezeigt). Von den transgenen Linien zeichneten sich einige Pflanzen in der T2-Generation darüber hinaus durch die Ausprägung eines charakteristischen, MP17-vermittelten Phänotyps aus, der mit den zuvor in der 35S-MP17:GFP-transgenen Linie Col-0-16 beobachteten Veränderungen übereinstimmte. Aufgrund starker MP17:GFP-Proteinsignale in der Western-Analyse wurden die Linien L700-MP17:GFP 10 und 12, die nachfolgend als L700-10 und L700-12 bezeichnet werden, ausgewählt und über mehrere Generationen so vermehrt, dass für die Analysen Pflanzenmaterial mit einheitlichem Phänotyp zur Verfügung stand.

Durch Kanamycin-Selektion des T1-Saatgutes der PEP-MP17:GFP-Transformation wurden etwa 20 transgene Pflanzen erhalten, die über Fluoreszenzmikroskopie auf Expression des Fusionsproteins im Leitgewebe getestet wurden. Es konnten 6 Pflanzen identifiziert werden, die MP17:GFP spezifisch in Geleitzellen exprimierten und ähnlich starke GFP-Fluoreszenzsignale aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Zudem

schiene die transgenen Pflanzen in der T1-Generation einen deutlichen Wachstumsdefekt auszuprägen. Dieser Eindruck ließ sich in den MP17-exprimierenden Pflanzen der T2-Generation jedoch nicht bestätigen. Mittels Northern-Analyse wurden positive Pflanzen bis zur T4-Generation selektiert, in der sie jedoch noch nicht homozygot waren.

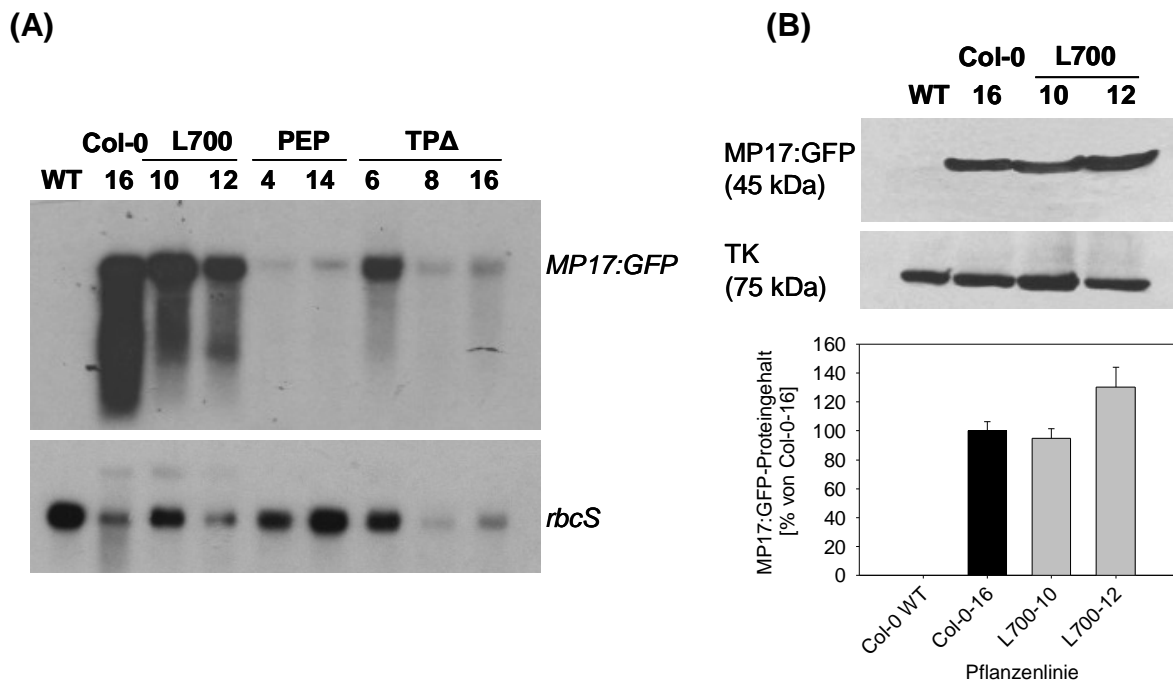


Abbildung 3-18: Expressionsanalyse von MP17:GFP unter Kontrolle Zell- und Gewebespezifischer Promotoren in transgenen *Arabidopsis*-Linien des Ökotyps Col-0 im Vergleich zur WT-Kontrolle und konstitutiv exprimierenden Referenzlinie Col-0-16

(A) Northern-Analyse von *MP17:GFP*-spezifischen Transkripten. Gesamt-RNA wurde aus *source*-Blattmaterial von Kontrollen und transgenen *Arabidopsis*-Linien isoliert. Pro Spur wurden 30 µg geladen und zur Bestimmung der *MP17:GFP*-Expression mit einem *MP17*-cDNA-Fragment hybridisiert. Zur Überprüfung der Beladung erfolgte eine zusätzliche Beprobung mit *rbcS*-cDNA.

(B) Western-Analyse und Quantifizierung der *MP17:GFP*-Proteinakkumulation in *MP17:GFP*-exprimierenden L700-Linien. Gesamtprotein wurde aus *source*-Blättern isoliert. Identische Proteinmengen (20 µg) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und unter Verwendung eines polyklonalen anti-*MP17*-Antiserums (1:5000 Verdünnung) sowie eines sekundären HRP-konjugierten IgG-Antikörpers (1:100000) detektiert. Zur Normalisierung der *MP17*-spezifischen Signale wurden die Immunoblots mit polyklonalem anti-Transketolase- (TK) Antikörper beprobt. Die Quantifizierung der *MP17*-Proteingehalte wurde mit 5 Pflanzen pro Linie durchgeführt und die Werte in Prozent bezogen auf die Referenzlinie Col-0-16 angegeben. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. L700: Konstrukt zur *MP17:GFP*-Expression in chloroplastenhaltigen Zellen unter Kontrolle des ST-LS1-Promotors aus *Solanum tuberosum*, PEP: Konstrukt zur *MP17:GFP*-Expression in Geleitzellen unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors aus *Arabidopsis thaliana*, TPΔ: Konstrukt zur *MP17:GFP*-Expression in Bündelscheidenzellen unter Kontrolle des TPΔ-Promotors des *gdcS*-Gens aus *Flaveria anomala*.

Weiterhin wurden 20 TPΔ-*MP17:GFP*-Primärtransformanten generiert und über Fluoreszenzmikroskopie auf *MP17:GFP*-Expression durchmustert. In der

mikroskopischen Analyse wiesen 6 der TP Δ -MP17:GFP-transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen eindeutige GFP-Fluoreszenz auf, wobei MP17:GFP mit PDs von Bündelscheidenzellen assoziiert war. Auch in diesen Linien waren keine offensichtlichen Unterschiede in Häufigkeit und Stärke der Fluoreszenzsignale zu erkennen. TP Δ -MP17:GFP-transgene Pflanzen, deren Expression über Northern-Analyse getestet wurde, wurden bis zur T4-Generation vermehrt, in der sie ebenfalls noch nicht homozygot vorlagen.

In Abb. 3-18 ist die Expressionsanalyse von *Arabidopsis*-Pflanzen, die MP17:GFP spezifisch in chloroplastenhaltigen Zellen, Geleit- und Bündelscheidenzellen exprimieren, im Vergleich zur WT-Kontrolle und Col-0-16-Referenzlinie dargestellt. Dazu wurden die Pflanzen ausgewählter, spezifisch exprimierender Linien, die in den nachfolgenden Analysen eingesetzt wurden, 6 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen. Von den Linien L700-10 und L700-12 stand homozygotes Pflanzenmaterial zur Verfügung. Die Linien PEP-MP17:GFP 4 und 14 sowie TP Δ -MP17:GFP 6, 8 und 16, die im Folgenden als PEP-4, PEP-14 bzw. TP Δ -6, -8 und -16 bezeichnet werden, wurden in der T4-Generation zuvor mittels Northern-Analyse auf MP17:GFP-Expression verifiziert. Dabei wurde Gesamt-RNA aus *source*-Blattmaterial isoliert und zur Detektion der *MP17:GFP*-Transkripte mit einer *MP17*-spezifischen cDNA-Sonde eingesetzt. In Übereinstimmung mit ähnlichen GFP-Fluoreszenzsignalen innerhalb der unabhängigen Linien, die entweder mit dem Konstrukt PEP- oder TP Δ -MP17:GFP transformiert wurden, zeigte die Hybridisierung mit einer *rbcS*-cDNA-Sonde als interner Standard und einer *MP17*-cDNA-Sonde keine wesentlichen Unterschiede in der Stärke der *MP17:GFP*-Signale zwischen den transgenen Linien eines Konstruktes. Da identische RNA-Mengen eingesetzt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die Unterschiede in der Signalstärke zwischen den transgenen Linien eines Konstruktes auf einen ungleichmäßigen Transfer der RNA auf die GeneScreen Membran zurück zu führen ist. Hingegen fällt auf, dass die Bündelscheiden-spezifischen TP Δ -Linien höhere *MP17:GFP*-Transkriptmengen aufwiesen als die Geleitzell-spezifischen PEP-Linien.

Die Expression von MP17:GFP in chloroplastenhaltigen Zellen der *Arabidopsis*-Linien L700-10 und L700-12 zeigte sich in ähnlich hohen *MP17:GFP*-Transkriptmengen wie in der Kontrolllinie Col-0-16 und führte zu nachweisbaren MP17:GFP-Proteinsignalen. Die wie in Abschn. 2.8.1.1 und 3.1.1 durchgeführte Quantifizierung der MP17:GFP-Proteinakkumulation im Vergleich zur Referenzlinie

Col-0-16 von jeweils 5 Pflanzen pro Linie offenbarte ebenfalls ein vergleichbares MP17:GFP-Proteinexpressionsniveau der Col-0-16- und L700-Linien. Während L700-10 mit 95% MP17:GFP einen ähnlichen Proteingehalt wie Col-0-16 aufwies, akkumulierte L700-12 30% mehr Protein. Jedoch erwies sich dieser Anstieg im MP17:GFP-Proteinlevel bezogen auf die Referenzlinie Col-0-16 in der statistischen Analyse nicht als signifikant.

3.4.3 Zelluläre Lokalisierung von MP17:GFP

Die subzelluläre Lokalisierung von MP17:GFP in verschiedenen Zell- und Gewebetypen von *source*-Blättern wurde in transgenen *Arabidopsis*-Linien, die das Fusionsprotein unter Kontrolle der spezifischen Promotoren L700 (chloroplastenhaltige Zellen), AtSUC2 (Geleitzellen) und TP Δ (Bündelscheide) exprimieren, über die Detektion von GFP mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) durchgeführt.

Grünfluoreszierende GFP-Punkte ließen sich in beiden transgenen L700-Linien detektieren, und die *Arabidopsis*-Linie mit der stärksten Expression (L700-12) wurde für eine detailliertere Analyse ausgewählt. Im Mesophyll von *source*-Blättern war entsprechend der Spezifität des ST-LS1-Promotors für chloroplastenhaltige Zellen eine punktuelle Fluoreszenz im Zellwandbereich der Zell-zu-Zell-Verbindungen von Palisaden- und Schwammparenchym zu lokalisieren (s. Abb. 3-19 C-D). Außerdem war eine eindeutige GFP-vermittelte Fluoreszenz in Mesophyll und Bündelscheide erkennbar, aber keine sichtbare Markierung im Xylem (s. Abb. 3-19 E). Auch in der Zellwand von oberer und unterer Epidermis (s. Abb. 3-19 A, D) sowie zwischen Schließzellen der Spaltöffnungen und angrenzender Epidermiszelle war GFP-Markierung zu finden (s. Abb. 3-19 B). Bei letzterem handelt es sich um einen Bereich, für den halbseitige PDs auf Seiten der Epidermiszelle nachgewiesen wurden (Itaya *et al.*, 1998).

Weiterhin wurde das Leitgewebe verschiedener Venenklassen [Klassifizierung für *Nicotiana* ssp. nach Roberts *et al.* (1997)] in den transgenen Linien mit Geleitzell- und Bündelscheiden-spezifischer Expression von MP17:GFP auf das Auftreten von GFP-Fluoreszenz analysiert.

In beiden unabhängigen PEP-Linien war die GFP-Markierung entsprechend der

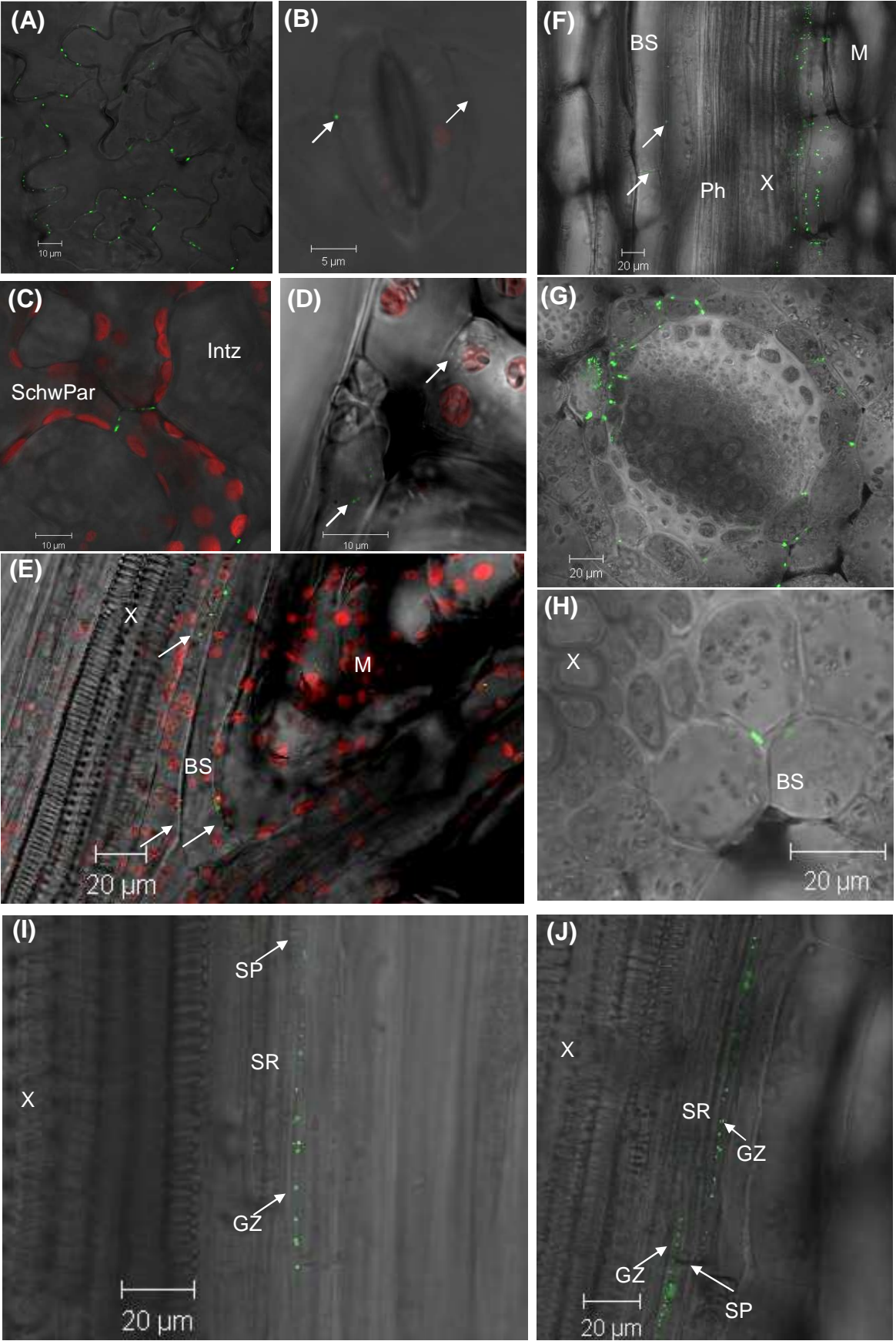


Abbildung 3-19: Lokalisierung des MP17:GFP-Fusionsproteins in verschiedenen Geweben transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

Gezeigt ist die Lokalisierung von MP17:GFP bei Expression unter Kontrolle des L700-Promotors für chloroplastenhaltige Zellen **(A)-(E)**, des AtSUC2-Promotors für Geleitzellen **(F)-(H)** sowie des TP Δ -Promotors für Bündelscheidenzellen **(I)-(J)**.

(A) Obere Epidermiszellen von *source*-Blättern. Grünfluoreszierende Punkte sind in Zellwandbereichen benachbarter Zellen zu detektieren.

(B) Obere Epidermis mit dem Stomataapparat eines *source*-Blattes. GFP-vermittelte Fluoreszenz ist in den Zellwänden zwischen Epidermis und Schließzelle (Pfeile) erkennbar. Die rote Fluoreszenz stammt vom Chlorophyll in den Chloroplasten.

(C) Schwammparenchymzellen mit GFP-Markierung zwischen zwei benachbarten Zellen eines *source*-Blattes.

(D) Querschnitt durch Epidermis mit Stomataapparat eines *source*-Blattes. Grüne Fluoreszenz (Pfeil) ist zwischen lateralen Zellwänden der Epidermis und Palisadenparenchym, deren GFP-Markierung mit dem Vorhandensein von Chloroplasten korreliert, nachweisbar.

(E) Längsschnitt durch das Leitgewebe der Mittelrippe (Venenklasse I) mit Verzweigung eines *source*-Blattes. Fluoreszierende Punkte sind in den Zellwänden zwischen einzelnen Mesophyllzellen und auch zwischen Bündelscheidenzellen (Pfeile) erkennbar.

(F), (G) Im Längsschnitt (F) und Querschnitt (G) durch die Petiole eines *source*-Blattes markiert die grüne Fluoreszenz die Verbindungen zwischen benachbarten Bündelscheidenzellen, zwischen Bündelscheide und Phloem sowie zwischen Bündelscheide und Mesophyll.

(H) Die Vergrößerung des Leitgewebes der Venenklasse I (Mittelrippe) im Querschnitt eines *source*-Blattes verdeutlicht die GFP-Markierung zwischen benachbarten Bündelscheidenzellen.

(I), (J) Der Längsschnitt durch das Leitgewebe der Venenklasse I (I) und II (J) eines *source*-Blattes zeigt ausschließlich die Beschränkung der GFP-Fluoreszenz auf Geleitzellen.

Maßstäbe geben jeweils 20 μm (E-J), 10 μm (A, C, D) und 5 (B) μm an. BS: Bündelscheide, GZ: Geleitzelle, Intz: Interzellularraum, M: Mesophyll, Ph: Phloem, SchwPar: Schwammparenchymzelle, SP: Siebplatte, SR: Siebröhre, X: Xylem.

AtSUC2-Promotorspezifität ausschließlich in Geleitzellen in Form einer perlen schnurartigen Anordnung zu detektieren (s. Abb. 3-19 I, J). Die punktuelle GFP-Fluoreszenz war dabei auf beiden Seiten der Geleitzellen als auch an den Verbindungsstellen zwischen den Geleitzellen sichtbar. Hingegen war keine MP17:GFP-Fluoreszenz in den Siebelementen nachweisbar. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass sich die in der Expressionsanalyse nachgewiesenen geringen MP17:GFP-Transkriptmengen der PEP-Linien auch in der GFP-Markierung niederschlugen, die deutlich schwächer ausgeprägt war als in den Bündelscheiden-spezifischen TP Δ -Linien.

Entsprechend der Promotorspezifität war in den TP Δ -Linien die GFP-Lokalisierung nur in der Bündelscheide zu beobachten (s. Abb. 3-19 F-H). Die grüne Fluoreszenz war deutlich zwischen benachbarten Bündelscheidenzellen, zwischen Bündelscheide und Phloem sowie zwischen Bündelscheide und Mesophyll nachweisbar. Dabei kann angemerkt werden, dass sich im Leitgewebe von Mittelrippe, Petiole und Venenklasse II ein ähnliches Bild der punktuellen GFP-Markierung zeigte. Das lässt

eine Bündelscheiden-spezifische Expression von MP17:GFP in diesen transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen vermuten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Assoziation von MP17:GFP mit plasmodesmalen Strukturen nahe liegend war, da sich die punktuelle Fluoreszenz in den einzelnen transgenen Linien ausschließlich auf Zellwandbereiche in den verschiedenen untersuchten Zelltypen beschränkte. Darüber hinaus belegen die Expressions- und Lokalisierungsstudien, dass Linien generiert wurden, die MP17:GFP entsprechend der erwarteten Promotorspezifität in chloroplastenhaltigen Zellen, Geleitzellen und der Bündelscheide exprimieren. Damit können schließlich die Folgen der Gewebe-spezifischen Expression von MP17:GFP unter Kontrolle der verschiedenen Promotoren biochemisch, physiologisch und zellbiologisch miteinander verglichen und den konstitutiv MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien gegenübergestellt werden.

3.4.4 Änderungen des Kohlenhydratstatus nach Zell-spezifischer MP17:GFP-Expression

In den transgenen *Arabidopsis*-Linien mit MP17:GFP-Expression unter Kontrolle der Zell-spezifischen Promotoren ST-LS1 (L700), AtSUC2 (PEP) und TP Δ sollte zunächst überprüft werden, ob die spezifische Expression von MP17:GFP, wie bereits vorher in den konstitutiven *Arabidopsis*-Linien beobachtet, ebenfalls mit Veränderungen in der Assimilatverteilung in Verbindung steht. Folglich wurden die Gehalte an löslichen Zuckern und Stärke in ausgewachsenen *source*-Blättern der Fusionsprotein-exprimierenden Linien nach 5 Wochen unter Kurztagbedingungen bestimmt. Vor der Probennahme in den Geleitzell-spezifischen PEP- und Bündelscheiden-spezifischen TP Δ -Linien wurden zunächst alle T4-Pflanzen über Northern-Analyse getestet und nur solche selektiert, die *MP17:GFP* exprimieren. Die L700-Linien mit MP17:GFP-Expression in chloroplastenhaltigen Zellen lagen bereits homozygot vor.

Wie in Abb. 3-20 dargestellt, war in L700-10 und L700-12 eine deutliche Akkumulation an Kohlenhydraten etwa 8 h nach Beginn der Lichtperiode gegenüber den WT-Kontrollpflanzen nachweisbar. Sie war der konstitutiv MP17:GFP-exprimierenden Col-0-16 vergleichbar und deutete eine ähnliche Dosisabhängigkeit

vom MP17:GFP-Proteingehalt an. In L700-10 mit einem MP17:GFP-Expressionsniveau von 95% bezogen auf die Referenzlinie Col-0-16 konnte ein etwas geringerer Anstieg sowohl an löslichen Zuckern als auch an Stärke festgestellt werden als in Col-0-16 und L700-12. Bemerkenswert ist, dass L700-12 eine ausgeprägtere Erhöhung an Kohlenhydraten zeigte als die konstitutiv exprimierende Vergleichslinie Col-0-16. Hierbei ist anzumerken, dass sich L700-12 durch einen 30% höheren MP17:GFP-Proteinlevel als Col-0-16 auszeichnete. Die MP17:GFP-Expression resultierte in den L700-Linien in einer 2,2- bis 2,5-fachen Erhöhung des Verhältnis von löslichen Zuckern zu Stärke.

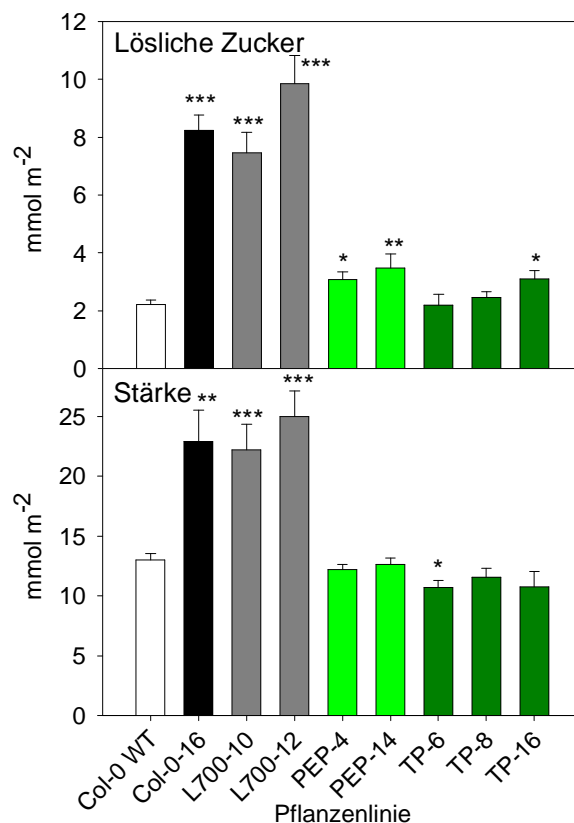


Abbildung 3-20: Kohlenhydratgehalte in MP17:GFP-transgenen *Arabidopsis*-Linien des Ökotyps Columbia (Col-0) unter Kontrolle der Promotoren ST-LS1 (L700), AtSUC2 (PEP) und TP Δ im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (WT) und Referenzlinie Col-0-16

Blattproben wurden von 5 Wochen alten Pflanzen 8 h nach Beginn der Lichtphase von vollständig entwickelten *source*-Blättern geerntet. Die Daten löslicher Zucker und Stärke wurden von 10 Pflanzen der WT-, Col-0-16- und L700-Linien und von 4-6 Pflanzen der PEP- und TP Δ -Linien erhalten, wobei von jeder Pflanze zwei Proben gemessen und gemittelt wurden. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben und signifikante Unterschiede (* P < 0,05, ** P < 0,01 und *** P < 0,001) im Vergleich zur WT-Kontrolle wurden mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt.

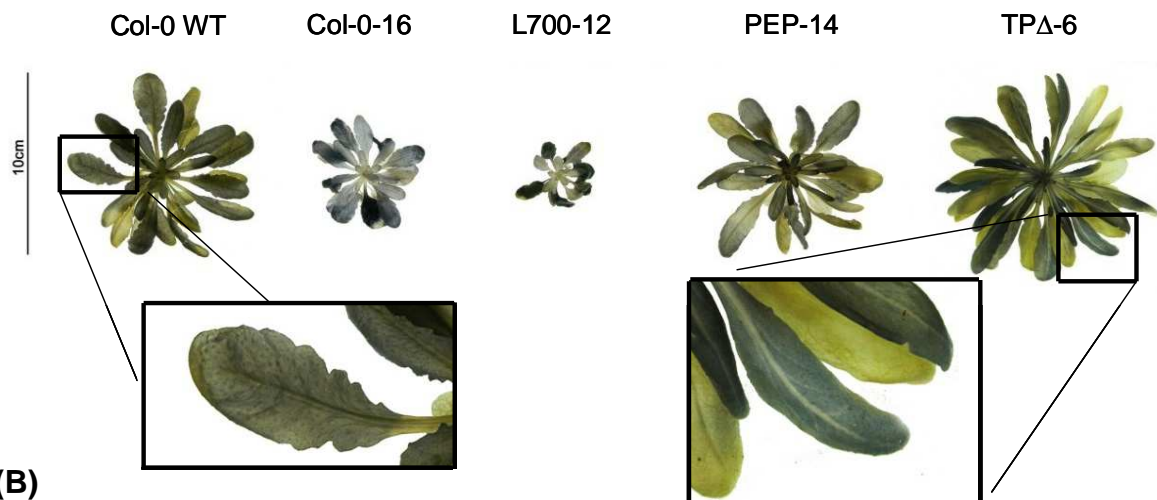
Im Gegensatz dazu traten in den Geleitzell-spezifisch MP17:GFP-exprimierenden PEP-Linien keine Unterschiede im Stärkegehalt im Vergleich zur WT-Kontrolle auf. Lediglich bei den löslichen Zuckern konnte ein leichter und signifikanter Anstieg verzeichnet werden. Das führte zu einer statistisch signifikant veränderten Verteilung zwischen löslichen Zuckern und Stärke. Hingegen lagen die Gehalte an löslichen Zuckern in den TP Δ -Linien im WT-Bereich. Nur in der Linie 16 zeichnete sich aufgrund eines Anstieges im Glukosegehalt eine Erhöhung der löslichen Zucker ab.

Während dessen war bei Bündelscheiden-spezifischer MP17:GFP-Expression eine generelle Verminderung des Stärkegehaltes zu beobachten, der sich für die Linie 6 als statistisch signifikant erwies. Jedoch wirkte sich dies in den TP Δ -Linien nicht auf das Verhältnis zwischen löslichen Zuckern und Stärke aus.

Die Werte der einzelnen Kohlenhydratmessungen sind mit den ermittelten Signifikanzen tabellarisch im Anhang V zusammengefasst.

Da sich in den TP Δ -Linien geringere Stärkegehalte abzeichneten, wurde mittels Jodfärbung die Stärkeverteilung visualisiert, um zu detektieren, ob eine Korrelation zwischen Zell-spezifischer Expression von MP17:GFP und der Verteilung der Kohlenhydratgehalte besteht.

(A)



(B)

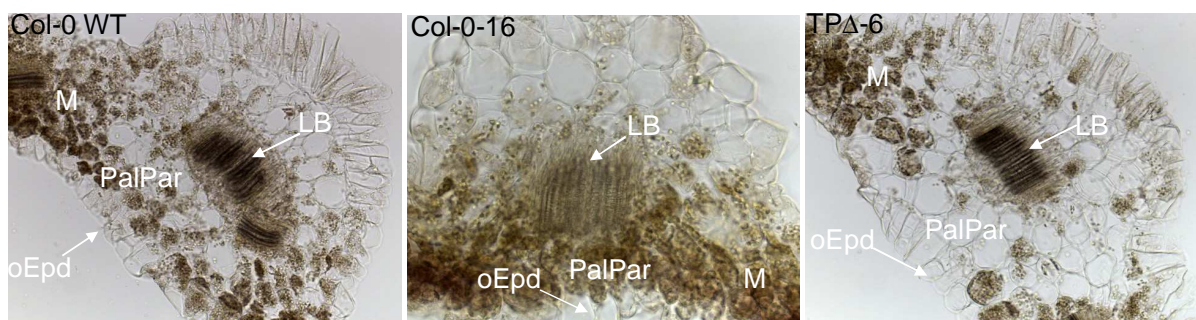


Abbildung 3-21: Akkumulation von Stärke in konstitutiv (Col-0-16) sowie spezifisch in chloroplastenhaltigen (L700), Geleit- (PEP) und Bündelscheidenzellen (TP Δ) MP17:GFP-exprimierenden Linien im Vergleich zur Wildtyp (WT)-Kontrolle

(A) Dargestellt sind 6 Wochen alte Pflanzen, die am Ende der Dunkelphase zunächst mit Ethanol entfärbt wurden. Die anschließende Färbung mit Lugol'scher Lösung (Iod/Kaliumiodid) zeigt die Stärkeverteilung in den *Arabidopsis*-Rosetten. Der Maßstab entspricht 10 cm.

(B) Lichtmikroskopische Vergrößerung der Mittelrippenbereiche (Venenklasse I) aus *source*-Blättern von Col-0 WT und TP Δ -6 (10-fach) sowie von Col-0-16 (20-fach). LB: Leitbündel, M: Mesophyll, PalPar: Palisadenparenchym, oEpd: obere Epidermis.

In Übereinstimmung mit den Kohlenhydratmessungen belegt die Färbung der Rosetten von Col-0 WT, Col-0-16, L700-12, PEP-4 und TP Δ -6 mit Jodlösung (Lugol'sches Reagenz) zum Ende der Dunkelphase die drastische Akkumulation von Stärke in den *source*-Blättern von Col-0-16 und L700-12 (s. Abb. 3-21). Dabei erschien die Linie L700-12, welche durch ein höheres MP17:GFP-Expressionsniveau als die Kontrolllinie Col-0-16 gekennzeichnet ist, stärker angefärbt.

Bemerkenswerter Weise waren im Gegensatz dazu in einigen *source*-Blättern von TP Δ -6 nicht Stärke-angefärbte Mittelrippen zu beobachten. Dies wurde durch Vergrößerung der Venenklasse I und umgebender Bereiche in lichtmikroskopischen Aufnahmen bestätigt (s. Abb. 3-21 untere Reihe). Sie verdeutlichen, dass die Speicherung von Stärke in der Linie mit Bündelscheiden-spezifischer MP17:GFP-Expression auf Mesophyllbereiche beschränkt blieb. Hingegen war in dem direkt über dem Leitgewebe liegenden Palisadenparenchym kaum Stärke nachweisbar.

Weiterhin konnten, ebenso wie in den vorherigen Zuckermessungen, auch in der Jodfärbung der Rosetten keine Unterschiede in der Stärkeverteilung der Geleitzell-spezifisch MP17:GFP-exprimierenden PEP-Linie im Vergleich zur WT-Kontrolle detektiert werden.

3.4.5 Einfluss der spezifischen Expression von MP17:GFP auf die Biomassen-Verteilung

Neben den nachweisbaren Unterschieden der Zell-spezifisch MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien in der Photoassimilatverteilung im Vergleich zu WT-Kontrolle und konstitutiv exprimierender Linie Col-0-16 wurden Phänotypentwicklung und generatives Wachstum verfolgt. Damit sollte ein ebenfalls möglicher Zusammenhang zwischen MP17-vermittelter Beeinflussung des Kohlenhydratstatus der Zell-spezifischen MP17:GFP-Expression und spezifischen phänotypischen Ausprägungen untersucht werden.

3.4.5.1 Phänotyp, vegetative und generative Blattbiomasse

Um die Auswirkung der Zell -spezifischen MP17:GFP-Expression zu analysieren, wurden jeweils 40 Pflanzen der ausgewählten transgenen Columbia-Linien mit

MP17:GFP-Expression unter Kontrolle des AtSUC2- bzw. TP Δ -Promotors sowie 35 Pflanzen der L700-Linien mit Chloroplasten-spezifischer MP17:GFP-Expression im Vergleich zu je 25 Pflanzen der WT- und konstitutiv MP17:GFP-exprimierenden Col-0-16-Kontrolle unter Kurztagbedingungen in einer Phytokammer angezogen. Repräsentative, 5 Wochen alte Vertreter der homozygoten Kontrollen und L700-Linien sowie MP17:GFP-exprimierende PEP- und TP Δ -Linien in der T4-Generation sind in Abb. 3-22 dokumentiert. Sie zeigten teilweise erhebliche Veränderungen in der Produktion von oberirdischer Biomasse.

In den Linien PEP-4 und PEP-14 waren keine Unterschiede zur WT-Kontrolle offensichtlich. Auffällig war jedoch die deutliche Wachstumsretardierung und der chlorotische Phänotyp in den *source*-Blättern der L700-Linien, wie sie bereits bei den konstitutiv MP17:GFP-exprimierenden Col-0-16, *Ler-1*, *Ler-12* und C24-74 mit einem hohen MP17:GFP-Proteingehalt beobachtet werden konnten. Dabei fiel auf, dass L700-12 mit einem höheren MP17:GFP-Expressionniveau als die Referenzlinie Col-0-16 noch stärker in der Ausbildung oberirdischer Biomasse betroffen war, während die schwächer exprimierende Linie L700-10 größer aussah als Col-0-16. Demgegenüber schienen die Pflanzen der Bündelscheiden-spezifisch MP17:GFP-exprimierenden TP Δ -Linien tendenziell größer zu sein als der WT.



Abbildung 3-22: Phänotyp MP17:GFP-transgener *Arabidopsis*-Linien des Ökotyps Columbia (Col-0) unter Kontrolle der Promotoren ST-LS1 (L700), AtSUC2 (PEP) und TP Δ im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (WT) und Referenzlinie Col-0-16 nach 5 Wochen unter Kurztagbedingungen

Zur Verifizierung dieser Veränderungen wurden die Zell-spezifisch MP17:GFP-exprimierenden Linien des *Arabidopsis*-Ökotyps Col-0 nach 6 Wochen Kultivierung unter Kurztagbedingungen analysiert. Dies erfolgte durch Ermitteln von Blattfrischgewicht, Rosettenblattzahl und Blattfläche von repräsentativen *source*-Blättern von 5 Pflanzen pro Linie (s. Abb. 3-23 A). Zuvor wurde die Expression von *MP17:GFP* der PEP- und TP Δ -Linien mittels Northern-Analyse in der T4-Generation verifiziert.

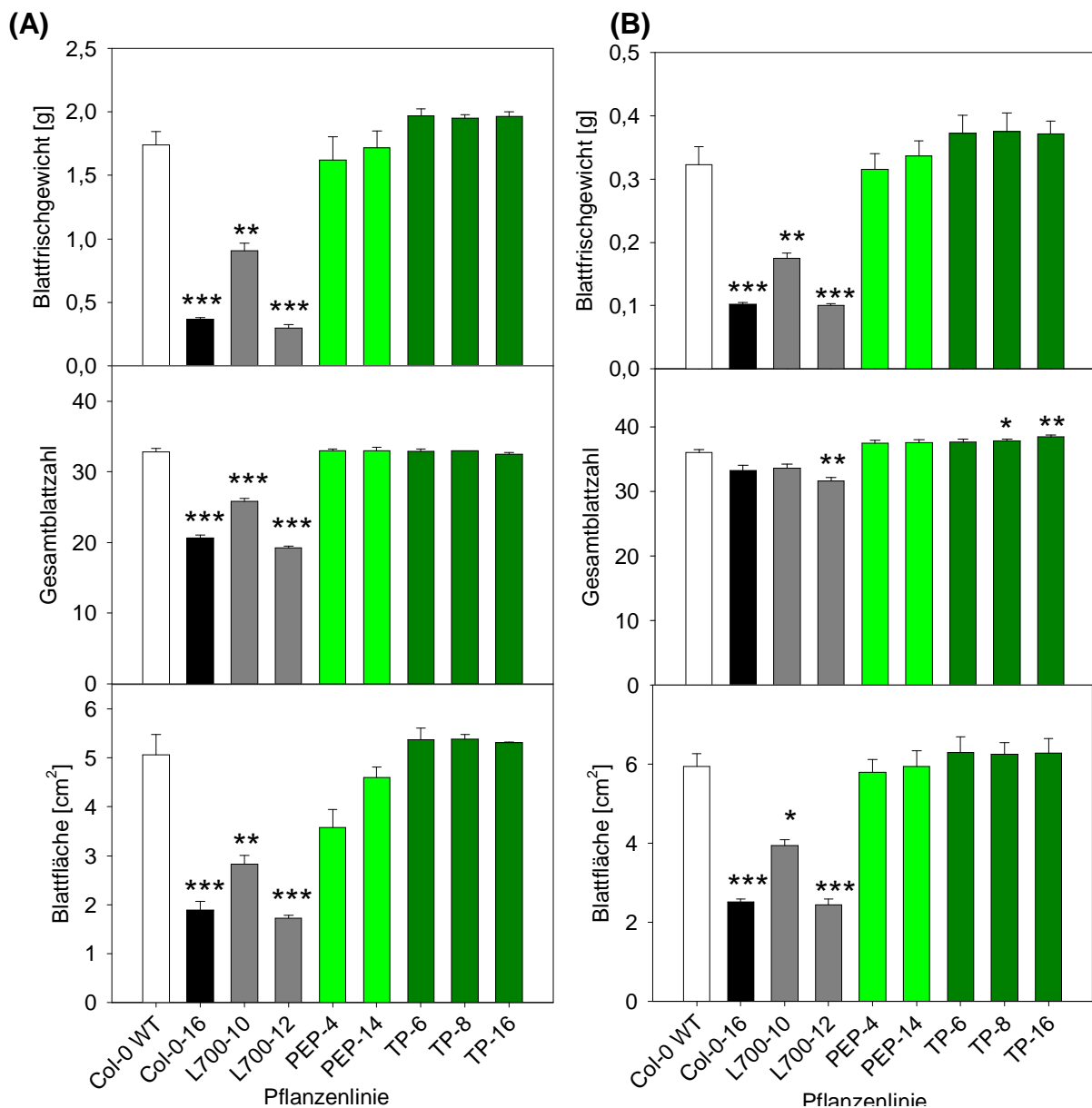


Abbildung 3-23: Analyse der vegetativen (A) und generativen Blattbiomasse (B) in konstitutiv (Col-0-16) sowie spezifisch in chloroplastenhaltigen (L700), Geleitzell- (PEP) und Bündelscheidenzellen (TP Δ) MP17:GFP-exprimierenden Linien im Vergleich zur Wildtyp (WT)-Kontrolle

Aufgeführt sind Blattfrischgewicht, Gesamtblattzahl und über zwei Blätter pro Pflanze gemittelte Blattfläche. Zur Bestimmung der vegetativen Blattbiomasse wurden die Pflanzen 6 Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert (A). Die generative Blattbiomasse wurde zu Beginn der Sprossbildung untersucht, nachdem die Pflanzen nach 6 Wochen Kurztag unter Langtagbedingungen transferiert und für ca. zwei Wochen unter Langtag kultiviert wurden (B). Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler von 5 Pflanzen je Linie. Unter Verwendung des Student's t-Test wurde die Verschiedenheit zur jeweiligen WT-Kontrolle bestimmt. Signifikante Unterschiede sind als * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ angegeben.

Die Analyse der oberirdischen Biomasse während der vegetativen Wachstumsphase offenbarte, dass das Blattfrischgewicht in L700-12 mit dem höchsten MP17:GFP-Proteingehalt lediglich 17% vom WT-Niveau erreichte, während Col-0-16 21% des WT-Blattfrischgewichtes ausbildete. Damit war es in beiden Linien aufgrund einer

deutlich geringeren Blattzahl bei gleichzeitig wesentlich kleineren Blättern statistisch signifikant reduziert. Ähnlich den konstitutiv exprimierenden Linien müssen auch in L700-12 die einzelnen Blätter signifikant leichter gewesen sein, denn die Blattzahl war auf 58% reduziert, während die Blattflächen 34% vom WT betrogen. An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass der optische Eindruck einer drastischeren Verminderung im vegetativen Wachstumsverhalten von L700-12 als in Col-0-16 damit bestätigt werden konnte.

In Übereinstimmung mit der in den konstitutiv exprimierenden *Arabidopsis*-Linien beobachteten strikten Dosisabhängigkeit vom MP17:GFP-Proteinlevel war das Wachstum der Linie L700-10, deren MP17:GFP-Expressionsniveau 95% von der Referenzlinie Col-0-16 erreichte, deutlich aber nicht so stark gehemmt. Das Frischgewicht der Rosettenblätter war auf 52% der WT-Kontrolle reduziert und stand gleichfalls mit einer signifikanten Abnahme von Blattzahl, -fläche und -gewicht in Zusammenhang. Das minimal, aber nicht statistisch signifikant geringere Blattfrischgewicht der beiden PEP-Linien 4 und 14 (93% und 98%) konnte entsprechend der vegetativen Blattbiomasseanalyse auf etwa 20% kleinere Blätter zurückgeführt werden, während in der Gesamtblattzahl keine Unterschiede zur WT-Kontrolle auftraten. Somit müssen die Blätter in diesen Linien mindestens so schwer sein wie im WT.

Im Gegensatz dazu deutete sich an, dass die drei Bündelscheiden-spezifisch MP17:GFP-exprimierenden TP Δ -Linien tendenziell mehr Blattbiomasse (113%, 112% und 113%) produzierten als die entsprechende WT-Kontrolle. In der statistischen Analyse erwies sich diese Zunahme im Blattfrischgewicht jedoch nicht als signifikant. In Anlehnung an vorherige Biomasseanalysen wurde anschließend die oberirdische Blattbiomasse im generativen, induktiven Entwicklungsstadium zu Beginn der Sprossbildung untersucht. Zu diesem Zweck wurden die verbliebenen Pflanzen unmittelbar darauf unter Langtagbedingungen transferiert.

Wie bereits von den konstitutiv MP17:GFP-exprimierenden Linien bekannt, näherte sich die Anzahl der Blätter von L700-10 und L700-12 etwa zwei Wochen nach Transfer weitestgehend dem WT-Niveau an (s. Abb. 3-23 B). Auch die Blattzahl der PEP-Linien blieb weiterhin gegenüber dem WT unverändert. Lediglich in den TP Δ -transgenen Linien zeichnete sich eine leichte Zunahme der Gesamtblattzahl im Vergleich zum WT ab, die für TP Δ -8 und TP Δ -16 signifikant war.

Jedoch blieben die spezifischen Unterschiede der transgenen Linien in Fläche und Gewicht von zwei repräsentativen *source*-Blättern pro Pflanze auch während der generativen Wachstumsphase bestehen.

Die *source*-Blattfläche der Linien L700-10 und L700-12 mit MP17:GFP-Expression in chloroplastenhaltigen Zellen war signifikant auf 66% bzw. 41% im Vergleich zur WT-Kontrolle reduziert, was auch zu einer Abnahme des Gewichtes auf 54% bzw. 31% führte. Parallel mit dem Anstieg in der Gesamtblattzahl während der generativen Wachstumsphase würde sich in diesen Linien, analog zu den ektopisch MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen, eine geringere Reduktion im Gesamtfrischgewicht der oberirdischen Biomasse ergeben als im vegetativen Stadium. Es fiel auf, dass das Wachstum in der stärker exprimierenden Linie L700-12 im generativen Entwicklungsstadium, im Gegensatz zur vegetativen Biomasseproduktion, um den gleichen Faktor gehemmt war wie in Col-0-16.

Während dessen war in den PEP-Linien 4 und 14 mit MP17:GFP-Expression in Geleitzellen kein Unterschied gegenüber der WT-Kontrolle zu detektieren.

Dagegen war die Blattgröße der Bündelscheiden-spezifisch MP17:GFP-exprimierenden Linien TP Δ -6, -8 und -16 gegenüber dem WT um 15%, 16% bzw. 15% erhöht, deren Frischgewicht ebenfalls größer war als in der Kontrolle. Gemeinsam mit der Erhöhung der Blattzahl zeichnet sich für diese Linien eine größere Zunahme der generativen Gesamtblattbiomasse als dem vegetativen Blattfrischgewicht nach 6 Wochen Kurztagbedingungen ab.

Im Anhang IV ist die Übersicht der vegetativen und generativen Biomasseproduktion vom beschriebenen Datenset 3 und der anderen beiden unabhängigen Anzuchten dargestellt.

3.4.5.2 Untersuchungen zum Blühinduktionszeitpunkt und Ernteindex

Da die Ausbildung von Spross und Blütenstand ein charakteristisches Merkmal der generativen Wachstumsphase ist, wurde in diesem Zusammenhang der Blühinduktionszeitpunkt der Zell-spezifisch MP17:GFP-exprimierenden Pflanzen durch Auszählen der Tage unter Langtagbedingungen im Gewächshaus bis zum Öffnen der ersten Blüte am Haupt spross bestimmt.

In Abb. 3-24 ist dargestellt, dass die Induktion des Blühzeitpunktes der Linien L700-10 und L700-12 mit detektierbarem MP17:GFP-Protein im Western-Blot signifikant

um einen und acht Tage gegenüber der WT-Kontrolle verzögert war. Dabei scheint auch das Blühverhalten von der MP17:GFP-Dosis abhängig zu sein, denn mit zunehmender Expressionsstärke blühten diese transgenen Linien später.

Während dessen zeigten die PEP-Linien ein ähnliches Blühverhalten wie der WT und der Blühzeitpunkt der Bündelscheiden-spezifischen TP Δ -Linien war statistisch signifikant um etwa drei Tage im Vergleich zur WT-Referenz vorverlegt.

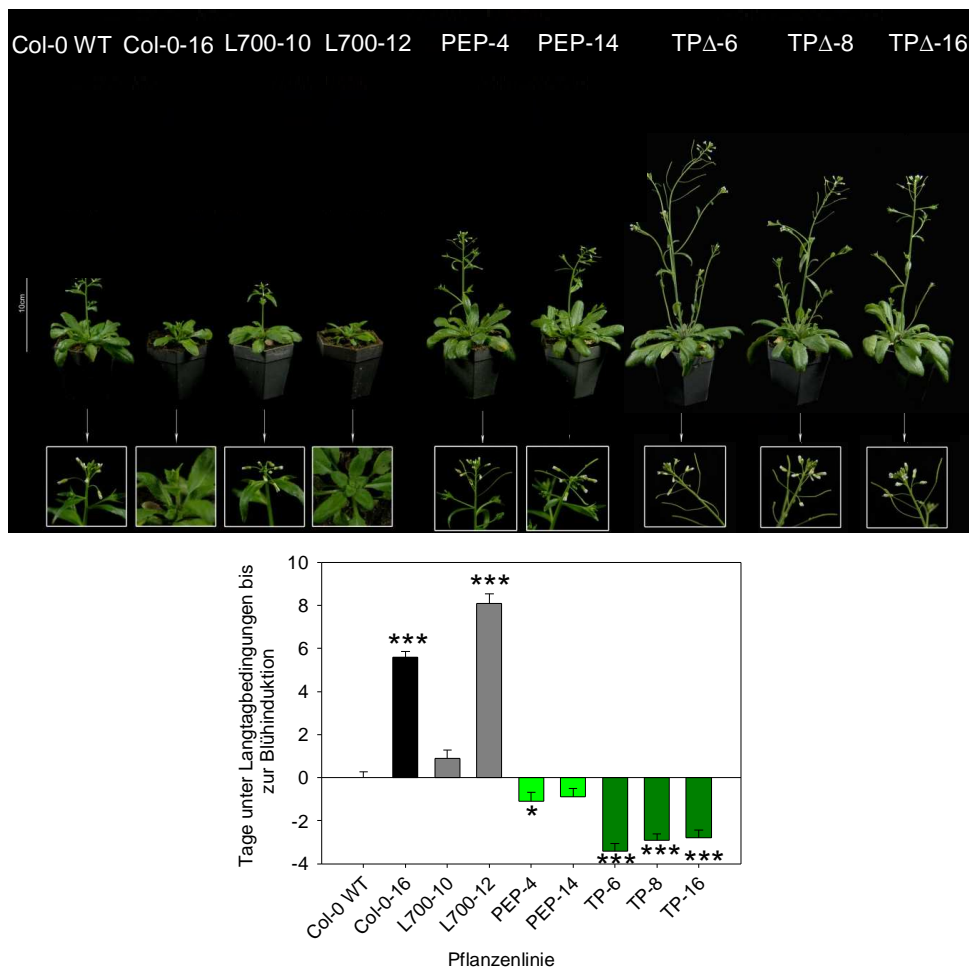


Abbildung 3-24: Blühverhalten MP17:GFP-transgener *Arabidopsis*-Linien des Ökotyps Columbia (Col-0) unter Kontrolle der Promotoren ST-LS1 (L700), AtSUC2 (PEP) und TP Δ im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (WT) und Referenzlinie Col-0-16

Die Pflanzen wurden 6 Wochen unter Kurztag angezogen, anschließend unter Langtagbedingungen transferiert und die Anzahl der Tage unter Langtag bis zum Öffnen der ersten Blüte ermittelt. Der Blühphänotyp ist 14 Tage nach Transfer unter Langtag dokumentiert. Der Hauptspross wurde heraus vergrößert und der Größenmaßstab gibt 10 cm an. Im Diagramm ist die Differenz des Blühinduktionszeitpunktes im Verhältnis zum WT als Mittelwert \pm Standardfehler von 10 Pflanzen pro Linie angegeben (Col-0 WT = 12 Tage unter Langtag bis Blühinduktion).

Ähnlich den konstitutiv MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien der Ökotypen Col-0, *Ler* und C24 war der Blühinduktionszeitpunkt der Linien mit Zell-spezifischer MP17:GFP-Expression damit ebenfalls verschoben. Diese Ergebnisse ließen auch

hier vermuten, dass neben der Auswirkung von MP17:GFP-Proteingehalt und -Expression in ausgewählten Zellen auf Kohlenhydratverteilung und Biomasseproduktion auch die reproduktive Leistung verändert sein könnte. Aus diesem Grund wurde der Samenertrag von 5-10 Pflanzen pro transgener Linie und WT bestimmt, die vollständig seneszent waren und nach 6 Wochen unter Kurztag bis zur Ernte unter Langtag kultiviert wurden.

Wie in Abb. 3-25 gezeigt, konnte für die Linien L700-10 und L700-12 mit MP17:GFP-Expression in chloroplastenhaltigen Zellen ebenfalls ein Anstieg im Samenertrag gegenüber der WT-Referenz um 8% bzw. 15% nachgewiesen werden, der laut statistischer Analyse jedoch nicht signifikant war. Dennoch zeichnete sich die Tendenz ab, dass die Samenproduktion der schwächer exprimierenden Linie L700-10 geringer war als in Col-0-16 und mit dem Proteingehalt von Col-0-16 ein oberer Schwellenwert für den Samenertrag erreicht sein könnte, da in L700-12 mit einem 30% höheren Expressionsniveau als in Col-0-16 kein weiterer Anstieg in der reproduktiven Leistung gefunden werden konnte. Für die Verifizierung des erhöhten Samenertrages wurde das 100-Samengewicht von je 5 Pflanzen pro Linie bestimmt. Hierbei wurde für alle Linien kein größerer Unterschied zur WT-Kontrolle entdeckt. Das Auszählen der Schoten pro Pflanze offenbarte eine ähnlich leichte Abnahme in den transgenen Linien Col-0-16 und L700-12 mit dem höchsten MP17:GFP-Proteingehalt auf 496 bzw. 493 im Verhältnis zu 516 vom WT, während die Schotenzahl der schwächer exprimierenden L700-10 mit 514 nicht betroffen war. Aus diesem Grund stieg die rechnerisch ermittelte durchschnittliche Anzahl von Samen pro Schote, die aus Mittelwert von 100-Samengewicht, Gesamtamenertrag und Schotenzahl berechnet wurde, von etwa 12 in der Col-0 WT-Kontrolle auf 15 in Col-0-16, 13 in L700-10 und 15 in L700-12 an.

Der Anstieg im Trockengewicht der seneszenten Pflanzen von L700-10 und L700-12 auf 61% bzw. 42% der WT-Biomasse im Vergleich zu 58% bzw. 17% vegetativer Biomasse ließ teilweise die Kompensation der drastischen Hemmung des vegetativen Wachstums während des generativen Entwicklungsstadiums erkennen. Dennoch führten der Anstieg im Samenertrag und die geringere Biomasseproduktion der beiden L700-Linien zu einer erheblichen Erhöhung des Ernteindex um das 1,7- und 2,6-fache im Vergleich zur WT-Referenz.

Im Gegensatz dazu traten in den beiden PEP-Linien 4 und 14, in Übereinstimmung mit den Untersuchungen zum Kohlenhydratstatus sowie vegetativer und generativer

Blattbiomasseproduktion, auch bei Ertragsparametern und Ernteindex keine Unterschiede im Vergleich zur WT-Kontrolle auf.

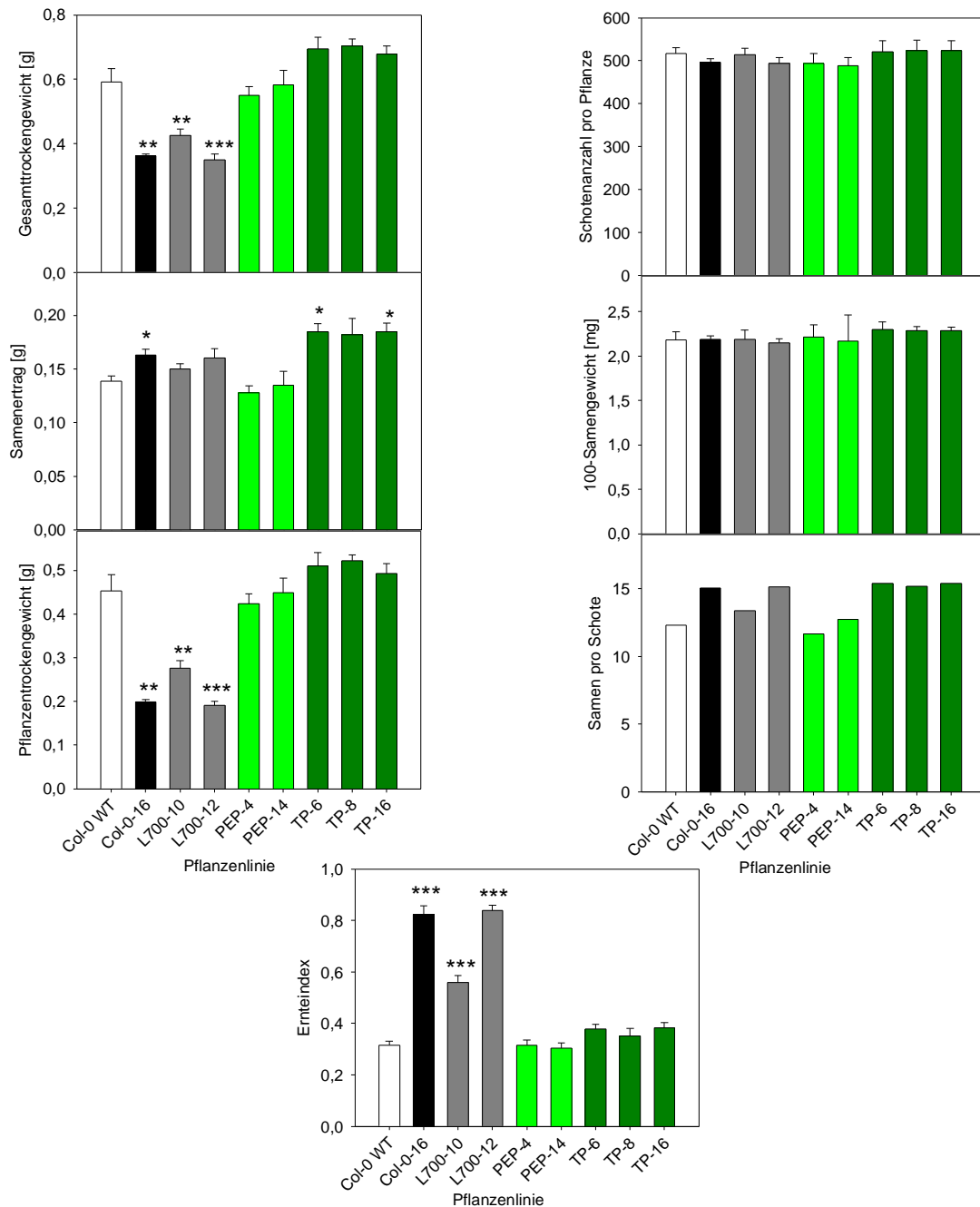


Abbildung 3-25: Analyse der Ressourcenverteilung zum Erntezeitpunkt von *Arabidopsis*-Linien des Ökotyps Columbia (Col-0) mit MP17:GFP-Expression in chloroplastenhaltigen (L700), Geleit- (PEP) und Bündelscheidenzellen (TP Δ) im Vergleich zur Wildtyp (WT)-Kontrolle und konstitutiv exprimierenden Col-0-16

Die Untersuchungen wurden mit jeweils 5-10 Pflanzen pro Linie durchgeführt. Das Auszählen der Schotenanzahl erfolgte an Pflanzen, deren Blüten in den Samenstand übergegangen waren und zum Zeitpunkt der Ernte waren die Pflanzen vollständig seneszent. Es sind Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die Verschiedenheit zur WT-Kontrolle wurde mittels Student's t-Test bestimmt. Signifikante Unterschiede sind als * P < 0,05, ** P < 0,01 und *** P < 0,001 gekennzeichnet.

Hingegen konnte der deutlich erhöhte Samenertrag der TP Δ -Linien auf einen leichten Anstieg der Schotenzahl pro Pflanze und des 100-Samengewichtes zurückgeführt werden, welche sich in der statistischen Analyse nicht als signifikant erwiesen. Weiterhin zeichnete sich bei der Berechnung der gebildeten Samen pro Schote eine Erhöhung von 12 in der WT-Kontrolle auf etwa 15 in den TP Δ -MP17:GFP-transgenen Pflanzen ab, und wies damit ein vergleichbares Niveau wie in den konstitutiv und Chloroplasten-spezifisch MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien auf. Es fiel außerdem auf, dass die TP Δ -Linien einen erheblicheren und signifikanteren Anstieg in der reproduktiven Leistung zeigten als die konstitutiv MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen. Aufgrund des gleichzeitig etwas höheren Pflanzentrockengewichtes als im WT manifestierte sich der Anstieg im Samenertrag jedoch nur in einer leichten Zunahme im Ernteindex.

Im Anhang IV ist die Übersicht der reproduktiven Leistung des beschriebenen Datensets 3 und der anderen beiden unabhängigen Anzuchten zusammengefasst.

3.4.6 Entwicklungsspezifische Saccharosetransportraten

Zur Verifizierung, ob in den Zell-spezifisch MP17:GFP-exprimierenden Col-0-Linien ein ähnlicher Zusammenhang zwischen MP17-vermitteltem Einfluss auf Biomasseproduktion und Assimilatverteilung besteht wie in den konstitutiv exprimierenden Linien, wurden die Saccharoseexportraten ermittelt.

Von jeweils 10 abgetrennten ausgewachsenen *source*-Blättern pro Linie wurden im vegetativen (6 Wochen Kurztag), generativen (6 Wochen Kurztag und etwa zwei Wochen Langtag) und beginnenden seneszenten Blattentwicklungsstadium (6 Wochen Kurztag und etwa drei Wochen Langtag) die Saccharosekonzentrationen im Phloemexudat nach 1, 2, 4 und 6 Stunden gemessen.

Abb. 3-26 zeigt, dass die Saccharosegehalte der phänotypischen Linien L700-10 und L700-12 in Übereinstimmung mit der geringeren vegetativen Blattbiomasseproduktion nach 6 Stunden Exudationszeit um 42% bzw. 71% niedrigerer waren als in der WT-Kontrolle. In den Geleitzell-spezifisch MP17:GFP-exprimierenden Linien PEP-4 und PEP-14 traten hingegen keine offensichtlichen Unterschiede im Saccharoseefflux im Vergleich zum WT auf. Bei Bündelscheiden-spezifischer Expression in den Linien TP Δ -6, -8 und -16 waren entsprechend der leicht erhöhten

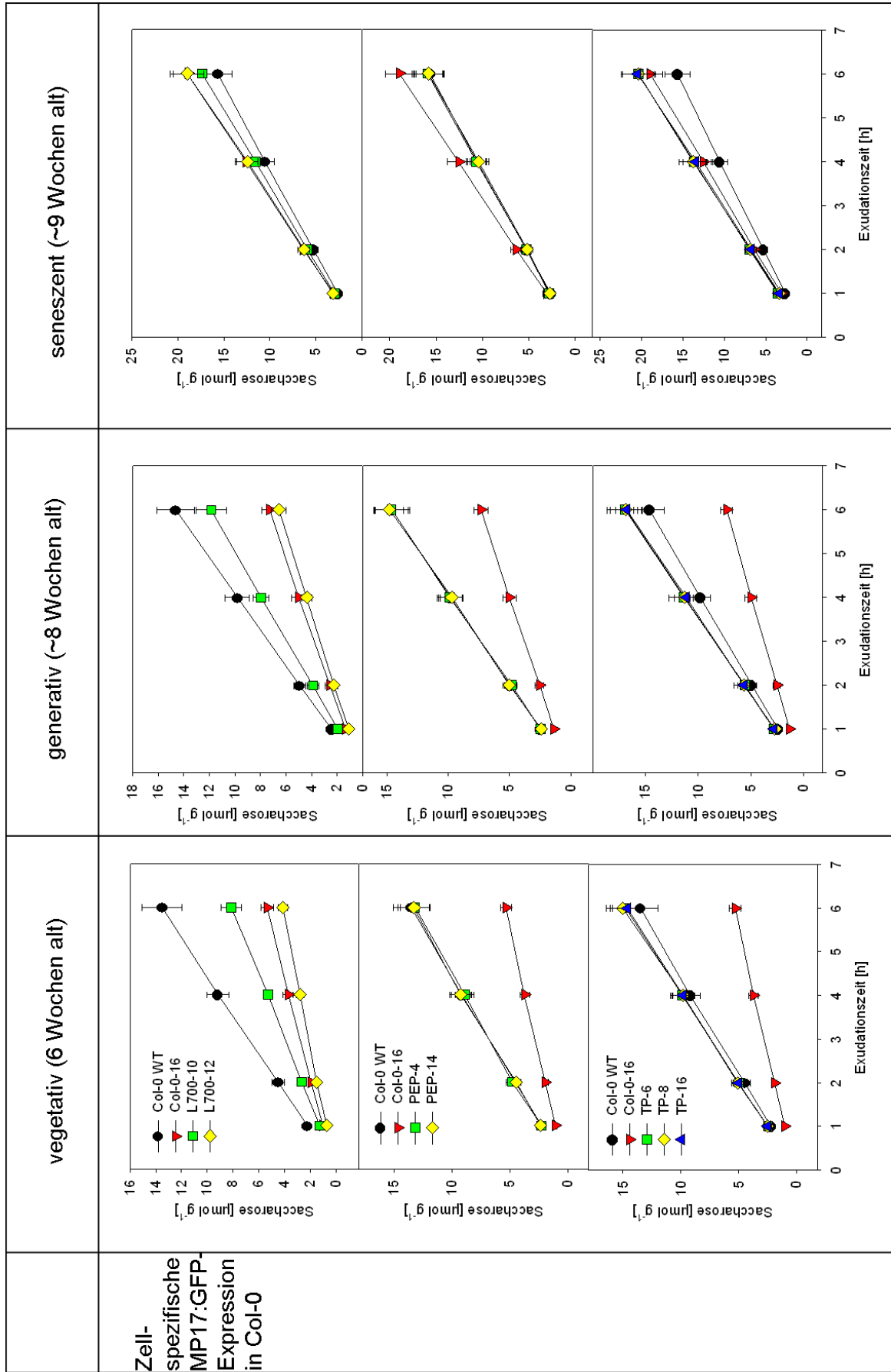


Abbildung 3-26: Saccharoseefflux von *source*-Blättern transgener *Arabidopsis*-Linien mit MP17:GFP-Expression in chloroplastenhaltigen Zellen (L700), Geleitzellen (PEP) und Bündelscheidenzellen (TPΔ) im Vergleich zur jeweiligen WT-Kontrolle

Die Phloemexudate wurden von jeweils 10 ausgewachsenen Blättern pro Linie im vegetativen (6 Wochen Kurztag), generativen (6 Wochen Kurztag und etwa zwei Wochen Langtag) und beginnenden seneszenten Blattentwicklungsstadium (6 Wochen Kurztag und etwa drei Wochen Langtag) gesammelt. Die Saccharosegehalte wurden nach 1, 2, 4 und 6 h Exudationszeit ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

vegetativen Blattbiomasse tendenziell angestiegene Saccharosekonzentrationen (106%, 109% und 105%) zu detektieren.

Zu Beginn der reproduktiven Phase nach zwei Wochen Kultivierung unter Langtagbedingungen stiegen die Saccharosegehalte der TPΔ-Linien auf etwa 115% des WT-Niveaus an (s. Abb. 3-26, generativ) bis sie nach einer weiteren Woche unter blühinduzierenden Anzuchtbedingungen 30% höher waren als in der WT-Kontrolle (s. Abb. 3-26, seneszent). Gleichzeitig waren sie gegenüber der Col-0-16-Referenzlinie um ungefähr 10% erhöht. Ein ähnlicher Anstieg im Saccharoseefflux war in den im Wachstum gehemmten Linien L700-10 und L700-12 zu beobachten. Nachdem die Pflanzen unter Langtagbedingungen transferiert und für zwei Wochen kultiviert wurden betrug die Saccharosekonzentration im Phloemexudat der phänotypischen Linien 80% bzw. 46% vom WT-Gehalt (Abb. 3-26, generativ). Im beginnenden seneszenten Blattstadium erreichten die Saccharosekonzentrationen 103% für L700-17 und 120% für L700-12 im Vergleich zum WT

3.5 Charakterisierung von *Arabidopsis*-Mutanten mit Defekten in putativen Pflanzenrezeptoren des PLRV-MP17

Die konstitutive und induzierbare Expression von MP17 in transgenen Tabakpflanzen (Herbers *et al.*, 1997; Hofius *et al.*, 2001; Hofius, 2003) als auch die konstitutive und spezifische MP17-Expression in *Arabidopsis*-Pflanzen (Hofius, 2003; eigene Arbeiten) und darüber hinaus anderer viraler MPs in transgenen Pflanzen (Balachandran *et al.*, 1995; Olesinski *et al.*, 1995; Shalitin *et al.*, 2002; Rinne *et al.*, 2005) belegte ihren spezifischen Einfluss auf PDs, Assimilattransport und *sink/source*-Beziehungen. Da sich ein komplexes System der Pflanze-MP-Interaktion andeutete, die sich in Abhängigkeit von der MP17-Dosis und -Expression in spezifischen Zellen und Geweben unterscheidet, können die zugrunde liegenden

Mechanismen nur über die Identifizierung der/des pflanzlichen Bindungspartner(s) aufgeklärt werden.

In diesem Zusammenhang gibt die Lokalisierung von MP17 (Schmitz *et al.*, 1997; Hofius *et al.*, 2001; eigene Arbeiten) und TMV-MP30 (Tomenius *et al.*, 1987; Aktins *et al.*, 1991; Ding *et al.*, 1992) an plasmodesmalen Zellwandbereichen einen Hinweis auf die Bindung viraler MPs an Plasmodesmenstrukturen. In der Tat wurde an Hand der Identifizierung eines Rezeptors, der die Translokation des Transkriptionsfaktors Knotted 1 bewerkstelligt, ein universaler plasmodesmaler Bindungspartner für den Transport von endogenen Molekülen und viralen MPs durch PDs gleichermaßen vorgeschlagen (Kragler *et al.*, 1998). Dennoch konnten trotz zahlreicher biochemischer und genetischer Ansätze bisher keine plasmodesmalen MP-Interaktoren identifiziert werden.

Am besten untersucht ist das Transportprotein MP30 des TMV. Hierfür wurden Interaktionen mit Komponenten des Zytoskeletts und Endoplasmatischen Retikulums (Heinlein *et al.*, 1995; McLean *et al.*, 1995; Heinlein *et al.*, 1998; Dorokhov *et al.*, 1999; Reichel und Beachy, 1999; Chen *et al.*, 2000; Boyko *et al.*, 2000) nachgewiesen, die eher für den Transport von MPs innerhalb der Zelle zur Peripherie hin verantwortlich sind.

Auch für das MP17 des Phloem-limitierten PLRV konnten bisher weder mittels Pull down und Overlay Assay (Paap, 2002) noch über Hefe-Zwei-Hybrid (Hofius, 2003) pflanzliche, plasmodesmale Bindungspartner identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde von Dr. D. Hofius ein genetischer Ansatz zur Identifizierung von Mutanten mit veränderten plasmodesmalen Bindungs- und Transporteigenschaften und damit zur Isolierung putativer pflanzlicher MP17-Interaktionspartner entwickelt (Hofius, 2003). Da die Expression von MP17 in *Arabidopsis* zu ähnlichen phänotypischen Änderungen führte wie in transgenen Tabaklinien, wurden vergleichbare Wirkmechanismen des MP17-Proteins auf plasmodesmale Funktion und Assimilattransport sowie konservierte endogene Interaktionspartner von MP17 bei verschiedenen Pflanzenspezies postuliert (Hofius, 2003). Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass vergleichbare MP17-vermittelte Effekte in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen verschiedener Ökotypen zu beobachten waren (eigene Arbeiten).

Somit stand die Modelnpflanze *Arabidopsis* als genetisches System zur Verfügung und die phänotypische Linie Col-0-16 diente als Ausgangslinie für die chemische

Samenmutagenese mittels Ethylmethansulfonat (EMS). Chemische Mutagene wie EMS erzeugen mit hohen Mutationsraten vorrangig Einzelbasenaustausche, die eine Änderung und nicht den Verlust der Funktionalität eines kodierenden Proteins begünstigen. Die daraus resultierenden veränderten Bindungs- und Transporteigenschaften des plasmodesmalen MP17-Interaktionspartners würden die Aufhebung der plasmodesmalen Bindung und/oder der MP17-induzierten Assimilatakkumulation bedingen und könnten somit über die Reversion der Wachstumsretardierung identifiziert werden.

Diese sogenannten Suppressormutanten wurden in 24 Parentalgruppen (PG) auf Revertanten mit einem WT-ähnlichen Wuchs durchmustert. Auf diese Weise konnten 31 putative MP17-Suppressormutanten isoliert werden, die in der vorliegenden Arbeit molekular, biochemisch, physiologisch, zellbiologisch und genetisch charakterisiert werden sollten.

3.5.1 Molekulare Charakterisierung der MP17-Suppressormutanten

Aufgrund einer Primärcharakterisierung, die über Fluoreszenz-, Northern- und Western-Analyse erfolgte, wurden die MP17:GFP-Mutanten in verschiedene Klassen eingeteilt (Hofius, 2003).

Die identifizierten M2-Revertanten wurden von Dr. D. Hofius erhalten und der Schwerpunkt auf 10 Mutanten gelegt, wobei mehrere Vertreter aus jeder Kategorie ausgewählt wurden. Zwei der Mutanten zeichneten sich durch keine bzw. kaum nachweisbare *MP17:GFP*-RNA aus. Sie werden nachfolgend mit PG nr bezeichnet. Weiterhin akkumulierten zwei der MP17-Revertanten nur *MP17*-Transkript. Sie zählen zur Klasse I und werden im Folgenden mit PG r bezeichnet. Darüber hinaus war in vier der ausgewählten Mutanten, die in Klasse II (PG p) zusammengefasst sind, neben spezifischem *MP17:GFP*-Transkript auch Protein detektierbar. Aus der Kategorie III (PG f) wurden zwei Transkript- und Fusionsprotein-akkumulierende Mutanten, die punktuelle GFP-Fluoreszenz im Zellwandbereich zeigten, gewählt. Ihre GFP-Lokalisierung gibt einen Hinweis darauf, dass MP17:GFP in diesen Suppressormutanten weiterhin mit PDs assoziieren kann.

Zur Überprüfung der Stabilität der Mutationen wurden die M2-Revertanten geselbstet und der Suppressorphänotyp in der M3-Generation mit je 15 Individuen verifiziert.

Die Charakterisierung der Mutanten erfolgte parallel zur nicht-transgenen WT-

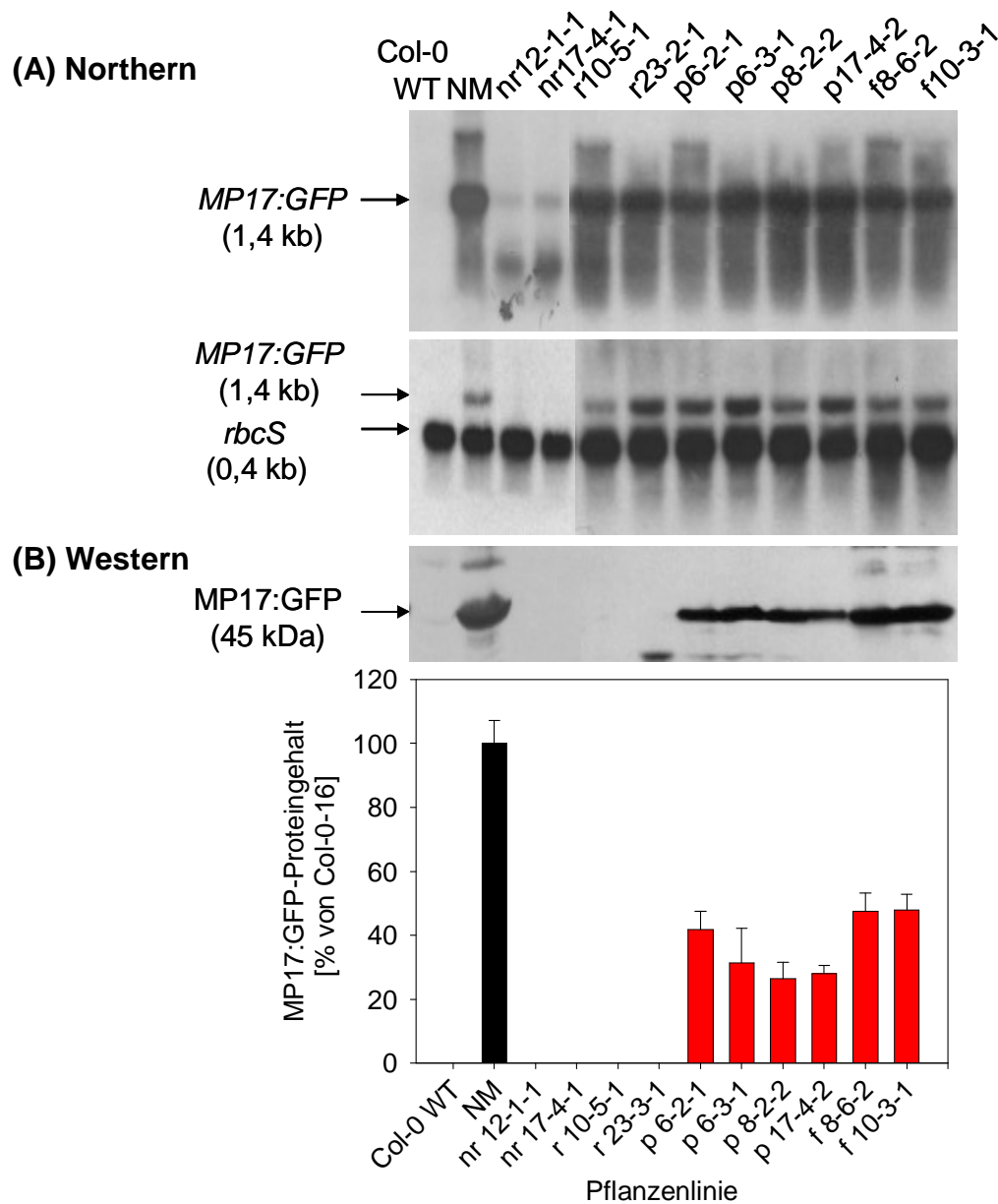


Abbildung 3-27: Expressionsanalyse von MP17-Suppressormutanten im Vergleich zur nicht transformierten WT-Kontrolle und nicht-mutagenisierter Linie Col-0-16 (NM)

(A) Northern-Analyse von *MP17:GFP*-spezifischen Transkripten. Gesamt-RNA wurde aus *source*-Blattmaterial isoliert und 30 µg pro Spur aufgetragen. Der Northern-Blot wurde mit einer *MP17*-spezifischen Sonde hybridisiert. Zur Überprüfung der Beladung erfolgte eine zusätzliche Beprobung mit *rbcS*-cDNA.

(B) Western-Analyse und Quantifizierung der *MP17:GFP*-Proteinakkumulation. Auf jede Spur wurden identische Mengen an Gesamtprotein (20 µg) aufgetragen und unter Verwendung eines polyklonalen anti-*MP17*-Antiserums (1:5000 Verdünnung) sowie eines sekundären HRP-konjugierten IgG-Antikörpers (1:100000) analysiert. Zur Normalisierung der *MP17*-spezifischen Signale wurden die Immunoblots mit polyklonalem anti-Transketolase- (TK) Antikörper beprobt. Die Quantifizierung der *MP17*-Proteinmenge wurde mit 5 Pflanzen pro Linie durchgeführt. Die Werte sind in Prozent bezogen auf die Referenzlinie Col-0-16 als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben.

Kontrolle und nicht-mutagenisierten, konstitutiv MP17:GFP-exprimierenden Linie Col-0-16 (NM). Zunächst wurde die Akkumulation von *MP17:GFP*-spezifischen Transkripten mittels Northern-Analysen untersucht. Wie in Abb. 3-27 A für je einen Vertreter der Mutanten dargestellt, war bei den beiden Revertanten PG nr 12-1-1 und PG 17-4-1 kaum *MP17:GFP*-spezifische RNA detektierbar. Stattdessen wiesen sie einen „Schmier“ auf, der mit ribosomalen Banden assoziiert zu sein schien. Diese Hybridisierungssignale lassen weiterhin eine mutationsbedingte Transkriptinstabilität vermuten, so dass sie weder MP17-Protein noch GFP-Fluoreszenz zeigen können.

Die anderen 8 Suppressormutanten zeigten dagegen ein spezifisches *MP17:GFP*-Signal von vergleichbarer Intensität wie die nicht-mutagenisierte Parentallinie NM. In der Western-Analyse (s. Abb. 3-27 B) ließ sich, in Übereinstimmung mit der früheren Charakterisierung, bei PG r 10-5-1 und PG r 23-2-1 mittels MP17-Antikörper kein Fusionsprotein detektieren. Lediglich bei Mutanten der Klasse II und III war MP17-Protein in der erwarteten Laufrhöhe von 45 kDa nachzuweisen. Da der Eindruck entstand, dass die spezifischen Proteinsignale der einzelnen Mutanten eine unterschiedliche Intensität aufwiesen und um aufzuklären, ob eine kritische Menge an MP17:GFP-Protein zur lokalisierbaren GFP-Fluoreszenz notwendig ist, wurde der MP17:GFP-Proteingehalt bezogen auf die nicht-mutagenisierte Referenzlinie NM, wie in Abschn. 3.1.1 beschrieben, von jeweils 5 Pflanzen quantifiziert. Dabei offenbarte sich, dass die Suppressormutanten PG p 8-2-2 und PG p 17-4-2 mit 26% und 28% das niedrigste MP17-Proteinexpressionsniveau aufwiesen. Der MP17:GFP-Proteingehalt von PG p 6-2-1 und PG p 6-3-1 betrug 42% bzw. 32%. Interessanterweise erreichten die Linien PG f 8-6-2 und PG f 10-3-1 aus der Klasse III mit jeweils 47% die höchste MP17-Proteinmenge, die im Vergleich zu den anderen MP17-Protein akkumulierenden Mutanten gegenüber der Referenzlinie lediglich um den Faktor 0,53 erniedrigt war.

Ein weiterer Aspekt bestand in der Überprüfung der Plasmodesmenspezifität des MP17:GFP-Fusionsproteins in den Suppressormutanten im Vergleich zur nicht-mutagenisierten Kontrolle NM mittels Fluoreszenzmikroskopie. Entgegen früherer Lokalisierungen am CLSM (Hofius, 203) waren bei PG p 6-2-1 und PG p 6-3-1 sehr vereinzelte GFP-Markierungen zu beobachten. Sie traten ausschließlich in Zellwandbereichen von Epidermiszellen auf, welche die Trichombasiszelle strahlenförmig umgeben (s. Abb. 3-28). Die anderen Mutanten stimmten mit der früheren Fluoreszenz-Analyse überein.

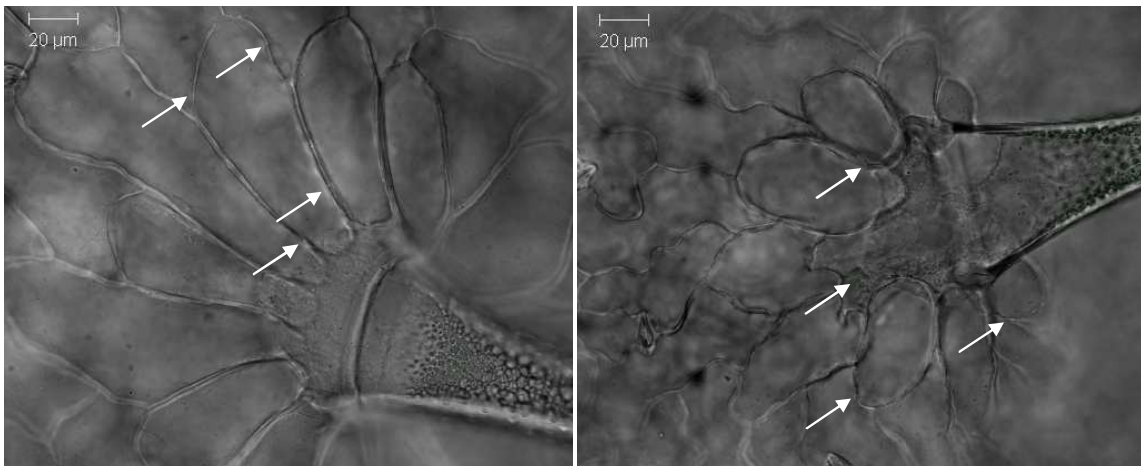


Abbildung 3-28: GFP-Fluoreszenz in der Epidermis von PG p 6-2-1 und PG p 6-3-1

Punktuelle Dekorierung am Zell-zu-Zell-Kontakt zwischen Epidermiszellen, die an Trichombasiszellen angrenzen. Aber keine Markierung der Zellwand zwischen *source*-Epidermiszellen. Die Pfeile markieren GFP-Signale und der Größenmaßstab gibt 20 µm an.

Auf Basis dieser molekularen Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass die ausgewählten EMS-mutagenisierten MP17-Revertanten stabile Mutationen tragen und für die nachfolgenden Analysen geeignet sind.

3.5.2 Reversion des MP17-induzierten Phänotyps in den MP17:GFP-Mutanten

Wie oben beschrieben, unterschieden sich die Suppressormutanten in ihren molekularbiologischen Eigenschaften deutlich von der NM-Kontrolllinie. Da die Dosis-abhängige MP17-Expression einen wesentlichen Einfluss auf Biomasse- und Samenproduktion zu haben scheint (Hofius *et al.*, 2001; eigene Arbeiten), wurden im nächsten Schritt die physiologischen Ausprägungen der MP17-Revertanten in Gegenüberstellung zu WT- und NM-Kontrolle analysiert.

Die in Abb. 3-29 A dargestellten Pflanzen, die 5 Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden, zeigen, dass die Rosettenblätter nicht mehr phänotypisch verändert waren wie in der transgenen Parentallinie NM. Um zu verifizieren, ob das WT-ähnliche Erscheinungsbild der Keimblätter mit einer Reversion der Photoassimilat-akkumulation einherging, wurden die Kohlenhydratgehalte von jeweils 8 Individuen

(A)

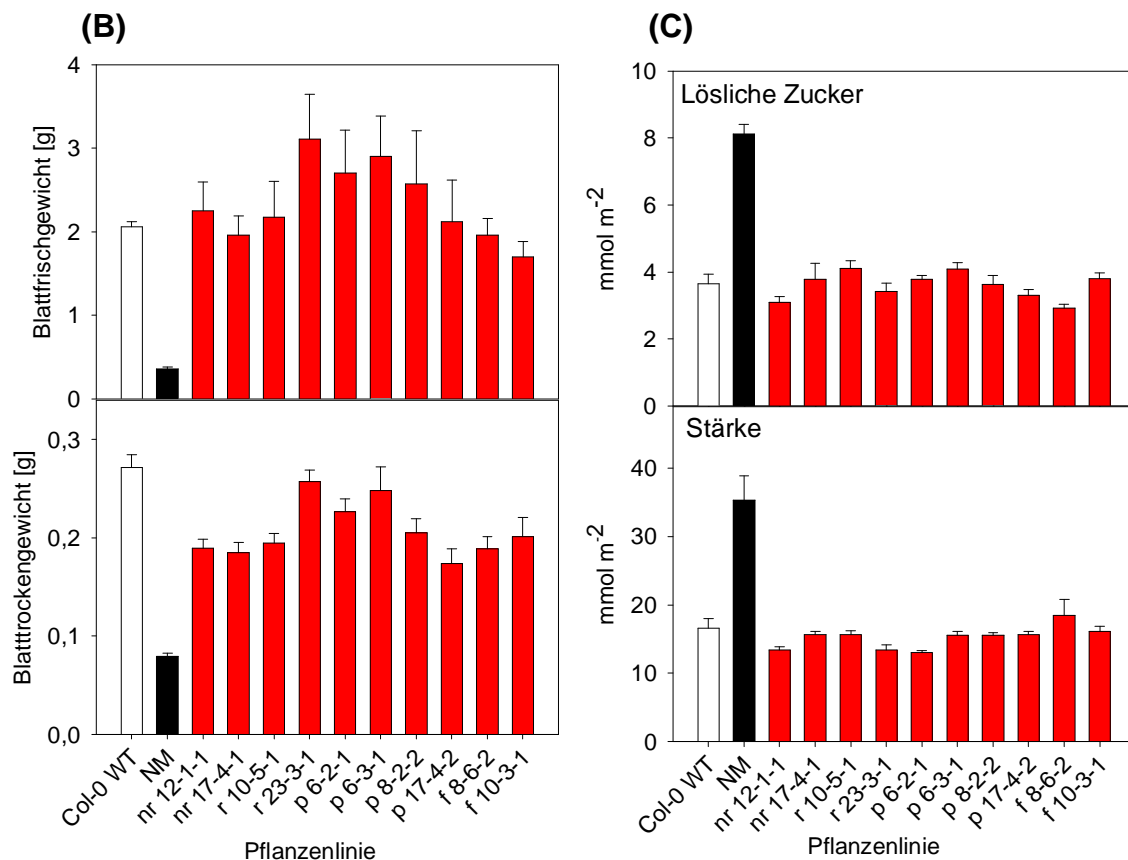
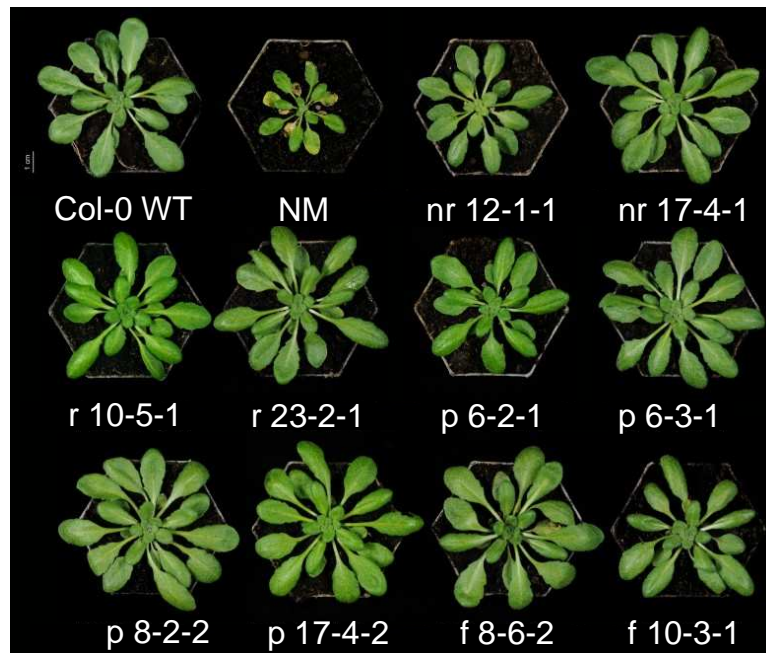


Abbildung 3-29: Phänotyp und Kohlenhydratgehalte von MP17-Revertanten im Vergleich zur nicht transformierten WT-Kontrolle und nicht-mutagenisierter Linie Col-0-16 (NM)

Unter (A) ist die Dokumentation nach 5 Wochen unter Kurztagbedingungen abgebildet. (B) fasst die die oberirdische Biomasse von je 13 Pflanzen zusammen, die 6 Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden. (C) zeigt die Kohlenhydratgehalte 5 Wochen alter Pflanzen. 8 Stunden nach Beginn der Lichtphase wurden Proben von jeweils zwei vollständig entwickelten *source*-Blättern pro Pflanze genommen. Es wurden lösliche Zucker und Stärke bestimmt. Die Daten wurden von jeweils 8 Pflanzen erhalten, wobei die beiden Werte von jeder Pflanze gemittelt wurden. In der Abbildung sind die Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

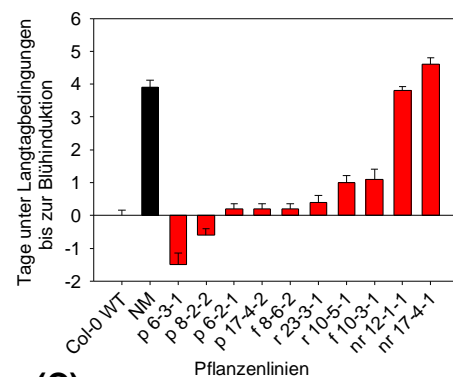
der 5 Wochen alten Pflanzen ermittelt. Tatsächlich lagen die Gehalte der MP17-Mutanten an löslichen Zuckern und Stärke im WT-Bereich und die Kohlenhydratakkumulation war entsprechend der Erwartung aufgehoben (s. Abb. 3-29 C).

Zur Verifizierung der Reversion der MP17-vermittelten Wachstumshemmung wurde von je 13 Pflanzen, die 6 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen wurden, die vegetative Blattbiomasse bestimmt (s. Abb. 3-29 B). Auch hier fiel auf, dass das Blattfrischgewicht aller MP17-Suppressormutanten WT-Niveau erreichte bzw. sogar größer war. Diese Aufhebung der Wuchsretardierung wurde durch Ermitteln des Trockengewichtes untermauert, wozu die vom Wurzelsystem abgetrennten Rosetten zwei Tage im Trockenschrank bei 50°C getrocknet wurden.

(A)



(B)



(C)

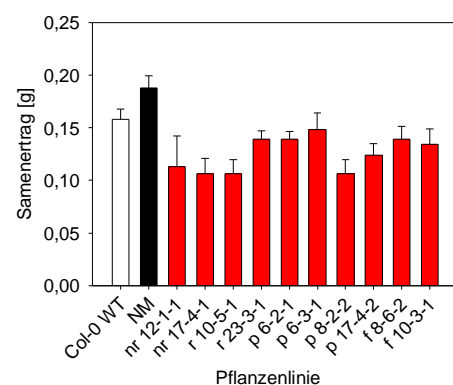


Abbildung 3-30: Blühverhalten und Samenertrag von MP17-Suppressormutanten im Vergleich zur nicht transformierten WT-Kontrolle und nicht-mutagenisierten Linie Col-0-16 (NM)

Die Pflanzen wurden 6 Wochen unter Kurztag angezogen, anschließend unter Langtagbedingungen transferiert und die Anzahl der Tage unter Langtag bis zum Öffnen der ersten Blüte ermittelt. Unter (A) ist die Dokumentation 12 Tage (oben) und 19 Tage (unten) nach Transfer unter Langtag abgebildet. Der Hauptspross wurde heraus vergrößert und der Größenmaßstab gibt 10 cm an. Unter (B) ist die Differenz des Blühinduktionszeitpunktes im Verhältnis zum WT von 10 Pflanzen pro Linie angegeben (Col-0 WT = 13,4 Tage unter Langtag bis Blühinduktion). (C) fasst die reproduktive Leistung von jeweils 6-12 vollständig seneszenten Pflanzen zusammen. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Die bereits beschriebenen Verschiebungen im Blühverhalten MP17-transgener *Arabidopsis*-Pflanzen konnten für die M3-Revertanten ebenfalls bestätigt werden. Für diese Analyse wurden die Pflanzen 6 Wochen unter Kurztag gehalten, anschließend unter Langtagbedingungen ins Gewächshaus transferiert und die Tage unter Langtag bis zum Öffnen der ersten Blüte am Hauptspross von jeweils 10 Pflanzen ausgezählt. Der Blühinduktionszeitpunkt von PG p 8-2-2 und PG p 6-3-1, den Mutanten mit dem niedrigsten MP17-Proteinexpressionsniveau, war um ein bis zwei Tage gegenüber der WT-Kontrolle vorverlegt, die nach durchschnittlich 13,4 Tagen Langtag blühen begann (s. Abb. 3-30 A, B). Die anderen Transkript- und Fusionsprotein-akkumulierenden Mutanten zeigten ein mit dem WT vergleichbares Blühverhalten. Hingegen blühten die Revertanten mit kaum nachweisbarem *MP17*-Transkript in *source*-Blättern deutlich später als der WT und sogar leicht verzögert gegenüber der NM-Parentallinie.

Abschließend wurde die reproduktive Leistung von je 6-12 Pflanzen untersucht, die nach 6 Wochen Kurztag unter Langtagbedingungen kultiviert wurden und zum Zeitpunkt der Ernte vollständig seneszent waren. Im Gegensatz zur MP17:GFP-transgenen NM-Parentallinie war der Samenertrag aller Suppressormutanten nicht gegenüber dem WT-Niveau erhöht sondern lag teilweise sogar leicht unterhalb (s. Abb. 3-30 C).

3.5.3 Phytopathologische Charakterisierung

Neben der Wiederherstellung des WT-ähnlichen Wachstums, begleitet von einer Reversion der Kohlenhydratakkumulation, sollte über die phytopathologische Analyse die Virusanfälligkeit und damit die Kapazität zur symplastischen Assimilatverteilung in den MP17-Suppressormutanten untersucht werden.

Für die Analyse der TuMV-Virusmultiplikation und systemischen Ausbreitung in den systemischen Blättern 18 Tage nach Infektion wurden MP17-Revertanten ausgewählt, die aufgrund der nachfolgend beschriebenen genetischen Analyse in das markergestützte Kartierungsverfahren zur Isolation der mutierten Gene eingesetzt werden.

Wie bereits in Abschn. 3.1.4 und 3.4.6 beschrieben, wurden je 20 Pflanzen im Alter von drei Wochen mit TuMV-Virusextrakt inokuliert und entwickelten etwa zwei Wochen nach Infektion erste Symptome.

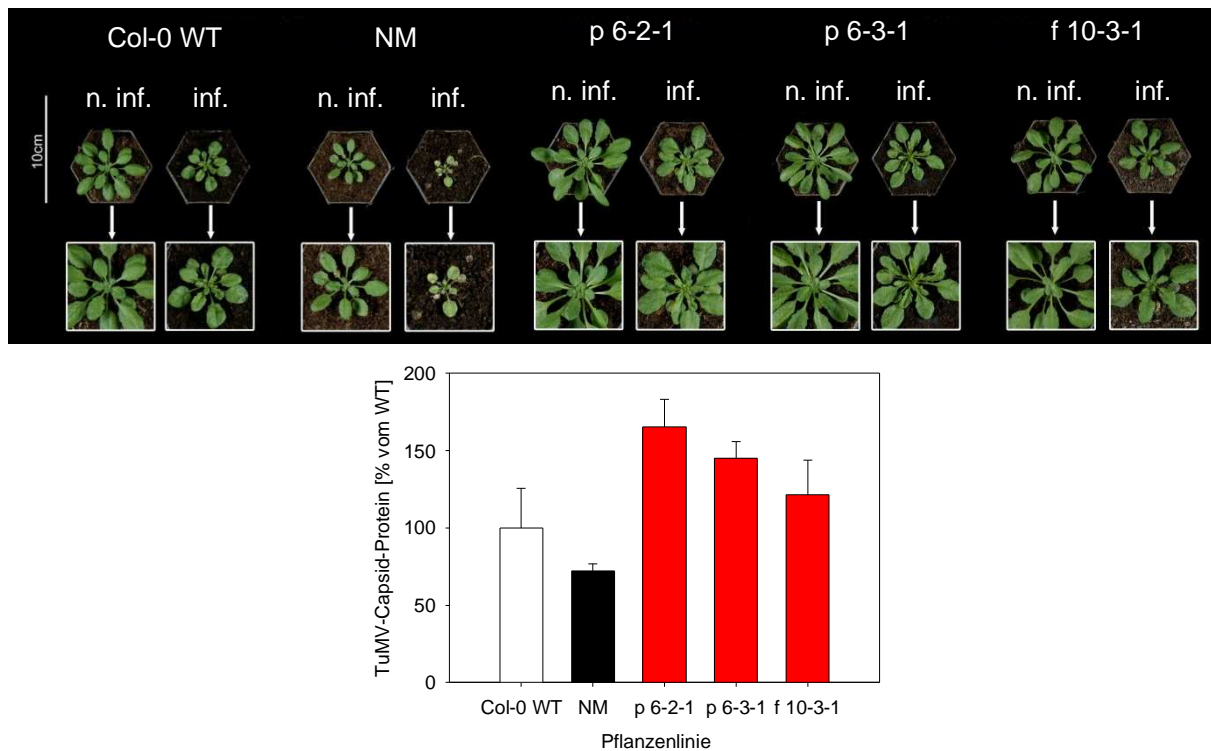


Abbildung 3-31: TuMV-Infektion ausgewählter MP17-Suppressormutanten im Vergleich zur nicht transformierten WT-Kontrolle und nicht-mutagenisierten Linie Col-0-16 (NM)

In der Aufnahme sind die Symptome TuMV-infizierter *Arabidopsis*-Pflanzen in Gegenüberstellung zu nicht infizierten Pflanzen gezeigt. Im Diagramm ist die Quantifizierung der TuMV-Capsid-Proteingehalte 18 Tage nach Infektion in systemischen Blättern mittels ELISA-Virustiterbestimmung dargestellt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte von 20 Pflanzen \pm Standardfehler und sind in Prozent des WT-Gehaltes angegeben. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der TuMV-Infektion drei Wochen alt und hatten 8-12 Blätter ausgebildet. Der Größenmaßstab gibt 10 cm an. n. inf.: nicht infiziert, inf.: infiziert.

Die in Abb. 3-31 dargestellte ELISA-Bestimmung der Virustiter offenbarte, dass in den drei infizierten MP17:GFP-Mutanten PG p 6-2-1, PG p 6-3-1 und PG f 10-3-1 die aus der NM-Parentallinie bekannte Verzögerung der Virusausbreitung aufgehoben war. Der quantifizierte TuMV-Capsid-Proteingehalt war sogar um 65%, 45% bzw. 21% gegenüber der WT-Kontrolle erhöht und legt nahe, dass durch die EMS-Mutagenese eine Komponente des pflanzlichen Transportsystems und/oder des putativen plasmodesmalen MP17-Interaktionspartners in den Bindungs- und Transporteigenschaften verändert sein könnte.

3.5.4 Genetische Analyse der Suppressormutanten

Da chemische Mutagene wie EMS hohe Mutationsraten begünstigen, war eine Auskreuzung aller zusätzlichen Mutationen in den MP17-Suppressormutanten notwendig. Dazu wurden, wie in Abb. 3-32 dargestellt, zwei Rückkreuzungszyklen in

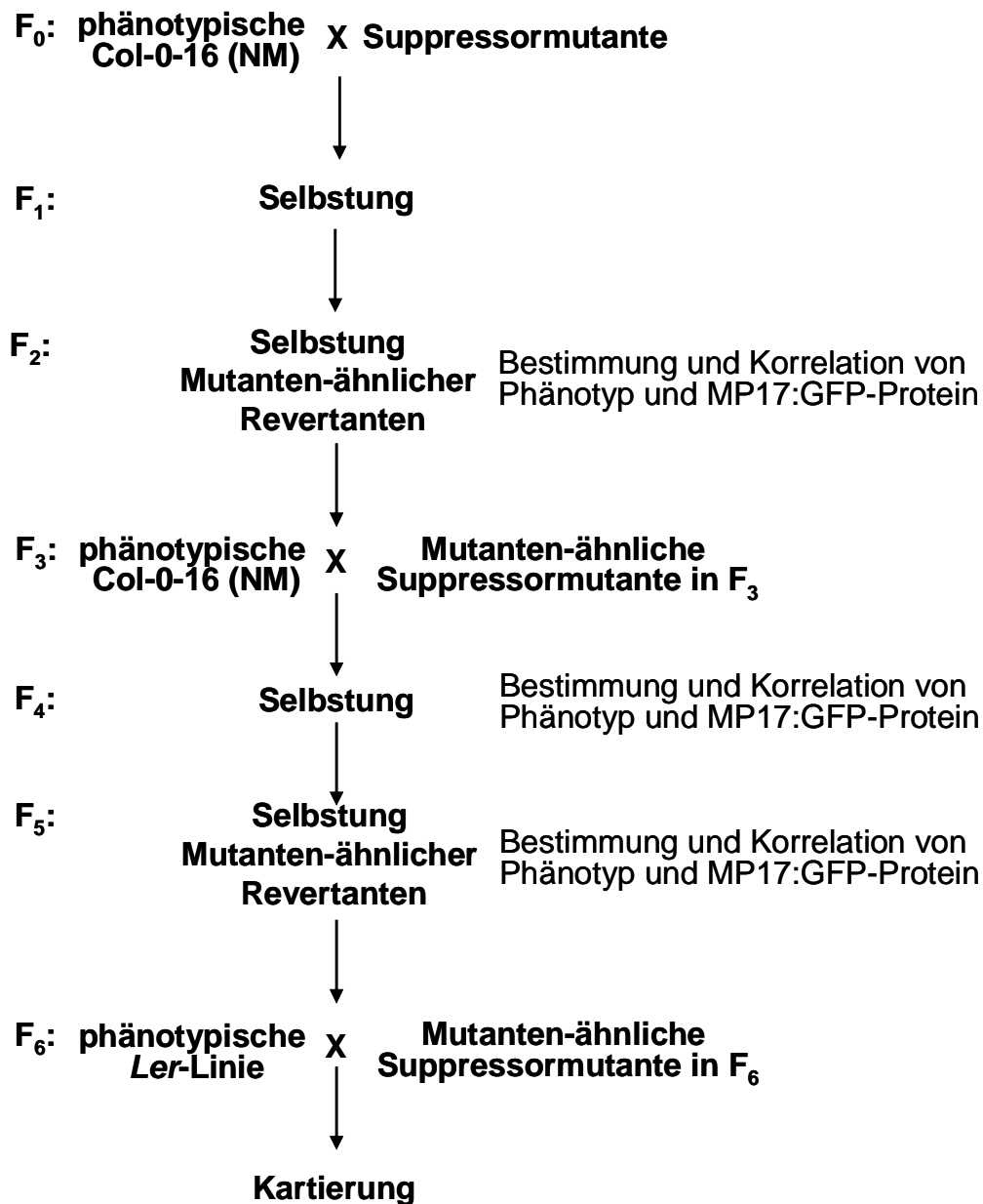


Abbildung 3-32: Rückkreuzungsschema der MP17-Suppressormutanten zur Beseitigung von Seitenmutationen bis zur Kreuzung der homozygoten Mutanten mit dem Partner zur Generierung der Kartierungspopulation

F₀-F₆: Tochtergeneration, *Ler*: *Landsberg erecta*, NM: nicht-mutagenisiert

den Parentalgenotyp NM ausgeführt. Zur besseren Unterscheidung von den M3-Revertanten und der einzelnen Rückkreuzungsschritte wurde das Ende der Mutantenbezeichnung nach einer Rückkreuzung mit R bzw. nach zwei Rückkreuzungen mit RR versehen.

Die Nachkommen in der uniformen, heterozygoten ersten Tochtergeneration (F_1) aus der Kreuzung der 10 verschiedenen PG-Mutanten mit NM, die durch einen NM-ähnlichen Wuchs gekennzeichnet waren, wurden geselbstet. Die Individuen in der F_2 wurden in Hinblick auf Phänotyp und MP17:GFP-Protein untersucht. Für die Selbstung der F_2 -Generation wurden nur Mutanten-ähnliche Vertreter der einzelnen Revertanten ausgewählt, bei denen der WT-ähnliche Wuchs mit dem Fehlen bzw. Vorhandensein und entsprechenden Gehalt an MP17:GFP-Protein der M3-Mutanten korrelierte.

Diese Analyse wurde ebenfalls mit den Nachkommen in der F_3 durchgeführt und nur solche in die zweite Rückkreuzung mit NM eingesetzt, bei denen das WT-ähnliche Erscheinungsbild mit dem jeweiligen Mutanten-spezifischen *MP17*-Transkript und MP17-Protein übereinstimmte (s. Abb. 3-33 A). Die daraus resultierende F_4 -Generation zeichnete sich durch einen NM-ähnlichen Phänotyp aus. Dieser wurde ebenfalls mit der Akkumulation von *MP17:GFP*-RNA und MP17:GFP-Protein in Northern- und Western-Analysen abgeglichen. Wie in Abb. 3-33 B und C gezeigt, wiesen die Individuen der uniformen, heterozygoten F_4 -Generation nach zwei Rückkreuzungen NM-spezifische Transkript- und Proteinmengen von MP17:GFP auf. Dies war in Übereinstimmung mit dem NM-ähnlichen Phänotyp.

Neben dem Auskreuzen zusätzlicher Mutationen diente die zweite Einkreuzung der Suppressormutanten in den NM-Parentalhintergrund ihrer genetischen Charakterisierung. In der F_1 -Generation (entspricht F_4 nach zwei NM-Rückkreuzungen) kann das Dominanzverhältnis zwischen mutiertem und WT-Allel bestimmt werden. Da, wie schon bei den heterozygoten Nachkommen der ersten Rückkreuzung in den NM-Parentalgenotyp beobachtet, ausschließlich NM-typische Merkmalsausprägungen in der F_4 -Generation vorlagen, würde dies auf eine rezessive Vererbung der Mutation in den verifizierten M3-Revertanten hindeuten.

Über das Segregationsmuster der F_2 -Generation (entspricht F_5 nach zwei NM-Rückkreuzungen) kann die Anzahl der beteiligten Loci bestimmt, das Dominanzverhältnis bestätigt und zudem ermittelt werden, in wieweit ein Mendel'sches Vererbungs-

muster vorliegt. Aus diesem Grund wurden für diese genetischen Analysen durch Selbstung der F₄-Generation Individuen der F₅-Nachfolgenergeneration erhalten.

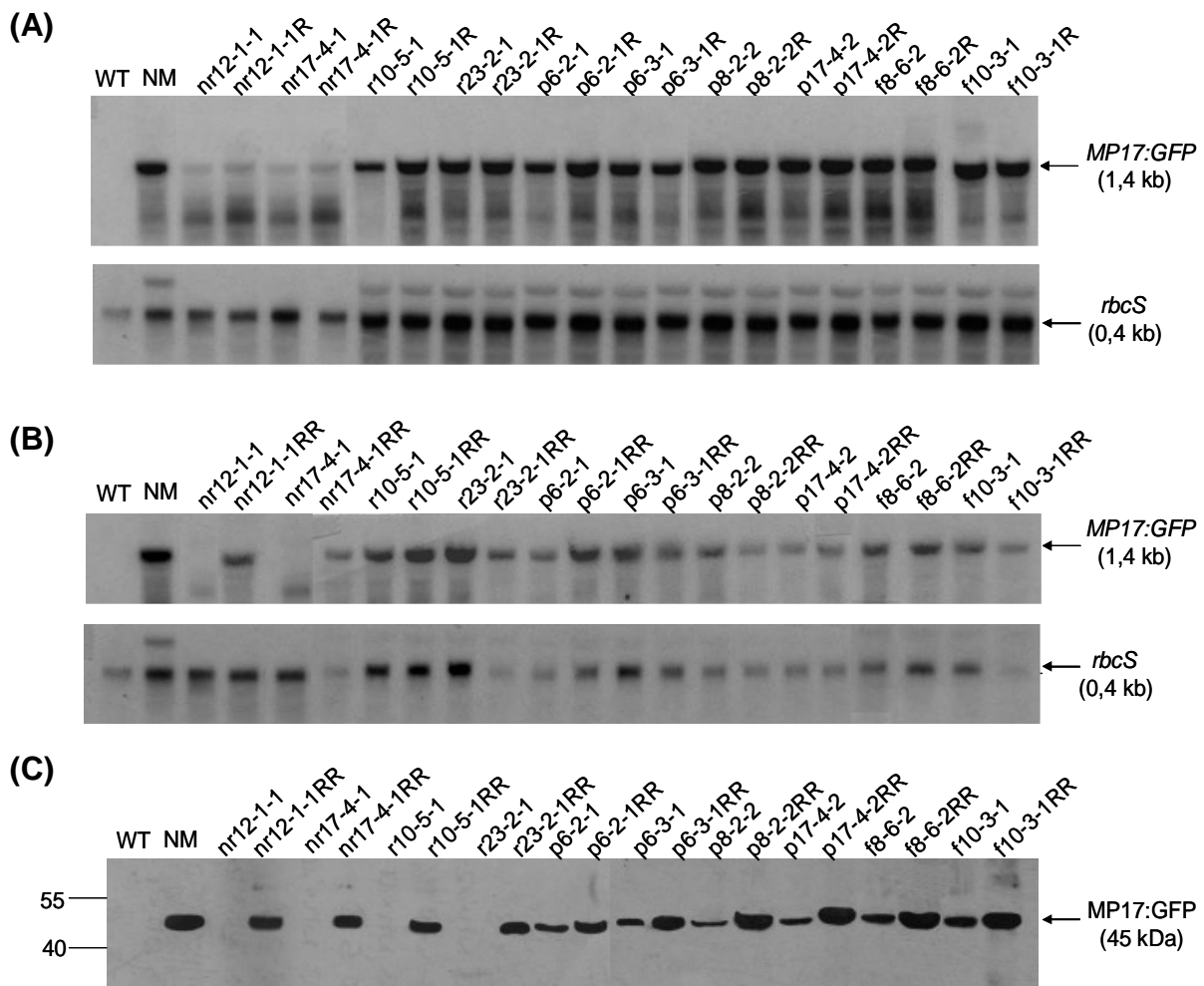


Abbildung 3-33: Expressionsanalyse der in den nicht-mutagenisierten (NM) Hintergrund zurück-gekreuzten MP17-Suppressormutanten

Gezeigt ist die Northern-Analyse geselbsteter, Mutanten-ähnlicher Pflanzen der F₃-Generation, die nach einer Rückkreuzung der MP17-Revertanten in den NM-Hintergrund in einen zweiten Rückkreuzungszyklus eingesetzt wurden **(A)**. Unter **(B)** dargestellt ist die Northern- und unter **(C)** die Western-Analyse der NM-ähnlichen Suppressormutanten in der F₄-Generation nach der zweiten NM-Rückkreuzung. Für die Northern-Blots wurde Gesamt-RNA von Kontrollen (WT, NM) und rückgekreuzten MP17-Mutanten isoliert. Pro Spur wurden 30 µg RNA aufgetragen und mit einer MP17-spezifischen cDNA-Sonde hybridisiert. Zur Überprüfung der Beladung erfolgte eine zusätzliche Beprobung mit *rbcS*-cDNA. In der Western-Analyse wurden auf jede Spur identische Mengen an Gesamtprotein (20 µg) aufgetragen und unter Verwendung eines polyklonalen anti-MP17-Antiserums (1:5000 Verdünnung) sowie eines sekundären HRP-konjugierten IgG-Antikörpers (1:100000) analysiert.

Genetische Untersuchungen beschränken sich in der Regel auf eine kleine Auswahl von Individuen. Daher wurde zur Überprüfung, ob die in der Stichprobe gewonnenen Ergebnisse so eindeutig sind, dass sie Rückschlüsse auf das Gesamtverhalten zulassen, der Chi²-Test angewendet. Für einen bestimmten Erbgang vergleicht er die

beobachteten Werte mit den erwarteten. Der aus der χ^2 -Tabelle abgelesene Wahrscheinlichkeitswert P für die entsprechenden Freiheitsgrade gibt die Übereinstimmung zwischen Hypothese und Beobachtung an und ist umso größer, je kleiner der Wert von χ^2 (X^2) ist (Günther, 1984).

Da sich eine markergestützte Kartierung der Mutationen anschließt, wird als Voraussetzung dafür angenommen, dass die zu kartierenden Mutationen rezessiv und in einem monohybriden Erbgang vorliegen. Bei dieser 3:1-Spaltung besteht ein Freiheitsgrad. Ein P-Wert zwischen 0,20 und 0,50 liegt innerhalb und größere Werte oberhalb der Zufallsgrenze. Unter diesen Gegebenheiten besteht ausreichend Übereinstimmung zwischen empirischem und theoretischem Wert, so dass die Annahme einer 3:1-Spaltung für eine rezessive Mutation mit monohybridem Erbgang berechtigt ist.

Darauf basierend wurden die Nachkommen in der F_5 -Generation auf ihre Spaltungsverhältnisse hin analysiert. Dies erfolgte mit jeweils 50 Individuen aus jeder Kreuzung der 10 Suppressormutanten mit dem NM-Parentalgenotyp unter Bestimmung von Phänotyp und MP17:GFP-Proteinsignalstärke. Beide Merkmalsausprägungen wurden ausgezählt und miteinander abgeglichen.

Wie Tab. 3-2 zu entnehmen ist, zeigten die MP17-Revertanten PG nr 12-1-1RR, PG nr 17-4-1RR, PG r 10-5-1RR, PG r 23-2-1RR, PG p 6-3-1RR, PG p 8-2-2RR und PG f 8-6-2RR in dieser Analyse kein statistisch abgesichertes rezessives Spaltungsverhältnis. Darüber hinaus war auch bei einigen Nachkommen der Rückkreuzung von PG nr 17-4-1RR und PG p 17-4-2RR keine Korrelation von NM-Phänotyp und – Proteingehalt gegeben. Zwar ergab sich in der Spaltungsanalyse der Klasse I-Mutanten PG r 10-5-1RR und PG r 23-2-1RR eine ähnliche Verteilung der Pflanzen beim Auszählen in Bezug auf Phänotyp und MP17:GFP-Proteinsignal, jedoch stimmten Phänotyp und Protein auch hier nicht immer überein.

Hingegen offenbarte die statistische Analyse, dass nach Auszählen und Abgleich von Phänotyp und MP17-Protein für die Spaltungsanalyse der Suppressormutanten PG p 6-2-1RR und PG f 10-3-1RR ausreichend Übereinstimmung zwischen empirischem und theoretischem Wert besteht, so dass eine 3:1-Spaltung für eine rezessive Mutation mit monohybridem Erbgang angenommen werden kann. Außerdem korrelierten bei der Nachkommenschaft aus der NM-Rückkreuzung dieser beiden Revertanten NM-Protein und NM-Phänotyp miteinander.

Tabelle 3-2: Spaltungsanalyse zur Bestimmung des Dominanzverhältnisses der MP17-Suppressormutanten nach zwei Rückkreuzungen in den NM-Hintergrund

Rückkreuzung	F ₄		Spaltung F ₅		angenommene Spaltung	Mutation	Wahrscheinlichkeit (P)			
	PT	NM	PT	NM				WT	X ² -Wert	
nr 12-1-1RR	PT	NM	PT	28	18	1,56 : 1	4,55	3 : 1	rezessiv	> 0,01
	Prot.	NM	Prot.	29	17	1,94 : 1	3,36	3 : 1	rezessiv	> 0,05
nr 17-4-1RR	PT	NM	PT	32	18	1,78 : 1	2,87	3 : 1	rezessiv	0,10
	Prot.	NM	Prot.	35	15	2,33 : 1	0,54	3 : 1	rezessiv	> 0,3
r 10-5-1RR	PT	NM-ähnl.	PT	32	18	1,78 : 1	2,87	3 : 1	rezessiv	0,10
	Prot.	NM	Prot.	33	17	1,94 : 1	1,89	3 : 1	rezessiv	> 0,01
r 23-2-1RR	PT	NM	PT	29	21	1,38 : 1	7,05	3 : 1	rezessiv	< 0,01
	Prot.	NM	Prot.	29	21	2,13 : 1	7,05	3 : 1	rezessiv	< 0,01
p 6-2-1RR	PT	NM	PT	35	15	2,33 : 1	0,54	3 : 1	rezessiv	> 0,3
	Prot.	NM	Prot.	36	14	2,57 : 1	0,18	3 : 1	rezessiv	> 0,5
p 6-3-1RR	PT	NM-ähnl.	PT	31	19	1,63 : 1	4,06	3 : 1	rezessiv	> 0,05
	Prot.	NM	Prot.	31	19	1,63 : 1	4,06	3 : 1	rezessiv	> 0,05
p 8-2-2RR	PT	NM-ähnl.	PT	34	16	2,13 : 1	1,11	3 : 1	rezessiv	> 0,2
	Prot.	NM	Prot.	34	16	1,38 : 1	1,11	3 : 1	rezessiv	> 0,2
p 17-4-2RR	PT	NM-ähnl.	PT	27	23	1,17 : 1	21,00	3 : 1	rezessiv	< 0,01
	Prot.	NM	Prot.	29	21	1,17 : 1	7,05	3 : 1	rezessiv	< 0,01
f 8-6-2RR	PT	NM	PT	30	20	1,50 : 1	5,45	3 : 1	rezessiv	> 0,01
	Prot.	NM	Prot.	30	20	1,50 : 1	5,45	3 : 1	rezessiv	> 0,01
f 10-3-1RR	PT	NM	PT	37	13	2,85 : 1	0,03	3 : 1	rezessiv	> 0,8
	Prot.	NM	Prot.	37	13	3,17 : 1	0,03	3 : 1	rezessiv	> 0,8

Phänotyp (PT) und Protein (Prot.) wurden von jeweils 5-10 Nachkommen in der ersten Tochtergeneration (F₄) und von 50 Nachkommen in der zweiten Tochtergeneration (F₅) der NM-Rückkreuzung im Vergleich zur Wildtyp- (WT) und nicht-mutagenisierten (NM, entspricht Col-0-16) Kontrolle ausgezählt und miteinander verglichen. Angegeben sind berechnetes und angenommenes Spaltungsverhältnis der F₅-Generation. Die Spaltungszahlen sind statistisch abgesichert durch X²-Test und die mit dem X²-Wert ermittelte Wahrscheinlichkeit P für die Übereinstimmung zwischen Spaltungshypothese und Beobachtung. Rot hervorgehoben sind MP17-Revertanten, für die eine rezessive Mutation mit einer 3:1-Spaltung statistisch nachgewiesen wurde.

Da sich die MP17-Suppressormutanten durch einen ähnlichen Phänotyp auszeichneten, bestand ein weiterer Aspekt der genetischen Charakterisierung in der

Überprüfung der Allelizität der Mutanten. Dies erfolgte mittels Komplementationstest unter der Voraussetzung, dass beide miteinander gekreuzte Mutanten rezessiv sind. Die genetische Grundlage hierfür besteht darin, dass sich Mutationen, die Allele verschiedener Gene betreffen, komplementieren können. Infolge dessen zeigt die F₁-Nachkommenschaft aus der Kreuzung der Mutanten untereinander den Phänotyp der nicht-mutierten Parentallinie. Entsprechen die Individuen der F₁-Folgegeneration dem Phänotyp der mutierten Eltern, gibt das einen Hinweis darauf, dass die Mutationen in den Allelen des gleichen Gens vorliegen und sich somit nicht komplementieren können (Weigel und Glazebrook, 2002).

Dazu wurden die durch einen NM-Rückkreuzungszyklus von zusätzlichen Mutationen gereinigten Individuen der F₃-Generation, die durch Merkmalsausprägungen der M3-Revertanten gekennzeichnet sind (s. Abb. 3-32), in beide Richtungen miteinander gekreuzt. In der daraus resultierenden F₁-Generation wurden Phänotyp und Protein im Vergleich zur WT- und NM-Kontrolle untersucht und miteinander abgeglichen (s. Tab. 3-3).

Tabelle 3-3: Analyse der allelischen Kreuzungen der MP17-Revertanten

Kreuzungskombination	Phänotyp	Protein
NM p 6-2-1 x NM f 10-3-1 NM f 10-3-1 x NM p 6-2-1	NM-Wuchs, k. Chlorosen NM-Wuchs, k. Chlorosen	wie f 10-3-1 wie NM
NM p 6-3-1 x NM f 10-3-1 NM f 10-3-1 x NM p 6-3-1	größer als NM, k. Chlorosen größer als NM, k. Chlorosen	mind. wie f 10-3-1 mind. wie f 10-3-1
NM p 6-2-1 x NM p 6-3-1 NM p 6-3-1 x NM p 6-2-1	wie Mutante minimal größer als NM, k. Chlorosen	wie Mutanten mind. wie Mutanten

Die durch eine Rückkreuzung in den NM-Parentalhintergrund von zusätzlichen Mutationen gereinigten Mutanten-ähnlichen Suppressormutanten der F₃-Generation wurden in beide Richtungen miteinander gekreuzt. Aufgeführt sind ausgewählte Kreuzungskombinationen der MP17-Mutanten, deren F₁-Nachkommenschaft NM-ähnliche Charakteristika der Parentallinie zeigte und auf komplementierende, nicht-allelische Mutationen verweist. k: keine, mind.: mindestens, NM: nicht-mutagenisiert Parentallinie (entspricht Col-0-16).

Die Nachkommen der meisten allelischen Kreuzungskombinationen zeigten sowohl in der phänotypischen als auch der biochemischen Analyse die Merkmalsausprägungen der mutierten Eltern. Das lässt vermuten, dass sich die Mutationen allelisch zueinander verhalten. Entsprechend der Analyse des Dominanzverhältnisses kann

diese Merkmalsausprägung jedoch auch damit begründet werden, dass mindestens eine der beiden untersuchten Mutationen dominant ist. Aufgrund der Beobachtung, dass Phänotyp und Akkumulation von MP17-Protein nicht bei allen Nachkommen der Rückkreuzungen übereinstimmten, kann es auch möglich sein, dass eventuell noch nicht alle zusätzlich erzeugten EMS-Mutationen ausgekreuzt wurden.

Lediglich die Nachkommenschaft der Kreuzungen von f 10-3-1R x p 6-2-1R, p 6-3-1 x f 10-3-1R, f 10-3-1R x p 6-3-1R und p 6-3-1 x p 6-2-1 war durch Phänotyp und MP17:GFP-Proteingehalt der NM-Parentallinie gekennzeichnet. Dies legt nahe, dass Mutationen dieser Revertanten die Allele verschiedener Gene betreffen und sich gegenseitig komplementieren können. Diese nicht-allelischen MP17:GFP-Mutanten wären somit für eine Identifizierung der mutierten Allele mittels markergestützter Kartierungsverfahren und Isolation der betroffenen Gene geeignet. Bei der Protein-biochemischen Analyse fiel auf, dass die F₁-Folgegeneration der Kreuzung von p 6-2-1R x f 10-3-1R trotz NM-ähnlichem Wuchs nur eine MP17-Proteinsignalstärke der Suppressormutante f 10-3-1 erreichte. Die Tochtergeneration der Kreuzung von p 6-2-1 x p 6-3-1 entsprach sowohl phänotypisch als auch biochemisch den Merkmalsausprägungen der Mutanten.

Somit wurden über die genetische Analyse PG p 6-2-1RR, PG p 6-3-1RR und PG f 10-3-1RR isoliert, die als potentielle Kandidaten zur Identifizierung der mutierten Allele mittels markergestützter Kartierungsverfahren geeignet sind. Zu diesem Zweck wurden durch Selbstung Mutanten-ähnlicher Individuen der F₅-Generation homozygote Nachkommen in der F₆-Folgegeneration erhalten, welche für die Erzeugung der Kartierungspopulationen geeignet sind (s. Abb. 3-32).

3.5.5 Erzeugung und Charakterisierung des Kreuzungspartners für die Kartierungspopulation

Für das markergestützte Kartierungsverfahren zur Identifizierung und Isolierung von Mutationen muss der Kreuzungspartner zur Generation der Kartierungspopulation der nicht-mutagenisierten Parentallinie entsprechen und in einem anderen Ökotyp vorliegen. Mittels markergestützter Kartierungsverfahren kann die einem Mutantenphänotyp zugrunde liegende genetische Ursache über die Kombination klassischer Mendel'scher Vererbungslehre und moderner Molekularbiologie identifiziert und

das/die entsprechende(n) Gen(e) kloniert werden. Dabei werden natürlich auftretende Unterschiede zwischen distinkten, vollständig sequenzierten Ökotypen ausgenutzt. Zwischen den am häufigsten verwendeten und am besten charakterisierten *Arabidopsis*-Akzessionen Col-0 und *Ler* können sie 0,5-1,0% betragen (Lukowitz *et al.*, 2002). Daher sollte eine Linie im *Ler*-Hintergrund erzeugt werden, welche die gleichen phänotypischen Eigenschaften wie die NM-Parentallinie zeigt. Außerdem sollte sie nur eine Insertion von MP17:GFP enthalten, wobei die Insertion am gleichen Genort wie in NM vorliegt. Wie in Abschn. 3.1 beschrieben, induziert die konstitutive, hohe Expressionsrate von MP17:GFP in den beiden *Arabidopsis*-Ökotypen Col-0 und *Ler* vergleichbare phänotypische Veränderungen und kann als Grundvoraussetzung hierfür angesehen werden.

Damit gewährleistet werden kann, dass die Einzelinsertion von MP17:GFP am gleichen Genort vorliegt wie in der nicht-mutagenisierten, phänotypischen Parentallinie NM (Col-0-16) der Suppressormutanten und in vergleichbarer Stärke exprimiert wird, wurde der NM-Parentalgenotyp in den Hintergrund des *Ler*-WTs eingekreuzt (s. Abb. 3-34). Die Einkreuzung MP17:GFP-exprimierender Individuen erfolgte insgesamt über 8 Zyklen, um MP17 in einem möglichst reinen *Ler*-Hintergrund zu erhalten. Die Überprüfung der Reinheit wurde mittels genomweiter Kartierung („genome wide mapping“) unter Verwendung von 21 SSLP-Markern (s. Anhang I) durchgeführt, welche über die 5 Chromosomen von *Arabidopsis* verteilt sind (Lukowitz *et al.*, 2002).

Die PCR-Analyse mit diesen ko-dominanten genetischen Markern lieferte polymorphe PCR-Fragmente, die mit den parallel analysierten Col-0- und *Ler*-WT-Kontrollen verglichen wurden. In der F₈-Generation konnten zwei Individuen identifiziert werden, bei denen die über das gesamte *Arabidopsis*-Genom verteilten SSLP-Marker ein Muster an PCR-Fragmenten ergab, das in allen Primerkombinationen dem homozygoten *Ler*-Ökotyp entsprach. In Abb. 3-34 C ist die Markeranalyse für einen Vertreter abgebildet. Bei den Markern *ciw7* und *ciw10* in der unteren Reihe von Abb. 3-34 C sind jeweils bei der *Ler* WT-Kontrolle als auch dem Kreuzungspartner zwei Banden erkennbar. Kontaminationen können ausgeschlossen werden, da andere Primerkombinationen nicht betroffen sind. Darüber hinaus entspricht das Muster der PCR-Fragmente nicht dem heterozygoten Zustand. Der Kreuzungspartner wurde als *Ler*NM8 bezeichnet. Um homozygoten

Saatgut zu erhalten, wurden beide F₈-Individuen geselbstet und mit *Ler*NM8S benannt.

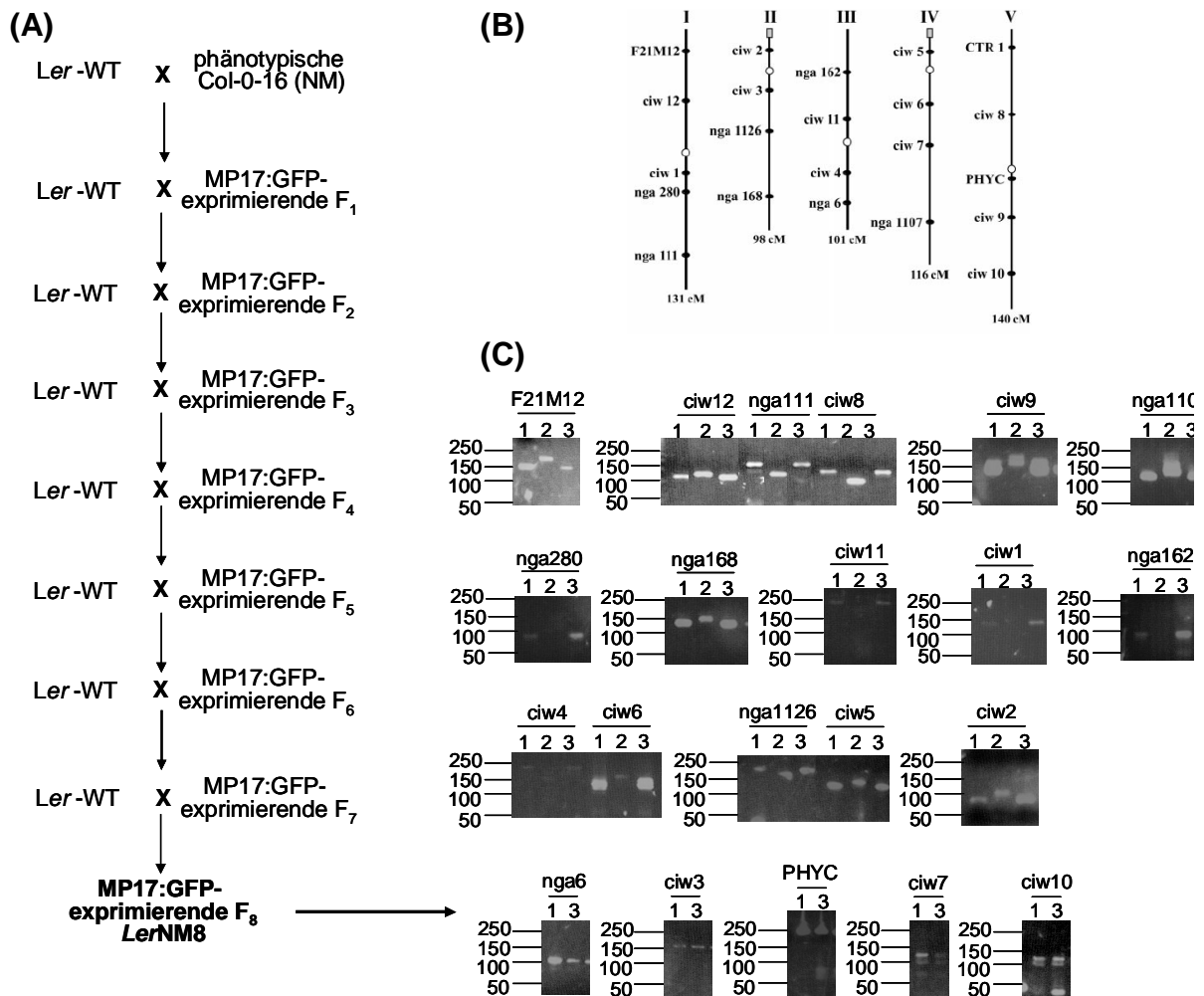


Abbildung 3-34: Generierung (A) und Markeranalyse (B, C) der MP17:GFP-exprimierenden *Ler*-Linie *Ler*NM8

(A) Schematisch dargestellt ist die Erzeugung des Kreuzungspartners *Ler*NM8, um durch Kreuzung mit ausgewählten MP17-Revertanten die Population für die markergestützte Kartierung zu erhalten. *Ler*-WT-Pflanzen wurden mit der phänotypischen Parentallinie Col-0-16 (NM) gekreuzt. Nach Western-Analysen unter Verwendung eines polyklonalen anti-MP17-Antiserums und sekundären HRP-konjugierten IgG-Antikörpers wurden MP17:GFP-exprimierende Individuen über mehrere Generationen mit *Ler*-WT-Pflanzen gekreuzt, um MP17 in einem reinen *Ler*-Hintergrund zu erhalten.

(B) Schematische Darstellung der SSLP-Markerpositionen (Lukwitz *et al.*, 2002).

(C) Die Reinheit des putativen Kreuzungspartners wurde durch PCR-Analyse mit 21 über das gesamte Genom verteilten SSLP-Markern im Vergleich zur Col-0- und *Ler*-Kontrolle getestet. 1: *Ler*, 2: Col-0, 3: *Ler*NM8.

Col: Columbia, *Ler*: *Landsberg erecta*, NM: nicht-mutagenisierte Parentallinie Col-0-16, SSLP: "Simple Sequence Length Polymorphism".

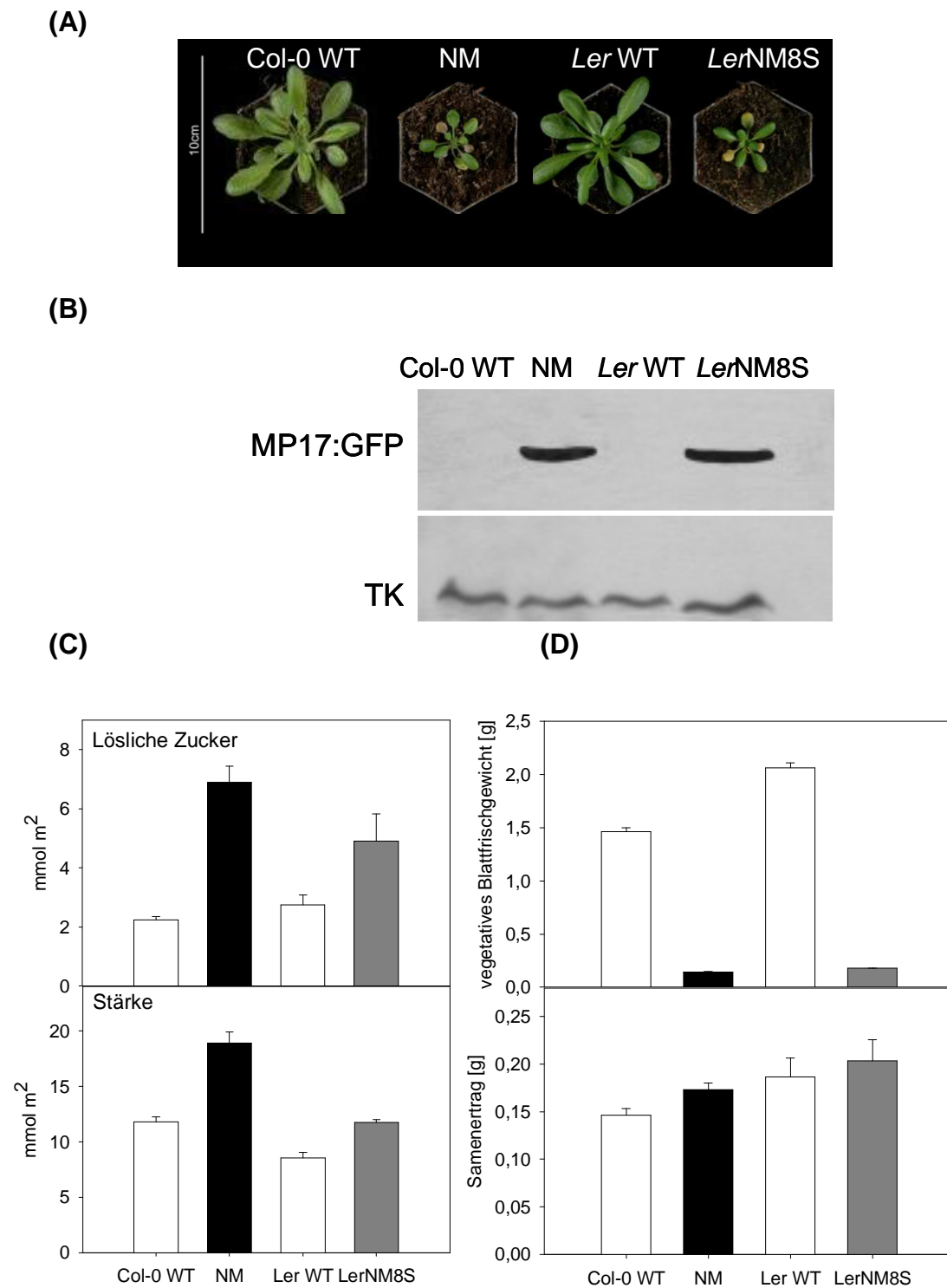


Abbildung 3-35: Molekulare, biochemische und physiologische Charakterisierung der homozygoten, MP17:GFP-exprimierenden Linie *LerNM8S* im Vergleich zu den Ökotyp-spezifischen WT-Kontrollen und der phänotypischen Parentallinie NM (Col-0-16)

(A) Phänotyp der Pflanzen, die 5 Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden.

(B) Western-Analyse der MP17:GFP-Proteinakkumulation. Auf jede Spur wurden identische Mengen an Gesamtprotein (20 µg) aufgetragen und unter Verwendung eines polyklonalen anti-MP17-Antiserums (1:5000 Verdünnung) sowie eines sekundären HRP-konjugierten IgG-Antikörpers (1:100000) analysiert.

(C) Bestimmung der Kohlenhydratgehalte. Blattproben wurden von 5 Wochen alten Pflanzen 8 h nach Beginn der Lichtphase von vollständig entwickelten *source*-Blättern geerntet. Die Daten löslicher Zucker und Stärke wurden von 5 Pflanzen erhalten, wobei von jeder Pflanze zwei Proben gemessen und gemittelt wurden. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben

(D) Analyse von vegetativem Blattfrischgewicht und Samenertrag. Die Pflanzen wurden 6 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und das Blattfrischgewicht ermittelt. Die reproduktive Leistung wurde von jeweils 5 vollständig seneszenten Pflanzen bestimmt, nachdem sie nach 6 Wochen unter Kurztagbedingungen bis zur Samenreife unter Langtag im Gewächshaus kultiviert wurden. Angegeben sind die Mittelwerte pro Pflanze und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Anschließend wurde die homozygote, MP17:GFP-tragende Linie *Ler*NM8S mittels Proteinquantifizierung, Bestimmung der Kohlenhydratgehalte sowie Analyse von vegetativer Blattbiomasse und Samenertrag charakterisiert und verifiziert, ob sie durch gleiche Merkmalsausprägungen gekennzeichnet ist wie die NM-Parentallinie.

Der Kreuzungspartner der MP17-Suppressormutanten zeigte einen vergleichbar verminderten Wuchs und ein auffälliges Ausbleichen der Interkostalregionen in den unteren *source*-Blättern wie die phänotypische NM-Parentallinie, wie in Abb. 3-35 A bei 5 Wochen unter Kurztagbedingungen kultivierten Vertretern dargestellt. Dabei war das Blattfrischgewicht der NM-Linie nach 6 Wochen Kurztag auf 9,7% und das der *Ler*NM8S-Linie auf 8,6% im Vergleich zur Ökotyp-spezifischen WT-Kontrolle reduziert (s. Abb. 3-35 C). Darüber hinaus offenbarte die Western-Analyse in Abb. 3-34 B ein ähnlich starkes MP17:GFP-Proteinexpressionsniveau der NM- und *Ler*NM8S-Linien. Des Weiteren zeichnete sich ein Erhöhung der Gehalte an löslichen Zuckern und Stärke gegenüber der WT-Kontrolle ab (s. Abb. 3-35 C). Auch in Bezug auf die Analyse der reproduktiven Leistung konnte ein tendenzieller Anstieg im Samenertrag beobachtet werden.

Somit wurde über die Bereitstellung des homozygoten, phänotypischen Kreuzungspartners *Ler*NM8S die Voraussetzung dafür geschaffen, dass die mutierten Allele der infolge zweier Rückkreuzungszyklen gereinigten M3-Suppressormutanten PG p 6-2-1RR, PG p 6-3-1RR und PG f 10-3-1RR mittels markergestützter Kartierungsverfahren identifiziert werden können.

4 DISKUSSION

Im Pflanzenreich stellen Plasmodesmen (PDs) spezielle interzelluläre Strukturen dar, welche die Zellulose-haltige Zellwand überwinden und benachbarte Zellen zytoplasmatisch verbinden. Über diese Verbindung ermöglichen sie den Austausch von niedermolekularen Verbindungen, wie Ionen, Photoassimilaten und Wachstumsregulatoren als auch den selektiven Transfer von endogenen Makromolekülen, wie RNA und Proteine. Somit bilden PDs einen wesentlichen Bestandteil des symplastischen Transportweges und gewährleisten die interzelluläre Kommunikation (Ruiz-Medrano *et al.*, 2004; Lucas und Lee, 2004; Oparka, 2004; Kim und Zambryski, 2005).

Zahlreiche elektronenmikroskopische Studien konnten die Ultrastruktur von PDs weitestgehend aufdecken (Heinlein und Epel, 2004; Roberts und Oparka, 2003). Trotzdem ist bislang wenig über die Proteine bekannt, die am strukturellen Aufbau von PDs beteiligt sind, da sie durch ihre feste Verankerung in der Zellwand biochemischen Ansätzen schwer zugänglich sind.

Eine alternative Strategie zur biochemischen Aufreinigung bieten virale Movement Proteine (MPs), seit bekannt ist, dass sie mit strukturellen Komponenten der PDs interagieren und ihre Leitfähigkeit verändern, um die interzelluläre Ausbreitung von infektiösem Virusmaterial zu bewerkstelligen (Carrington *et al.*, 1996; Ghoshroy, *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 1999; Lucas, 1999). Bisherige Untersuchungen von MP-vermittelten Effekten erfolgten hauptsächlich in Kartoffel und Tabak, welche für genetische Ansätze zur Entschlüsselung molekularer Faktoren und Mechanismen nicht geeignet sind.

Im Rahmen dieser Arbeit lag ein wesentlicher Schwerpunkt in der Charakterisierung der Wirkungsweise des MP des Phloem-limitierten *Potato leafroll virus* (PLRV-MP17) in dem genetischen System *Arabidopsis*. Dabei wurden insbesondere die Auswirkungen konstitutiver und zellspezifischer MP17-Expression auf Assimilat- und Biomasseverteilung untersucht und mit entwicklungspezifischen Prozessen in Zusammenhang gebracht. Darauf aufbauend wurden zur genetischen Isolierung Mutanten mit Defekten in potentiellen MP17-Interaktoren analysiert.

4.1 Dosis-abhängige Effekte von PLRV-MP17 auf Assimilattransport und Phänotypausprägung

Konstitutiv MP17-exprimierende *Arabidopsis*-Linien verschiedener Expressionsstärken in den Ökotypen Columbia (Col-0), *Landsberg erecta* (*Ler*) und C24 wurden genutzt, um die PD-vermittelte Photoassimilat- und Ressourcenverteilung zu verändern. Dabei traten signifikante Änderungen in Kohlenhydratgehalten, vegetativer Biomasseakkumulation und reproduktivem Wachstum in strikter Dosisabhängigkeit vom MP17-Expressionsniveau auf. Niedrige MP17-Expressionslevel erhöhten die Blattbiomasseproduktion, während hohe MP17-Proteingehalte eine erhebliche Wachstumsretardierung und Assimilatakkumulation induzierten. Hingegen war die geringere Blattbiomasse von einer erhöhten Samenproduktion begleitet und begründet damit einen stark verbesserten Ernteindex.

4.1.1 Vegetative Wachstumsphase

Die MP17:GFP-vermittelten phänotypischen Veränderungen in Form von Wachstumsretardierung sowie die Entwicklung chlorotischer Interkostalfelder in ausgewachsenen *source*-Blättern stark exprimierender *Arabidopsis*-Linien (Col-0-16, *Ler*-1, *Ler*-12 und C24-72, Abschn. 3.1.3.1) ähnelte Tabaklinien, welche die N-terminal verlängerte Version von MP17 (MP17N) exprimierten (Herbers *et al.*, 1997). Das lässt vermuten, dass die in Tabak beobachteten Effekte auch auf *Brassicaceae* übertragbar und somit eine generelle Eigenschaft der MP17-PD-Interaktion sind. Weiterhin lässt die Tatsache, dass in drei verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen vergleichbare Veränderungen auftraten, auf eine konservierte Wirkungsweise von MP17 schließen. In Tabakpflanzen wurde der Phänotyp mit der Akkumulation von Kohlenhydraten infolge einer Hemmung der Phloembeladung in Verbindung gebracht (Herbers *et al.*, 1997).

Einen weiteren Hinweis für einen unterbrochenen Photoassimilatfluss gibt die Regressionsanalyse der MP17:GFP-induzierten Veränderungen (3.1.5, Abb. 3-9). Durch Quantifizierung der MP17-Proteingehalte konnte verifiziert werden, dass Saccharose- und MP17:GFP-Proteinlevel, deren Auftragung eine positive Korrelation zeigte, beide negativ mit der vegetativen Blattbiomasse korreliert waren. Dies ist in

Übereinstimmung mit dem hinlänglich bekannten Wissen, dass in den meisten höheren Pflanzen Saccharose die hauptsächliche Transportform der photoassimilierten Kohlenhydrate darstellt und als solche einen überwiegenden Anteil an der Zusammensetzung des Siebröhrensaftes hat (Zimmermann und Ziegler, 1975). Das legt nahe, dass eine Inhibierung des Assimilattransportes als wahrscheinliche Ursache für die beobachteten Effekte angesehen werden kann.

4.1.1.1 Apoplastischer oder symplastischer Photoassimilatstrom?

Eine *Arabidopsis*-Mutante mit Defekt im Saccharosetransporter SUC2, die infolge von reduziertem Saccharosetransport und massiver Stärkeakkumulation in *source*-Blättern kleinwüchsig und steril war, erbrachte den Nachweis, dass sich *Arabidopsis*, wie Kartoffel und Tabak, durch eine apoplastische Phloembeladung auszeichnet (Gottwald *et al.*, 2000). Diese apoplastische Phloembeladung scheint somit kritisch zu sein für Wachstum, Entwicklung und Reproduktion in *Arabidopsis*. Daher lässt sich spekulieren, ob eine veränderte Zusammensetzung des Phloensaftes, wie durch geringere Saccharoseexportraten in Phloemexudatmessungen angezeigt (3.1.6, Abb. 3-10), auf eine Beeinflussung der apoplastischen Phloembeladung durch die Aktivität von Saccharosetransportern zurückzuführen sein könnte. So ist z. B. gezeigt worden, dass erhöhte apoplastische Saccharosegehalte in Blättern von *Beta vulgaris* den Level an Saccharosetransportern senken (Chiou und Bush, 1999; Vaughn *et al.*, 2002). Daraus wurde geschlossen, dass ausreichend Saccharose im apoplastischen Raum, der die kleinen Venen als Orte der Phloembeladung in ausgewachsenen *source*-Blättern umgibt, als negatives Signalmolekül agiert, welches die Aktivierung des Geleitzell-spezifischen AtSUC2-Saccharosetransporters in *Arabidopsis* verhindert, während dies in den großen Venen nicht der Fall zu sein scheint (Wright *et al.*, 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass ausreichend ATP eine unbedingte Voraussetzung für funktionelle Saccharosetransporter ist (von Schaewen *et al.*, 1990; Lerchl *et al.*, 1995), wobei Eingriffe in den Phloemetabolismus ATP-Gehalte in den Mittelrippen MP17-transgener Pflanzen verändern können (Herbers *et al.*, 1997).

Bret-Harte und Silk (1994) postulieren auf Basis der damaligen Kenntnisse von Konzepten zur PD-Struktur sowie theoretischen Berechnungen, dass die symplastische Diffusion von Saccharose nicht ausreichend ist, den Bedarf an

Kohlenstoffen zur Bildung von Biomasse im Wurzelmeristem in Mais zu decken. Sie diskutieren daher alternative Transportmechanismen. In höheren Pflanzen wurden bereits mehrere Isoformen von Saccharosetransportern mit spezifischen Expressionsmustern und kinetischen Eigenschaften identifiziert. Für *Arabidopsis* sind es insgesamt 9 verschiedene Transporter (Lalonde *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2000) und für Tabak wird eine ähnliche Anzahl angenommen (Wright *et al.*, 2003). Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob Saccharosetransporter auch am Zell-zu-Zell-Transport von Saccharose im nicht-vaskulären Gewebe autotropher *source*-Blätter beteiligt sind (Williams *et al.*, 2000; Truernit, 2001).

Aufgrund ihrer hohen Dichte zwischen benachbarten Mesophyllzellen sowie zwischen Zellen von Mesophyll und des vaskulären Parenchyms werden PDs als das symplastische Netzwerk angesehen, das zu dem Transport von Photoassimilaten zu den Leitgeweben kleiner Venen in ausgewachsenen *source*-Blättern beiträgt (Stitt, 1996). Gestützt wird diese Annahme dadurch, dass der Kallose-vermittelte Verschluss von PDs in Mesophyllzellen sowie an der Verbindung zwischen Bündelscheide und vaskulärem Parenchym zur Unterbrechung des Saccharosetransportes führte und damit zu einer drastischen Akkumulation von Stärke (Rinne *et al.*, 2005; Russin *et al.*, 1996; Botha *et al.*, 2000).

4.1.1.2 Unterbrechung des plasmodesmalen Transportes in Linien mit hohem MP17:GFP-Proteingehalt und Auswirkungen auf den Phänotyp

Auf Basis der oben beschriebenen Faktoren sind MP-vermittelte Veränderungen der plasmodesmalen Transporteigenschaften eher in Betracht zu ziehen, welche sich auf die symplastische Transportkapazität gegenüber Saccharose auswirken. Jedoch ist die Wirkungsweise, wie MPs mit Kohlenhydrat- und Ressourcenverteilung interagieren noch wenig verstanden. Außerdem scheinen MP17-induzierte Effekte in hohem Maße abhängig zu sein von dem ausgewählten MP, der Pflanzenspezies, den exprimierenden Zelltypen sowie entwicklungspezifischen Kontrollen zu unterliegen (Olesinski *et al.* 1996; Lucas *et al.*, 1996; Almon *et al.*, 1997; Hofius *et al.*, 2001; Shalitin *et al.*, 2002). Da die Auswirkungen der MP17-Expression auf Assimilattransport, Kohlenhydrat- und Ressourcenverteilung in hohem Maße mit der MP17-Proteinmenge korrelierten, muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass die

bisherigen Untersuchungen – bis auf bei (Hofius *et al.*, 2001) – weitestgehend ohne Berücksichtigung des MP-Expressionsniveaus erfolgten. Das Wissen über den MP-Proteingehalt der unabhängigen Pflanzenlinien könnte zu einem besseren Verständnis der beobachteten Effekte beitragen.

Fluoreszenz- und Immunogoldmarkierungen transgener *Arabidopsis*-Linien (Hofius, 2003) zeigten ähnliche MP17:GFP-Lokalisierungsmuster wie in Tabak- (Herbers *et al.*, 1997; Hofius *et al.*, 2001) und Kartoffelpflanzen (Schmitz *et al.*, 1997). Die Inhibition des Saccharoseexportes aus *source*-Blättern in stark MP17:GFP-exprimierenden Linien könnte durch eine MP17-vermittelte Unterbrechung des symplastischen Transportweges zwischen vaskulärem Gewebe und Mesophyll verursacht sein. Hierfür spricht die Unfähigkeit des Fluoreszenzmarkers Carboxyfluoreszein (CF) in der Col-0-16-Linie aus dem Phloem in umgebende Mesophyllzellen zu diffundieren (Daten F. Vogel in der eingereichten Veröffentlichung Kronberg *et al.* 2007, Abb. 8). Diese Beobachtung scheint mit früheren elektronenmikroskopischen Studien phänotypisch veränderter Blätter in MP17N-exprimierenden Tabakpflanzen konsistent zu sein, die deformierte PDs zwischen Phloemzellen aber nicht innerhalb des Mesophyllgewebes zeigten (Herbers *et al.*, 1997). Dies stimmt auch mit dem offensichtlichen Widerspruch überein, dass die plasmodesmale Transportkapazität im Mesophyll von *source*-Blättern nicht vom MP17-Proteingehalt beeinflusst wurde (Hofius *et al.*, 2001). Vielmehr waren sowohl phänotypische als auch nicht-phänotypische MP17-transgene Tabaklinien durch eine erhöhte plasmodesmale Permeabilität im Mesophyll gekennzeichnet. Das hatte die Autoren veranlasst davon auszugehen, dass die Interaktion von MP17 mit PDs des nicht-vaskulären Gewebes vermutlich nicht zur Assimilatexportdefizienz von Tabakpflanzen mit hohem MP17-Proteingehalten beiträgt. Stattdessen stellten sie die Hypothese auf, dass indirekte metabolische Effekte von MP17 die Kohlenhydratakkumulation und Wachstumsretardierung verursachen, die unabhängig vom veränderten basalen Größenausschlussvermögen („Size exclusion limit“, SEL) der Mesophyll-PDs auftreten. Oder sie vermuteten eine MP17-Expressionslevel-abhängige Beeinflussung der PD-Funktion im vaskulären Leitbündel (Hofius *et al.*, 2001). Das letztere Szenario könnte durch die Ergebnisse der MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien in der vorliegenden Arbeit gestützt werden. Gleichwohl bleibt es noch im Detail aufzuklären, in welchen Zelltypen die plasmodesmalen Verbindungen für die beobachteten

Veränderungen verantwortlich sind. Dies kann z. B. an Hand von Zell-spezifischer MP17-Expression erfolgen (vergl. 3.4 und 4.2).

Ebenso ist relevant, ob der symplastische Transportweg direkt durch die Akkumulation großer MP17-Mengen unterbrochen ist oder eher indirekt, z. B. durch MP-induzierte Kalloseablagerung an PDs. Letzteres wird gestützt durch die nachgewiesene Korrelation von Symptomentwicklung, d. h. drastische Wachstums- hemmung und Akkumulation großer Mengen an Stärke, mit der Behinderung von Mesophyll-PDs durch die Ablagerung von Kallose in TSWV-NS_m-transgenen Tabakpflanzen (Rinne *et al.*, 2005). Unter der Voraussetzung, dass Hitzestress eine Klasse I 1,3-β-D-Glukanase aktiviert (Dinar *et al.*, 1983), konnte dieser Phänotyp revertiert werden. Einen weiteren Hinweis, dass Kallose eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der PD-Permeabilität, auch in *Arabidopsis*, übernimmt, erbrachte die erst kürzliche Identifizierung einer mit PDs assoziierten β-1,3-Glukanase in *Arabidopsis* (Levy *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Kallose als physiologische Barriere bei Virusinfektionen dient (Iglesias und Meins, 2002). Jedoch konnte der oben beschriebene Phänotyp der *Arabidopsis*- und Tabaklinien mit hohem MP17:GFP- bzw. MP17N-Expressionsniveau bei hohen Temperaturen nicht aufgehoben werden (3.3, Abb. 3-16). Die phänotypischen Pflanzen zeichneten sich weiterhin durch hohe MP17N- bzw. MP17:GFP-Proteinlevel aus und in *source*-Blattmaterial ließen sich keine Unterschiede im Kallosegehalt, weder zwischen WT und transgenen Pflanzen noch bei verschiedenen Anzuchttemperaturen, detektieren. Das lässt vermuten, dass in MP17-transgenen Pflanzen die Unterbrechung des symplastischen Transportweges wahrscheinlich nicht auf den Verschluss von PDs bedingt durch Kalloseablagerungen zurückzuführen ist, zumindest nicht in *source*-Blättern, welche bislang in Bezug auf Kallosegehalte untersucht wurden.

Vielmehr könnte in den MP17-transgenen Pflanzen eine gegenseitige Beeinflussung des plasmodesmalen Transportes von MP17 und endogenen Verbindungen, sowohl von kleinen (Photoassimilate) als auch größeren Molekülen (Signalmoleküle, z. B. Transkriptionsfaktoren für die Photoassimilatverteilung), angenommen werden. Es ist sogar eine Konkurrenz um plasmodesmale Bindungsstellen beim selektiven Transport durch die erweiterten, MP-geöffneten PDs nicht auszuschließen, wie es bereits von Almon *et al.* (1997), Balachandran *et al.* (1995) Lucas *et al.* (1993) und Olesinski *et al.* (1995) für TMV-MP geschlussfolgert wurde. Bei diesen Annahmen wird berücksichtigt, dass MPs das vorhandene makromolekulare Transportsystem

von Pflanzen für endogene Moleküle zu ihrer eigenen Ausbreitung ausnutzen (Jorgensen *et al.*, 1998; Crawford und Zambryski, 1999; Ruiz-Medrano *et al.*, 1999). Darüber hinaus wird die Beobachtung mit einbezogen, dass der Einfluss von MPs auf Kohlenhydratverteilung und Biomasseproduktion unabhängig von der MP-vermittelten Erhöhung des SEL sekundärer PDs im Mesophyll ist (Lucas *et al.*, 1993; Balachandran *et al.*, 1995; Hofius *et al.*, 2001). Zugleich wird eine Funktion des PD-vermittelten Transportes im Mesophyll nicht ausgeschlossen, da auch eine Unterbrechung des plasmodesmalen Netzwerkes im Mesophyll zu schweren, infektiionsähnlichen Symptomen infolge von Kohlenhydratakkumulation führte (Rinne *et al.*, 2005).

Die nachgewiesene strikte Dosisabhängigkeit der MP17-induzierten Effekte auf Bereitstellung und Verteilung von Kohlenhydraten und demzufolge der Biomasseproduktion vom MP17:GFP-Expressionsniveau würde diese Hypothese untermauern. Es scheint jedoch auch die Größe des exprimierten MPs in Kombination mit der Expressionsstärke entscheidend zu sein. Von dem 27kDa-kleineren MP17 waren deutlich höhere Proteinlevel notwendig, damit vergleichbare phänotypische Veränderungen wie in den MP17:GFP-transgenen Linien auftraten (3.2). Da bekannt ist, dass MP17 sowohl *in vitro* als auch *in planta* bevorzugt zur Bildung von Homodimeren neigt (Tacke *et al.*, 1993), wäre es möglich, dass kleinere Homodimere aus MP17 den Transport endogener Moleküle nicht so stark behindern wie größere Homodimere aus MP17:GFP.

Da PLRV ausschließlich auf das Phloem begrenzt ist (Taliany *et al.*, 2003), wäre es denkbar, dass MP17 gegenüber PDs dieser Zelltypen eine andere Affinität und Wirkungsweise aufweist als im nicht-vaskulären Gewebe. Das könnte die gegenseitige Beeinflussung oder Konkurrenz von MP17 und endogenen Molekülen noch verstärken, zumal angenommen wird, dass das Leitgewebe besondere Kontrollzentren für den PD-vermittelten Transport enthält (Stitt, 1996; Nelson und van Bel, 1998; Qi *et al.*, 2004). So wurde eine Absättigung von PD-Rezeptoren des Makromolekültransportes bei PVY-Infektion MP17-exprimierender Kartoffellinien postuliert, da eine Breitspektrumresistenz gegenüber verschiedenen Viren beobachtet wurde, ohne dass eine signifikante Induktion von PR-Proteinen nachgewiesen werden konnte (Tacke *et al.*, 1996). Es wäre auch eine negative Beeinträchtigung der PD-Funktion aufgrund von MP-Akkumulation möglich. Allerdings gibt es zurzeit keine direkten Hinweise für diese Hypothese. Die Anwesenheit funktioneller MPs in

Pflanzen durch transiente und stabile Expression oder Virusinfektion war mit einer Erhöhung des plasmodesmalen SEL in verschiedenen Geweben verbunden (Wolf *et al.*, 1989; Ding *et al.*, 1992; Balachandran *et al.*, 1995; Olesinski *et al.*, 1995; Almon *et al.*, 1997; Itaya *et al.*, 1997; Hofius *et al.*, 2001). Jedoch wurden in MP17N-transgenen Tabaklinien mit ausgesprochen hohem Expressionsniveau Deformationen von MP17-lokalisierten PDs im Phloem dokumentiert (Herbers *et al.*, 1997), was diese Theorie – zumindest in Phloemzellen MP17-transgenerer Pflanzen - nicht ausschließen lässt. Es wurde für MPs verschiedener Viren gezeigt, dass sie von einer Zellwand-assoziierten, Calcium-abhängigen Kinase phosphoryliert werden: TMV-MP (Citovsky *et al.*, 1993); PLRV-MP (Sokolova *et al.*, 1997); ToMV-MP (Matsushita *et al.*, 2000); CMV-MP (Matsushita *et al.*, 2002). Diese Phosphorylierung ist essentiell für die Stabilität und Funktion viraler MPs die plasmodesmalen Permeabilitätseigenschaften zu verändern (Waigmann *et al.*, 2000). Es wurde sogar gezeigt, dass eine membranständige Kinase entwicklungspezifisch reguliert wird und ihre Aktivität mit der Entwicklung sekundärer PDs korreliert (Citovsky *et al.*, 1993). Da Pflanzenviren an verschiedenen Stellen mit pflanzlichen endogenen Mechanismen interagieren, um ihre eigene Replikation und Ausbreitung zu fördern (Oparka, 2004), wäre es denkbar, dass sie in begrenztem Maße in Prozesse zur Bereitstellung des für ihre Ausbreitung notwendigen Calciums eingreifen. Bei Anwesenheit sehr hoher MP17-Proteinmengen, wie für phänotypische *Arabidopsis*- und Tabakpflanzen gezeigt (diese Arbeit; Herbers *et al.*, 1997), könnte sich dieser Eingriff gegenteilig auswirken. Ein Anstieg in der zytoplasmatischen Calciumkonzentration bewirkt eine verminderte Phosphorylierung von Calreticulin (Martindale und Salisbury, 1990). Calreticulin ist ein kontraktiles Protein, welches in der eingeschnürten Region von PDs lokalisiert ist (Blackmann *et al.*, 1999). Die Dephosphorylierung veranlasst Centrizinnanofilamente, schnell zu kontrahieren und PDs möglicher Weise zu schließen (Martindale und Salisbury, 1990; Blackmann *et al.*, 1999).

Der oben diskutierte MP17-induzierte Transportblock von Photoassimilaten in *source*-Blättern von transgenen Pflanzen mit hohem Expressionslevel resultierte in einem deutlich verminderten Wuchs. Die Gesamtblattbiomasse der betroffenen Linien betrug nur noch 6%-30% (3.2.3.1). Sie wurde auf eine Reduktion in Gesamtblattzahl und *source*-Blattfläche zurückgeführt, wobei die auffälligste Veränderung in der Abnahme der *source*-Blattfläche bestand. Dies ist in Übereinstimmung mit transgenen Kartoffelpflanzen, die TMV-MP unter der Kontrolle des Chloroplasten-

spezifischen ST-LS1-Promotors exprimierten und bei denen das geringere Blattgewicht der reduzierten Blattfläche zugeschrieben wurde (Olesinski *et al.*, 1996). Die Reduktion in Gesamtblattzahl und *source*-Blattfläche war jedoch nicht so ausgeprägt wie die Abnahme des Blattfrischgewichtes. Daraus ließ sich rechnerisch ermitteln, dass die Blätter trotz drastischer Akkumulation von löslichen Zuckern und Kohlenhydraten (3.2.1, Abb. 3-2) signifikant leichter gewesen sein müssen. Eine mögliche Ursache für das deutlich geringere Blattgewicht könnte in einem geringeren Blattquerschnitt bestehen. Dieser Parameter wurde zwar nicht überprüft, deutet sich jedoch in lichtmikroskopischen Aufnahmen von Blattquerschnitten an (3.4.4, Abb. 3-21). Besonders auffällig war der kleinere Durchmesser der Mittelrippe von Col-0-16. Bei 10-facher Vergrößerung betrug der Durchmesser von Col-0-16 nur 61% vom WT-Wert. Einen Hinweis für eine MP-induzierte Beeinflussung von Blattstiel und Spross geben konstitutiv TMV-MP-exprimierende Tabakpflanzen, in denen signifikante Reduktionen im Sprosstrockengewicht auftraten (Balachandran *et al.*, 1995).

Darüber hinaus können in MP17-exprimierenden Pflanzen auch MP-vermittelte Beeinträchtigungen des Wurzelsystems, wie für TMV-MP-transgene Tabak- und Kartoffelpflanzen beschrieben (Balachandran *et al.*, 1995; Balachandran *et al.*, 1997; Almon *et al.*, 1997), möglich sein. Es wäre aufschlussreich, dies in weiterführenden Arbeiten aufzuklären.

4.1.1.3 Erhöhte plasmodesmale Transporteigenschaften und Virusausbreitung

Im Gegensatz zu der augenscheinlich nachteiligen Auswirkung hoher MP17-Proteingehalte auf den Saccharosetransportweg in *source*-Blättern, welche in drastischer Kohlenhydratakkumulation und Wachstumshemmung resultierten, scheint die erhöhte Blattbiomasseproduktion von *Arabidopsis*-Linien mit niedrigem MP17:GFP-Expressionsniveau (Col-0-9 und C24-81, 3.1.3.1) in einem verbesserten Potential zu Photoassimilatexport und -verteilung begründet zu sein. Der Anstieg der Blattbiomasse war auf eine leichte Zunahme sowohl von Gesamtblattzahl als auch *source*-Blattfläche zurückzuführen, so dass die Blätter – eventuell aufgrund eines verstärkten Blattstieles – signifikant schwerer gewesen sein müssen. Es wäre auch eine Zunahme des Sprossgewichtes denkbar, da TMV-MP-transgene Tabakpflanzen mit entgegengesetzten Auswirkungen auf die Biomasseverteilung durch deutlich

reduzierte Sprossgewichte gekennzeichnet waren (Balachandran *et al.*, 1995). Damit scheint sich die Expression viraler MPs auf die Gesamtanatomie von Pflanzen auszuwirken. Laut Regressionsanalyse zeichnet sich ab, dass sich MP17:GFP-Expressionsraten unterhalb von 30-35% förderlich auf Assimilatbereitstellung und Blattbiomasseproduktion auswirken, während sie beides oberhalb eines Expressionsniveaus von 80% vermindern. Gleichzeitig untermauert es die Bedeutung von symplastischen Netzwerken und Photoassimilatverteilung für das Pflanzenwachstum. In Übereinstimmung damit wurden bei veränderten plasmodesmalen Transporteigenschaften infolge von Tocopheroldeizienz-induzierter Kalloseablagerung (Russin *et al.*, 1996; Botha *et al.*, 2000; Sattler *et al.*, 2003; Hofius *et al.*, 2004; Madea *et al.*, 2006) und Expression von PD-lokalisierten PR-Proteinen (Murillo *et al.*, 2003) sowie veränderten Expressionen von Enzymen des Kohlenhydratmetabolismus (Heyer *et al.*, 2004; Lawson *et al.*, 2006) ebenfalls deutliche Auswirkungen auf Assimilat- und Biomasseverteilung beobachtet.

Die Annahme einer verbesserten plasmodesmalen Transportkapazität in niedrig MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen wird gestützt durch einen erhöhten Saccharoseefflux (3.1.6, Abb. 3-10), der begleitet wird von niedrigeren Gehalten an Saccharose und Stärke in *source*-Blättern (3.1.2, Abb. 3-2). Letzteres wurde bereits früher in MP17N- und MP17:GFP-transgenen Tabaklinien mit geringem MP17-Proteingehalt beobachtet (Hofius *et al.*, 2001). Gleichermaßen erhöhte Saccharoseexportraten wurden infolge konstitutiver Expression von CMV-MP und TMV-MP in Melone (Shalitin *et al.*, 2002) oder Mesophyll-spezifischer Expression von TMV-MP in Kartoffel (Olesinski *et al.*, 1996) nachgewiesen. Sie gingen einher mit geringeren Kohlenhydratgehalten in *source*-Blättern und deuten auf eine verbesserte Transportkapazität aufgrund MP-vermittelter Veränderungen des plasmodesmalen SEL hin. Zwar wurde die plasmodesmale Leitfähigkeit in *source*-Blättern niedrig exprimierender *Arabidopsis*-Linien nicht überprüft. Dennoch lässt die spezifische Fähigkeit von MP17, PDs im Mesophyll von Tabakpflanzen unabhängig vom Proteingehalt zu erweitern (Hofius *et al.*, 2001) vermuten, dass eine erhöhte plasmodesmale Permeabilität im Mesophyll und/oder Phloemgewebe als primäre Ursache für den erhöhten Saccharosetransport, reduzierte Kohlenhydratkkumulation und verbessertes vegetatives Wachstum in den *Arabidopsis*-Linien angesehen werden kann.

Hingegen ergab die Analyse MP17:GFP-transgener *Arabidopsis*-Linien nach Infektion mit dem Potyvirus TuMV, dass keine Korrelation zwischen MP17:GFP-Expressionsniveau und TuMV-Virusausbreitung besteht (3.1.5, Abb. 3-9; 3.1.4, Abb. 3-8). Ähnlich wie in MP17N- und MP17:GFP-transgenen Tabakpflanzen, welche mit dem Potyvirus PVY infiziert wurden (Hofius *et al.*, 2001), deutete sich an, dass es einen unteren Schwellenwert für eine fördernde Wirkung von MP17 auf die TuMV-Ausbreitung gibt. Trotz erhöhter Nährstoffversorgung und Blattbiomasseproduktion ließ sich kein Effekt auf die Virusausbreitung ermitteln (Col-0-9). Das ist in Analogie zur schwach MP17:GFP-exprimierenden Tabaklinie 35S-1-20, bei der eine MP17-induzierte Veränderung in der plasmodesmalen Leitfähigkeit nachgewiesen wurde (Hofius *et al.*, 2001). Bei mittlerer MP17:GFP-Expressionsstärke zeigte sich eine deutliche Erhöhung des TuMV-Virustiters (Col-0-14), während bei hoher MP17:GFP-Expressionsrate eine Verzögerung in der Virusausbreitung zu verzeichnen war. In MP17N-transgenen Tabakpflanzen wurde die verminderte Suszeptibilität der Kohlenhydrat-abhängigen Induktion von PR-Proteinen zugeschrieben (Hofius *et al.*, 2001).

4.1.2 Reproduktive Wachstumsphase

4.1.2.1 MP17:GFP-Dosis-abhängige Effekte auf die Blühinduktion in *Arabidopsis*

Zusätzliche Unterstützung für die Annahme eines erhöhten Nährstoffflusses in verbrauchende *sink*-Organe scheint durch die signifikant beschleunigte Blühinduktion von Col-0-9, C24-81 und C24-84 unter blühinduzierenden Langtagbedingungen gegeben zu sein (3.1.3.2, Abb. 3-5). Es ist bekannt, dass Saccharose eine stimulierende Wirkung auf die Blühinduktion im Sprossapikalsystem (SAM) von *Arabidopsis* und anderen Pflanzenspezies ausübt (Bernier *et al.*, 1993; Corbesier *et al.*, 1998; Roldan *et al.*, 1999). Demzufolge lösten Veränderungen in der *sink*-Stärke zu Gunsten der Assimilatversorgung, wie z. B. bei der Meristem-spezifischen Expression einer Hefe-Zellwand-Invertase, ein vorzeitiges Blühen aus. Im Gegensatz dazu verzögerte eine Reduktion der *sink*-Stärke, vermittelt durch transgene Expression der Invertase im Zytosol, die Blühinduktion (Heyer *et al.*, 2004).

Neben diesem potentiell direkten Effekt einer erhöhten Kohlenhydratverteilung auf die Blühinduktion könnte die verbesserte Assimilatversorgung des SAMs auch indirekt den Phloem-vermittelten Transport von Signalmolekülen, wie den Transkriptionsfaktor *FLOWERING LOCUS T* (FT), erhöht haben. Kürzlich wurde gezeigt, dass FT im Langstreckentransport als Signalprotein zur Blühinduktion in *Arabidopsis* dient (Corbesier *et al.*, 2007). Der entgegengesetzte Effekt von reduziertem Assimilatexport und Versorgung des SAMs scheint sich in der stark verzögerten Blühinduktion der phänotypischen MP17-transgenen Linien widerzuspiegeln. Allerdings kann auch die schwerwiegende Reduktion in der Biomasseproduktion *per se* der Grund für die beobachtete Entwicklungsverzögerung sein. Dennoch war die MP17-induzierte Assimilatexportdefizienz von *Arabidopsis*-Linien mit hohem MP17:GFP-Proteinlevel, drastischer Wachstumsretardierung und verzögerter Blühinduktion von einem verbesserten reproduktiven Wachstum gefolgt. Letzteres manifestierte sich in der teilweisen Aufhebung der vegetativen Wachstumsretardierung bis zur Samenreife.

Erste Effekte waren in der Blattbiomasseproduktion zu Beginn der Blühinduktion erkennbar (3.1.3.2, Abb. 3-4). Bei dieser so genannten generativen Blattbiomasse war die Reduktion in der Gesamtblattzahl der Col-0- und *Ler*-Linien mit hohem MP17:GFP-Expressionsniveau fast vollständig aufgehoben. Es war auch eine Zunahme der *source*-Blattfläche von 32%-37% während der vegetativen Wachstumsphase auf 42%-64% unmittelbar vor Blühbeginn zu beobachten. Dies war begleitet von einem Anstieg des Assimilatexportes im Vergleich zum vegetativen Stadium (3.1.6, Abb. 3-10). Da sich die erhöhte Transportrate am stärksten auf die Blattzahl auswirkte, kann daraus geschlossen werden, dass sie zu Gunsten verbrauchender *sink*-Organe erfolgte. Das resultierte bemerkenswerter Weise in einem signifikanten Anstieg im Samenertrag der beiden Ökotypen Col-0 und *Ler* (3.1.3.3, Abb. 3-6 und 3-7, 3.1.3.4, Abb. 3-9). Die Bestimmung der Ertragsparameter belegte, dass die verbesserte reproduktive Leistung nicht die Konsequenz eines Anstieges in Schotenanzahl oder Samengewicht war, sondern vielmehr aus einer erhöhten Anzahl an Samen pro Schote resultierte. Sie wurde rechnerisch aus dem Mittelwert von Schotenzahl, Samenertrag und 100-Samengewicht ermittelt. Daraus kann vermutet werden, dass die verbesserte Ressourcenverteilung während Samenbildung und -entwicklung die Häufigkeit des Absterbens von Samenanlagen reduziert haben könnte. Dieser Prozess tritt während der reproduktiven Phase häufig

auf, vornehmlich infolge von Nährstofflimitierungen und umweltbedingtem Stress (Sun *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2005).

Interessanter Weise zeigte sich in der Korrelationsanalyse, dass der Fruktosegehalt der konstitutiv MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien ausgesprochen hoch signifikant positiv mit dem Samenertrag korrelierte, während dies für Glukose nicht gegeben war (3.1.5, Abb. 3-9). Hierbei ergeben sich bislang unbekannte Zusammenhänge, in wie weit Fruktose zum Anstieg der reproduktiven Leistung phänotypischer MP17:GFP-transgener *Arabidopsis*-Linien beitragen könnte. Jedoch ist bekannt, dass Glukose und Fruktose als hydrolytische Spaltungsprodukte von Saccharose nicht immer in einem Verhältnis noch 1:1 vorliegen. Beide Monosaccharide sind Abbauprodukte von vakuolärer, Zellwand-gebundener und zytosolischer Invertase (Rolland *et al.*, 2006). Darüber hinaus entsteht Glukose gemeinsam mit Maltose beim Abbau von Stärke durch die Aktivität von plastidärer β -Amylase und Glukosyltransferase, Maltose-Phosphorylase oder α -Glukosidase. Des Weiteren wird Glukose bei der Spaltung von Maltose durch zytosolische Glukosyltransferase freigesetzt sowie beim Zellwandabbau durch 1,3- und 1,4- α -Glukanase und Zellulase (zusammengefasst in Giese, 2005, Abb. 2). Glukose ist ein wichtiger Bestandteil des pflanzlichen Stoffwechsels (Giese, 2005). Dieses Monosaccharid ist am Aufbau von Kohlenhydraten und Strukturpolysacchariden beteiligt, geht aber auch in die Synthese von sekundären Pflanzenstoffen, Aminosäuren, Fettsäuren und Vorstufen von Nukleotidzuckern ein. Daher wäre denkbar, dass es unmittelbar nach seiner Entstehung in einen dieser Prozesse eingeschleust wurde, da die Glukosegehalte in der Regel niedriger waren als die Fruktosegehalte. Lediglich in den phänotypischen Linien Col-0-16, *Ler-1* und *Ler-12* waren sie gegenüber Fruktose erhöht und geben Anlass zur Spekulation, dass der Stoffwechsel dieser Linien verändert sein könnte. Es wurde jedoch auch aufgedeckt, dass der Kohlenhydratmetabolismus im Pollen einiger Pflanzen eher über Fruktokinasen als Hexokinasen erfolgt, wie z. B. im Pollen von Paprika (Karni und Aloni, 2002), *Camellia japonica* und in zwei Lilienarten (Nakamura *et al.*, 1991). Bislang wurden nur wenige Daten über Fruktokinasen in *Arabidopsis* veröffentlicht. Doch lässt die unterschiedliche Gewebespezifität zweier Fruktokinasen in *Arabidopsis* (Gonzali *et al.*, 2001) spezifische und physiologische Funktionen vermuten. Im Genom von Tomate sind vier Fruktokinase-Gene bekannt (Damari-Weissler *et al.*, 2006). Möglicherweise sind auch im *Arabidopsis*-Genom weitere Isoformen vorhanden, die noch nicht gefunden wurden.

Im Gegensatz zu den im Wachstum gehemmten MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien war die phänotypische C24-12-Linie, welche durch ein vielfach höheres MP17-Expressionsniveau gekennzeichnet war als MP17:GFP-transgene Linien, während der reproduktiven Wachstumsphase nicht in der Lage, den drastischen MP17-induzierten Effekten entgegenzuwirken (3.2.3, Abb. 3-15). Sie war mit 25% vom WT-Niveau weiterhin signifikant in der Biomasseproduktion reduziert, was sich ebenfalls in der reproduktiven Leistung widerspiegelte (21%). Es wäre möglich, dass die MP17-vermittelten Eingriffe in Assimilat- und Biomasseverteilung zu schwerwiegend gewesen sind, um sie abzumildern. Gleichzeitig verdeutlichen sie den Bedarf der Pflanze an Mechanismen, um schädlichen Einflüssen gewachsen zu sein.

4.1.2.2 Einfluss hoher MP17:GFP-Expression auf den Ernteindex

Obwohl die stark exprimierenden MP17-transgenen Linien befähigt waren, ihre dramatische vegetative Wachstumsretardierung ab der Blühinduktion abzuschwächen, erreichte die gesamte Biomasseproduktion zum Erntezeitpunkt lediglich 60-70% des Ökotyp-spezifischen Wildtyps. Gemeinsam mit dem gleichzeitigen Anstieg im Samenertrag konnte ein stark verbesserter Ernteindex verzeichnet werden (Abb. 3-7). Dieser demonstriert in verstärktem Maße den MP17-vermittelten Erfolg in der Verteilung von Photoassimilatressourcen gegenüber erntefähigen Organen. Änderungen im Ernteindex von Getreidenutzpflanzen wurden bereits früher für den großen Anstieg im weltweiten Weizen- und Reisertrag während der „Grünen Revolution“ verantwortlich gemacht (Hay, 1995; Sinclair, 1998). Neben neuen Kultivierungsmethoden wurde dieser Fortschritt besonders durch die Einführung neuer Varietäten erreicht. Diese neuen Varietäten waren durch ein Zwergen-ähnliches Wachstum charakterisiert, welches auf mutationsbedingte Änderungen in Biosynthese oder Signaltransduktionsweg des Wachstumshormons Gibberellin zurückzuführen war (GA) (Peng *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 2002; Hedden, 2003). So war die Zunahme im Ertrag von verbesserten Reissorten aufgrund des Einbringens von Zwergenwuchs-bestimmenden Genen das Resultat eines von 0,3 auf 0,5 angestiegenen Ernteindex (Hay, 1995). Die Erhöhung des Ernteindex MP17:GFP-exprimierender *Arabidopsis*-Linien zeigte sich in einem ähnlichen Verhältnis, wie bei

der 1,8-fachen Verbesserung in den Linien *Ler-1* und *Ler-12* nachgewiesen oder sogar höher, wie für Col-0-16 (2,8-fach).

Somit könnte die konstitutive, starke Expression von MP17 eine attraktive Strategie zur Kontrolle von Pflanzenarchitektur und –ertrag sein, eventuell sogar in mit *Arabidopsis* entfernt verwandten Nutzpflanzen. Gleichmaßen könnte die strikte, Ökotyp-unabhängige negative Korrelation zwischen vegetativer Biomasseakkumulation und MP17-Proteingehalt die Selektion auf transgene Linien mit niedrigen MP17-Proteingehalten zur erhöhten Blattbiomasseproduktion beinhalten.

4.1.2.3 PD-Lokalisation und ihre physiologische Auswirkungen unter entwicklungsspezifischer Kontrolle

Der förderliche Effekt von MP17 jeweils entweder auf vegetative oder generative Leistungsfähigkeit bei niedrigen oder hohen Expressionsniveaus scheint durch Veränderungen im symplastischen Transport über die Interaktion mit PDs vermittelt zu sein. Wie oben diskutiert, scheint die verbesserte Assimilatbereitstellung bei niedrigen MP17-Expressionsleveln direkt durch einen Anstieg von symplastischer Permeabilität und Saccharoseefflux im Mesophyll und/oder vaskulären Gewebe von *source*-Blättern verursacht. Im Gegensatz dazu unterbricht die Akkumulation großer Mengen von MP17 an PDs vaskulärer Zellen zunächst die symplastische Permeabilität und den Saccharosetransport in das Phloem kleiner Venen. Das resultiert in der Akkumulation überschüssiger Kohlenhydrate in *source*-Blättern. Jedoch erscheint diese schädliche Wirkung von MP17 mit fortschreitendem Pflanzenalter reversibel zu sein, wie durch die Umstellung auf einen erhöhten Saccharosetransport nach längerem Wachstum unter Langtagkonditionen angedeutet. Zusätzliche Unterstützung für eine Seneszenz-assoziierte Verminderung der MP17-induzierten Unterbrechung von symplastischem Transport und Assimilatexport war durch eine reduzierte Stärkefärbung (Daten F. Vogel in der eingereichten Veröffentlichung Kronberg *et al.* 2007, Abb. 6) gegeben. Des weiteren wurden abnehmende Gehalte an PD-lokalisiertem MP17:GFP (Daten F. Vogel in der eingereichten Veröffentlichung Kronberg *et al.* 2007, Abb. 7) und eine unbeschränkte Entladung von CF aus dem Netzwerk kleiner Venen von älteren Blattstadien im Vergleich zu ausgewachsenen *source*-Blättern gezeigt (Daten F. Vogel in der eingereichten Veröffentlichung Kronberg *et al.* 2007, Abb. 8). Die Quantifizierung der

Gehalte an löslichen Zuckern, Stärke und Maltose in diesen Blattstadien weist außerdem darauf hin, dass akkumulierte Stärke sukzessive metabolisiert wurde (Daten F. Vogel in der eingereichten Veröffentlichung Kronberg *et al.* 2007, Abb. 6) und somit nach der Blühinduktion zusätzliche Kohlenhydratressourcen für die Translokation in reproduktive *sink*-Organe verfügbar gemacht wurden.

In älteren Blattstadien war eine Abnahme der plasmodesmalen Lokalisation und Proteinakkumulation von MP17:GFP (Daten F. Vogel in der eingereichten Veröffentlichung Kronberg *et al.* 2007, Abb. 6 und 7) zu beobachten. Diese Tatsache lässt die Abwesenheit oder eine reduzierte Affinität putativer PD-Rezeptorproteine und den anschließenden proteolytischen Abbau von nicht-lokalisiertem MP17 in seneszenten Blättern vermuten, was an die Situation in *sink*-Blättern erinnert (Vogel *et al.*, 2007). Allgemein wird Blattseneszenz als ein entwicklungspezifischer Prozess angesehen, der zur Rückgewinnung und Mobilisierung von Nährstoffen für die Neuverteilung in andere Pflanzenorgane, wie z. B. zur Samenproduktion, eingeleitet wird (Lim *et al.*, 2006). Daher könnte angenommen werden, dass PDs seneszenten Blätter ein ähnlich hohes Leitvermögen für den symplastischen Transport von Nährstoffen aus dem Mesophyll in vaskuläre Leitgewebe zur Verfügung stellen müssen, wie bei der entgegengesetzten Richtung in *sink*-Blättern (Imlau *et al.*, 1999; Oparka *et al.*, 1999). Die nicht-selektive und unbeschränkte Transportkapazität von PDs in *sink*-Blättern wird während dem Import-Export-Übergang von Photoassimilaten beträchtlich herabgesetzt und von strukturellen Änderungen primärer zu sekundärer PDs im *source*-Gewebe begleitet (Oparka *et al.*, 1999). Obwohl die Ultrastruktur von PDs in seneszenten Blättern nicht im Detail analysiert wurde, deutet die Beobachtung, dass PDs sowohl in *sink*- als auch in seneszenten Blättern nicht von MP17 lokalisiert werden, darauf hin, dass sie strukturelle und eventuell auch funktionelle Gemeinsamkeiten teilen könnten. Aus diesem Grund könnte spekuliert werden, dass der entwicklungspezifische und physiologische Übergang von *source*-Blättern während der Seneszenz von Änderungen in der PD-Architektur und –Durchlässigkeit begleitet wird. Dies könnte zu der Bildung einer distinkten, noch nicht bekannten Klasse von PDs führen, welche zumindest einige funktionelle Analogien zu primären PDs aus *sink*-Blättern aufweist.

4.2 Zell-spezifische MP17-Assoziation und Modulation von Kohlenhydratstatus und Wachstum

Zur Aufklärung, welche plasmodesmalen Verbindungen für die beobachteten MP17-induzierten Effekte in konstitutiv exprimierenden *Arabidopsis*-Linien verantwortlich sein könnten, wurden *Arabidopsis*-Linien mit Zell-spezifischer MP17:GFP-Expression generiert. Sie wurden auf Assimilatbereitstellung und Biomasseproduktion während vegetativem und reproduktivem Entwicklungsstadium untersucht (3.4).

4.2.1 MP17:GFP-Expression in chloroplastenhaltigen Zellen

Die Expression von MP17:GFP in chloroplastenhaltigen Zellen wurde durch die Spezifität des ST-LS1-Promotors aus *Solanum tuberosum* vermittelt. Das ST-LS1-Gen kodiert im Zellkern eine Komponente des Wasser-spaltenden Komplexes aus dem Photosystem II und seine Expression korreliert sehr stark mit dem Vorhandensein von Chloroplasten (Stokhaus *et al.*, 1989). Entsprechend dieser Promotorspezifität war GFP-vermittelte Fluoreszenz in chloroplastenhaltigen Zellen, wie Mesophyll und Bündelscheide, detektierbar jedoch nicht im Xylem (3.4.3, Abb. 3-19). Zunächst unerwarteter Weise trat GFP-Markierung auch in der Zellwand von oberer und unterer Epidermis auf. Wie allerdings in Abb. 3-19 D erkennbar und in persönlicher Diskussion von Dr. M. Melzer (IPK Gatersleben, noch nicht publizierte Daten) bestätigt, enthalten Epidermiszellen ebenfalls voll funktionstüchtige Chloroplasten, die lediglich nicht so groß und zahlreich wie in Mesophyll auftreten. Nach biologistischer Transformation konnte für CMV-MP:GFP gezeigt werden, dass das Fusionsprotein aufgrund von MP-spezifischer Funktion befähigt war, in benachbarte Zellen zu translozieren (Itaya *et al.*, 1997). Ähnliches wurde für das MP dieses Pflanzenvirus bei Expression unter Kontrolle des Mesophyll-spezifischen FBPase-Promotors gezeigt (Wolf, Plasmodesmata-Konferenz 2006). Vermittelte dieser Promotor die Expression von freiem GFP im Mesophyll, verblieb es in diesen Zellen. Hingegen war CMV-MP nach SEL-Erhöhung auch im Phloem detektierbar. Solch ein MP17-vermittelter Transport von GFP in Epidermiszellen scheint hierbei unwahrscheinlich, da GFP nicht in Siebelementen detektierbar war. Das traf sowohl auf die beiden

unabhängigen Linien L700-10 und L700-12 zu als auch auf TuMV-infizierte Pflanzen (Daten nicht gezeigt).

Die spezifische Expression von MP17:GFP in chloroplastenhaltigen Zellen war ausreichend, um in L700-Linien mit hohem MP17:GFP-Expressionsniveau ähnlich schwerwiegende Auswirkungen auf Assimilatverteilung und Biomasseproduktion zu vermitteln wie in den konstitutiv exprimierenden Linien Col-0-16, *Ler-1* und *Ler-12* (3.4). Hierbei bestätigte sich der Dosis-abhängige Einfluss von MP17:GFP ektopisch exprimierenden *Arabidopsis*- (Hofius, 2003; diese Arbeit 3.1) und Tabakpflanzen (Hofius *et al.*, 2001). MP17:GFP-Proteingehalte oberhalb von 90% wirkten sich in der vegetativen Wachstumsphase nachteilig aus auf Kohlenhydratstatus (3.4.4, Abb. 3-20), Blattbiomasse (3.4.5.1, Abb. 3-23 A) und Saccharosetransportkapazität (3.4.6, Abb. 3-26). Während der generativen Wachstumsphase war, konsistent mit konstitutiv MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien, die Zunahme der Blattbiomasseproduktion mit einem leichten Anstieg im Saccharoseefflux verbunden (3.4.5.1, Abb. 2-23 B; 3.4.6, Abb. 3-26) und führte bis zur Samenreife zu einer Abschwächung der MP17-induzierten Hemmungen (3.4.5.2, Abb. 3-25; 3.4.6, Abb. 3-26). Diese Effekte könnten mit der oben beschriebenen entwicklungspezifischen Kontrolle der plasmodesmalen Lokalisierung von MP17 erklärt werden. In Übereinstimmung mit MP17-transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen vermittelte die Expression von TMV-MP unter Kontrolle des ST-LS1-Promotors in transgenen Kartoffeln ebenfalls Veränderungen in Kohlenhydratverteilung und Biomasseproduktion (Olesinski *et al.*, 1996). Die TMV-MP-transgenen Kartoffelpflanzen waren gleichfalls deutlich im Wachstum reduziert, wobei die auffälligsten Effekte die Blattgröße betrafen. Gleichzeitig wurden entsprechend der SEL-Erhöhung geringere Kohlenhydratgehalte in *source*-Blättern gemessen, die von höheren Saccharoseexportraten begleitet waren. Diese MP-vermittelten Effekte auf den Kohlenhydrathaushalt waren jedoch unter Knollen-induzierenden Kultivierungsbedingungen am offensichtlichsten und wurden daher mit dem Knollenwachstum assoziiert. Damit unterstützen die Ergebnisse TMV-MP-transgener Kartoffelpflanzen die Hypothese, dass plasmodesmale Lokalisation von MP17 und ihre physiologischen Effekte unter entwicklungspezifischer Kontrolle stehen.

Die Auswirkungen Chloroplasten-spezifischer MP-Expression legen nahe, dass die plasmodesmalen Verbindungen von Bündelscheide und/oder Mesophyll an der Ausprägung der MP17-induzierten Phänotypen beteiligt sind. Zur genaueren Eingrenzung

der Zellen mit Schlüsselfunktion im symplastischen Transportprozess bietet sich die spezifische Expression in Bündelscheidenzellen an (3.4, 4.2.3) oder im Mesophyll unter Kontrolle des FBPase-Promotors.

4.2.2 Geleitzell-spezifische MP17:GFP-Expression

Zur spezifischen Expression von MP17:GFP in Geleitzellen wurde der AtSUC2-Promotor ausgewählt. Er vermittelt eine stärkere Expression als der ebenfalls Geleitzell-spezifische rolC-Promotor. Die AtSUC2-Promotor-gesteuerte Expression von β -Glukoronidase (GUS) in *Arabidopsis* ist auf das Phloem begrenzt (Truernit und Sauer, 1995) und in histochemischen Analysen war das AtSUC2-Protein ausschließlich in der Plasmamembran von Geleitzellen nachweisbar (Stadler und Sauer, 1996). Entsprechend der Promotorspezifität waren punktuelle, perlschnurartige Anordnungen der GFP-Fluoreszenz ausschließlich auf Geleitzellen beschränkt (3.4.3, Abb. 3-19). Da keine MP17:GFP-Fluoreszenz in den Siebelementen, an Siebplatten oder anderen Zellen ohne Promotoraktivität nachweisbar war, kann davon ausgegangen werden, dass das Expressionsniveau von MP17 in den untersuchten Geleitzell-spezifisch exprimierenden Linien vermutlich zu gering war, um eine MP17-Assoziation an Siebplatten detektieren zu können. Jedoch muss das Fusionsprotein in Siebröhren transportierbar sein, da MP17:GFP bei konstitutiver Expression an Siebplatten nachweisbar war (Hofius *et al.*, 2001; Hofius, 2003), wie es bei freiem GFP (Imlau *et al.*, 1999; Oparka *et al.*, 1999) und CMV-MP:GFP (Itaya *et al.*, 2002) beobachtet wurde. In den untersuchten *Arabidopsis*-Linien war die Geleitzell-spezifische MP17:GFP-Expression nicht mit offensichtlichen Änderungen der Biomasseproduktion und Assimilatverteilung verbunden (3.4.5; 3.4.6). Zwar waren vegetative und generative Leistungsfähigkeit von PEP-4 in einer Anzucht gegenüber der WT-Kontrolle erhöht (Anhang IV, Anzucht 1), allerdings konnte dies in anschließenden Anzuchten nicht wiederholt werden.

In Analogie dazu konnten auch in transgenen Tabakpflanzen, die TMV-MP Geleitzell-spezifisch unter Kontrolle des rolC-Promotors exprimierten, keine Änderungen im Vergleich zum WT beobachtet werden (Balachandran *et al.*, 1995). Hingegen resultierte die rolC-vermittelte Expression von TMV-MP in Tabak in reduzierter Kohlenhydratakkumulation und geringerem Saccharoseexport aus *source*-Blättern (Almon *et al.*, 1997). Ursachen für diese gegensätzlichen Effekte der MP-Expression

in Pflanzen können darin vermutet werden, dass die Untersuchungen in verschiedenen Pflanzenspezies mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund erfolgten, die eine Variabilität der plasmodesmalen Komponenten und infolge dessen der PD-MP-Interaktion bedingen könnte. Es wäre aufgrund der beobachteten Dosis-abhängigen Effekte in konstitutiv MP17-exprimierenden Tabak- (Hofius *et al.* 2001) und *Arabidopsis*-Linien (diese Arbeit) auch möglich, dass *Arabidopsis*-Linien ausgewählt wurden, in denen die Geleitzell-spezifische MP17:GFP-Expression nicht ausreichend war, um sich auf vegetative und generative Leistung auszuwirken. Oder die MP17-Expression in Geleitzellen von *Arabidopsis* hat *per se* keinen Einfluss auf Assimilat- und Makromolekültransport. Gottwald *et al.* (2000) haben gezeigt, dass die apoplastische Phloembeladung von Saccharose in *Arabidopsis* für Wachstum und Entwicklung von essentieller Bedeutung ist. Die Anzahl plasmodesmaler Verbindungen zwischen Siebelement-Geleitzell-Komplex (SE/GZ) und benachbarten Zellen nehmen in den kleinen Venen ausgewachsener *source*-Blätter drastisch ab (Gamalei, 1989; Grusak *et al.*, 1996; Turgeon *et al.*, 2001). Die wenigen verbliebenen PDs werden vermutlich durch Energie-abhängige Mechanismen geschlossen gehalten (Wright und Oparka, 1997). Diese Eigenschaften weisen den SE/GZ-Komplex als wichtige symplastische Domäne aus, die notwendig ist, den hohen Turgordruck im SE/GZ-Komplex aufrecht zu erhalten, um den Langstreckentransport zu ermöglichen (Oparka und Turgeon, 1999). Der noch nicht vollständig aufgeklärte Transport zwischen GZ und SE ist unerlässlich zur Lebenserhaltung der kernlosen SE (Raven, 1991). Durch den Transport von 10 kDa Dextran (Kempers und van Bel, 1997), 27 kDa GFP (Imlau *et al.*, 1999; Oparka *et al.*, 1999), 57 kDa CMV-MP:GFP (Itaya *et al.*, 2002) und 67 kDa GFP:Patatin (Stadler *et al.*, 2005) wurde gezeigt, dass PDs zwischen GZ und SE ein hohes SEL aufweisen. Daraus wurde ein möglicher Transport durch Diffusion zwischen GZ und SE geschlossen (Santa Cruz, 1999; Oparka und Santa Cruz, 2000; Zambryski und Crawford, 2000). Hingegen scheint dies nicht auf die untersuchten Geleitzell-spezifisch MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien zuzutreffen, da GFP-Fluoreszenzsignale ausschließlich auf GZ beschränkt waren (3.4.3, Abb. 3-19) und Immunogoldmarkierungen vorrangig an der Grenze GZ/SE detektierbar waren (Daten nicht gezeigt).

4.2.3 MP17:GFP-Expression in Bündelscheidenzellen

Die Expression von MP17:GFP in Bündelscheidenzellen erfolgte unter Kontrolle des TPA-Promotors, der aus *Flaveria anomala* stammt und dort dem *gdcS*-Gen vorgeschaltet ist. Die Spezifität dieses Promotors für Bündelscheidenzellen wurde über Deletionskonstrukte in Fusion mit dem *GUS*-Reporter gen in transgenen Tabakpflanzen charakterisiert (Chu, 1996). Entsprechend dieser Zellspezifität waren GFP-Markierungen auf Zellwandbereiche von Bündelscheidenzellen beschränkt (3.4.3, Abb. 3-19).

In der vegetativen Wachstumsphase wurden in diesen Linien leicht verminderte Saccharose- und Stärkegehalte nachgewiesen (Anhang V), die begleitet waren von tendenziell erhöhten Saccharoseexportraten (3.4.6, Abb. 3-26) und resultierten in einem minimalen Anstieg der Blattbiomasse (3.4.5.1, Abb. 3-23 A).

Es wird angenommen, dass die Grenzen von Bündelscheidenzellen, entweder mit dem Mesophyll oder Phloem, als Kontrollpunkte für den PD-vermittelten Transport von Photoassimilaten und Makromolekülen, wie viralen und pflanzlichen RNA-Spezies, zwischen vaskulärem und nicht-vaskulärem Gewebe fungieren (Stitt, 1996; Nelson und van Bel, 1998; Qi *et al.*, 2004). Verschiedene Studien haben auch angedeutet, dass vaskuläre Gewebe empfindlich auf Veränderungen der Umweltbedingungen reagieren und somit entscheidend sind für die Regulation von Stressantworten (Orozco-Cardenas *et al.*, 2001; Fryer *et al.*, 2003; Narvaez-Vasquez und Ryan, 2004; Madea *et al.*, 2006). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass PDs der Maismutante *sxd1* am Übergang Bündelscheide/vaskuläres Parenchym bedingt durch Tocopheroldefizienz-vermittelte Kalloseablagerungen verschlossen waren. Das führte zu einer Unterbrechung des Saccharosetransportes zum Phloem kleiner Venen und somit zu Stärkeakkumulationen in *source*-Blättern (Russin *et al.*, 1996; Botha *et al.*, 2000; Sattler *et al.*, 2003).

Aufgrund der beobachteten tendenziell positiven Auswirkung kann vermutet werden, dass Bündelscheidenzellen eventuell eine zentrale Rolle in der Regulation PD-vermittelter Transportprozesse in MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien übernehmen. Es wäre möglich, dass die Expressionsrate der Bündelscheiden-spezifisch MP17:GFP-transgenen *Arabidopsis*-Linien höher war als in den konstitutiv exprimierenden Linien Col-0-9 und C24-81, so dass keine signifikanten Effekte beobachten werden konnten. Da die MP17:GFP-Expression nur in Bündelscheiden-

zellen erfolgte, waren in Western-Analysen keine MP17-Proteinsignale zu detektieren und demzufolge konnten keine Proteingehalte quantifiziert werden. In Northern-Analysen ließen sich keine offensichtlichen Unterschiede in der MP17:GFP-Expressionsstärke der TPΔ-Linien detektieren (3.4.2, Abb. 3-18).

Die förderlichen Effekte der Bündelscheiden-spezifischen MP17:GFP-Expression waren während dem generativen Entwicklungsstadium in Bezug auf Blühinduktion und reproduktive Leistung am offensichtlichsten (3.4.5.2, Abb. 3-24 und Abb. 3-25) und korrelierten mit angestiegenen Saccharoseexportraten (3.4.6, Abb. 3-26). Es wäre denkbar, dass sie gleichfalls durch entwicklungspezifische Veränderungen in der plasmodesmalen Transportkapazität seneszierender *source*-Blätter bedingt werden.

4.3 Vom Phänotyp zum Gen - Charakterisierung und Isolierung von MP17-Suppressormutanten zur genetischen Identifizierung von pflanzlichen MP17-Interaktionspartnern

Die konstitutive und Zell-spezifische Expression von MP17 in transgenen *Arabidopsis*- und Tabakpflanzen belegte den spezifischen Einfluss des viralen MPs auf PDs, Assimilattransport und *sink/source*-Beziehungen (Herbers *et al.*, 1997; Hofius *et al.*, 2001; diese Arbeit). Diese Untersuchungen deuten auf komplexe Interaktionen zwischen Pflanze und MP17 hin, die abhängig sind von MP17-Proteingehalt, -Expression in spezifischen Zellen und Entwicklungsstadium der Pflanze. Somit können die zugrunde liegenden Mechanismen nur über die Identifizierung der/des pflanzlichen Bindungspartner(s) identifiziert werden. Da plasmodesmale Komponenten biochemischen Aufreinigungsansätzen schwer zugänglich sind, wurde in der Modelnpflanze *Arabidopsis* ein genetischer Ansatz zur Identifizierung von Mutanten mit veränderten plasmodesmalen Bindungs- und Transporteigenschaften entwickelt (Hofius, 2003)

Ausgehend von der phänotypischen Linie Col-0-35S-MP17:GFP-16 (NM) wurde eine EMS-mutagenisierte Population erzeugt und über optische Durchmusterung in der M2-Nachkommenschaft ca. 30 Revertanten mit WT-ähnlichem Wachstum identifiziert, welche mittels molekularer und zellbiologischer Analyse klassifiziert wurden (Hofius, 2003). Es wurden Mutanten mit instabilem *MP17*-Transkript, mit

MP17-Transkriptakkumulation, mit nachweisbarem Fusionsprotein sowie mit detektierbarer GFP-Lokalisierung des Fusionsproteins in Zellwandbereichen erhalten.

Die molekulare Analyse einiger ausgewählter Vertreter der verschiedenen Kategorien in der M3-Generation lässt darauf schließen, dass es sich um stabile Mutationen handelt (3.5.1, Abb. 3-27). Im Wesentlichen konnte auch die plasmodesmale Lokalisierung bestätigt werden. Mit Immunogoldmarkierungen der Klasse II-Suppressormutanten waren keine Lokalisierungen an intrazellulären Strukturen oder Zellwandbereichen nachweisbar. Diese ließen jedoch auch keine strukturellen Veränderungen der PDs in den Mutanten erkennen (Daten nicht gezeigt). Lediglich bei den Mutanten PG p 6-2-1 und PG p 6-3-1 ließen sich entgegen früherer Fluoreszenzlokalisierungen vereinzelte, schwache GFP-Markierungen detektieren. Sie waren auf den Zell-zu-Zell-Kontakt von Epidermiszellen in *source*-Blättern beschränkt, welche die Trichombasiszellen strahlenförmig umgeben (3.5.1, Abb. 3-28). Trichom-PDs unterscheiden sich strukturell und funktionell deutlich von Mesophyll-PDs. Im Mesophyll können MPs das plasmodesmale SEL für den Transport von Dextranen erhöhen (Fujiwara *et al.*, 1993; Noueirry *et al.*, 1994; Waigmann *et al.*, 1994; Hofius *et al.*, 2001). Allerdings war mikroinjiziertes TMV-MP in Trichomzellen von Tabak nicht befähigt, das basale SEL von 7 kDa für den Transport von Dextranen anzuheben, obwohl es selber (30 kDa) und (GUS):TMV-MP (90 kDa) zwischen den Trichomzellen translozierten (Waigmann und Zambryski, 1995). Ultrastrukturelle Analysen gaben Aufschluss, dass die Komplexität von Trichom-PDs von der Spitze zur Basiszelle zunimmt und sich auch die Halsregion, von der angenommen wird, dass sie den molekularen Transport durch PDs kontrolliert, deutlich von Mesophyll-PDs unterscheidet (Waigmann *et al.*, 1997). Darauf basierend kann spekuliert werden, dass PDs in Epidermiszellen an der Basis von Trichomen andere Komponenten als Mesophyll-PDs enthalten, die eine plasmodesmale Lokalisierung von MP17 ermöglichen, während dies in anderen Zelltypen nicht der Fall war.

Interessanterweise war ein Zusammenhang zwischen MP17-Expressionsniveau der Suppressormutanten und ihrer plasmodesmalen Lokalisierung erkennbar (3.5.1). Revertanten der Klasse III mit Zellwand-lokalisierter GFP-Fluoreszenz zeichneten sich durch einen MP17:GFP-Proteingehalt von 47% bezogen auf die Referenz- und Parentallinie NM aus. In den MP17:GFP-Mutanten der Klasse II erreichte er 26%-42%.

Diese Ergebnisse untermauern die Annahme, dass eine Mutation im plasmodesmalen Rezeptor zu einer veränderten Positionierung von MP17 an PDs geführt haben könnte, zu einer Inhibierung der MP17-Bindung an den plasmodesmalen oder einen intrazellulären Rezeptor (Hofius, 2003). Inzwischen konnte für einen Großteil der Mutanten ausgeschlossen werden, dass Mutationen in Promotorregion oder offenem Leserahmen erzeugt wurden (Daten F. Vogel). Darüber hinaus gibt es deutliche Anzeichen, dass *MP17:GFP*-Transkripte der Suppressormutanten PG nr 12-1-1 und PG nr 17-4-1 durch mikroRNA-vermitteltes Silencing abgebaut werden (Diplomarbeit K. Paulus).

Physiologische und zellbiologische Untersuchungen der M3-Suppressormutanten belegen, dass sich die Reversion des MP17-vermittelten Phänotyps (3.5.2, Abb. 3-29 A, B) auch in der Aufhebung von Kohlenhydratakkumulation (3.5.2, Abb. 3-29 C), leicht verminderter Virusanfälligkeit (3.5.3, Abb. 3-31), verzögerter Blühinduktion (3.5.2, Abb. 3-30 A, B) und erhöhter Samenproduktion (3.5.2, Abb. 3-30 C) widerspiegelte. Lediglich die Revertanten mit instabilem *MP17*-Transkript in *source*-Blättern blühten deutlich verspätet. Allerdings kann an Hand der genetischen Analyse nicht ganz ausgeschlossen werden, dass dieser entwicklungspezifische Effekt auf multiple Mutationen zurückzuführen ist.

Neben der Reversion des MP17-induzierten Phänotyps wurden die Suppressormutanten genetisch untersucht. Da sich eine markergestützte Kartierung der Mutationen anschließt, wird als Voraussetzung dafür angenommen, dass die zu kartierenden Mutationen rezessiv und in einem monohybriden Erbgang vorliegen. Die Spaltungsanalyse in der F₂-Generation nach zwei Rückkreuzungszyklen wies PG p 6-2-1RR und PG f 10-3-1RR als Linien aus, in der eine einzelne Mutation rezessiv vorliegt (3.4.5, Tab. 3-2). In Bezug auf PG nr 12-1-1RR, PG nr 17-4-1RR, PG r 10-5-1RR, PG r 23-2-1RR, PG p 6-3-1RR, PG p 8-2-2RR und PG f 8-6-2RR konnte kein rezessives Spaltungsverhältnis ermittelt werden. Mögliche Ursachen hierfür können darin bestehen, dass eine dominante Mutation vorliegt und/oder die Mutation nicht entsprechend der klassischen Mendel'schen Genetik vererbt wird und/oder mehrere Loci von EMS-bedingten Mutationen betroffen sind. Sollten die Suppressormutanten weiterhin multiple Mutationen enthalten, könnten diese durch weitere Rückkreuzungszyklen ausgekreuzt werden.

Der Komplementationstest kann nicht durchgeführt werden, um die Allelizität dominanter Mutationen zu bestimmen. Stattdessen ist es möglich, Rekombinations-

tests für diese Untersuchungen anzuwenden. Dazu werden die homozygoten Mutanten zunächst miteinander gekreuzt, die F₁-Generation geselbstet und die Phänotypen der daraus resultierenden F₂-Generation durchmustert. Wenn zwei dominante Mutationen unabhängig voneinander sind, so würde 1/16 der Nachkommenschaft homozygot für das rezessive, nicht-mutagenisierte Allel der beiden Mutationen sein. Sollten keine nicht-mutagenisierten Parentalpflanzen erhalten werden, wären beide Mutationen allelisch zueinander oder miteinander verbunden (Weigel und Glazebrook, 2002). Des Weiteren kann mittels der so genannten „bulked-segregant analysis“ der Kartierungspopulation (Lukowitz *et al.*, 2000) verifiziert werden, auf welchem Chromosomenarm die Mutation durch das chemische Agens EMS eingeführt wurde. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass das Dominanzverhältnis bekannt ist. Über diese Alternativen des Komplementationstestes kann letztendlich auch für dominante Mutationen festgestellt werden, ob die Mutation in den Allelen des gleichen Gens vorliegt.

Hingegen ähnelte die Nachkommenschaft der Kreuzungen von f 10-3-1R x p 6-2-1R, p 6-3-1 x f 10-3-1R, f 10-3-1R x p 6-3-1R und p 6-3-1 x p 6-2-1 phänotypisch und im MP17-Expressionsniveau der NM-Parentallinie (3.4.5, Tab. 3-3). Daraus kann geschlossen werden, dass Mutationen dieser Revertanten die Allele verschiedener Gene betreffen und sich gegenseitig komplementieren können. Diese nicht-allelischen MP17:GFP-Mutanten wären somit für eine Identifizierung der mutierten Allele mittels markergestützter Kartierungsverfahren und Isolation der betroffenen Gene geeignet. Allerdings deutete sich an, dass die Suppressormutante p 6-2-1R maternal eventuell noch eine weitere Mutation vererben könnte, da sich nur die Nachkommen aus den Kreuzungskombinationen f 10-3-1R x p 6-2-1R und p 6-3-1R x p 6-2-1R komplementieren konnten und den Phänotyp der NM-Parentallinie zeigten, während dies nicht zutraf, wenn p 6-2-1R als Mutterpflanze eingesetzt wurde.

Zur Genklonierung mittels markergestützter Kartierungsverfahren wurde ein *Ler*-Kreuzungspartner der Mutanten zur Erstellung der Kartierungspopulation erzeugt, der wie die NM-Parentallinie nur eine MP17:GFP-Insertion trägt und diese am gleichen Genort vorliegt. Da sich dieser Kreuzungspartner aufgrund dessen durch die gleichen molekularen Eigenschaften auszeichnet wie die NM-Parentallinie, besteht ein wesentlicher Vorteil darin, die aus 3000-4000 oder sogar mehr Individuen bestehende F₂-Generation optisch durchmustern zu können, um 200-300 Rekombinante

für die Feinkartierung zu identifizieren (Jander *et al.*, 2002). Die Generation des Kreuzungspartners erfolgte durch die Kreuzung von NM mit *Ler* WT-Pflanzen und die Einkreuzung MP17:GFP-exprimierender Pflanzen in *Ler* WTs über mehrere Zyklen, um MP17 in einem möglichst reinen *Ler*-Hintergrund zu erhalten (3.5.5, Abb. 3-34). Diese Strategie birgt die Gefahr, dass der Kreuzungspartner noch Col-0-Verunreinigungen enthält. Durch eine genomweite Kartierung mit 21 zufällig über das gesamte *Arabidopsis-Genom* verteilten SSLP-Markern wurde dies weitestgehend versucht auszuschließen. Würde eine Kartierungspopulation mit *Ler* WT-Pflanzen als Kreuzungspartner generiert, wäre keine phänotypische Durchmusterung der F₂- und F₃-Tochtergenerationen möglich. Optional können auch unabhängige, mit dem p35S-1-Konstrukt (Hofius *et al.*, 2001) transformierte *Ler*-Linien mit vergleichbaren phänotypischen Änderungen wie in NM in die Kreuzung eingesetzt werden. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Spaltungsanalysen erschwert werden, da die Insertion mit hoher Wahrscheinlichkeit an einem anderen Genort erfolgt und die homozygoten Linien eventuell mehr als eine Kopie der binären Expressionskassette tragen.

Die homozygoten Nachkommen des durch NM-Einkreuzung erhaltenen Kreuzungspartners *Ler*NM8S wiesen ein mit NM vergleichbares MP17:GFP-Expressionsniveau auf, welches ähnliche biochemische und physiologische Auswirkungen auf die Phänotypausprägung zur Folge hatte (3.5.5, Abb. 3-35). Aufgrund dessen, dass der Samenertrag nur von einer kleinen Population aus 5 Pflanzen bestimmt wurde und die reproduktive Leistung starken Schwankungen unterworfen ist, war nur ein tendenzieller Anstieg im Samenertrag von *Ler*NM8S nachzuweisen. Für eine abgesicherte Statistik wären mehr Pflanzen notwendig. Allerdings ist dieser Faktor für die nachfolgenden Kartierungsarbeiten nicht essentiell, denn die phänotypische Durchmusterung der F₂-Generation erfolgt während der vegetativen Wachstumsphase. In diesem Entwicklungsstadium ließ sich eine auffällige und konsistente Reduktion der Blattbiomasse nachweisen. Auch die Stärkeakkumulation war nicht so ausgeprägt wie in der NM-Parentallinie. Dies traf jedoch auch bei *Ler*-1 und *Ler*-12 zu (3.1.2, Abb. 3-2).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Von Viren kodierte „Movement Proteine“ (MPs) interagieren mit Komponenten des pflanzlichen Transportsystems, wobei Plasmodesmen (PDs) als zytoplasmatische Zell-zu-Zell-Verbindungen eine zentrale Rolle im symplastischen Transport übernehmen. Ziel dieser Arbeit war die Analyse von MP17-vermittelten Änderungen plasmodesmaler Transporteigenschaften in Hinblick auf entwicklungspezifische und MP17-Dosis-abhängige Effekte in genetisch zugänglichen *Arabidopsis*-Pflanzen.

(1) Die konstitutive Expression von PLRV-MP17:GFP in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen mit Lokalisierung des GFP-fusionierten MP17 an verzweigten PDs verschiedener Zelltypen (Hofius, 2003) resultierte in Veränderungen von Kohlenhydratstatus, Biomasseakkumulation und Samenertrag, unabhängig vom Ökotyp aber streng gebunden an die MP17:GFP-Proteinmenge. Niedrige MP17:GFP-Expressionslevel führten zu einer erhöhten vegetativen Blattbiomasseproduktion in Begleitung von geringeren Kohlenhydratgehalten bei gleichzeitig angestiegenen Saccharosetransportraten. Gegenteilige Effekte in Form von starker Wachstumsretardierung, massiver Kohlenhydratakkumulation in *source*-Blättern und verzögerte Virusausbreitung traten bei hohen MP17:GFP-Proteingehalten auf. In der reproduktiven Wachstumsphase war die Inhibition des Assimilatexportes in stark MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen aufgehoben und führte zu verbessertem Samenertrag und Ernteindex. Die Reversion des symplastischen Transportblocks in späteren Entwicklungsstadien lässt auf Änderungen der PD-Struktur und -Funktion während fortschreitender Blattseneszenz schließen.

Die beobachteten Effekte konnten auch bei Expression von MP17 ohne GFP-Fusionspartner erreicht werden. Allerdings waren hierbei wesentlich höhere Proteinlevel zur Ausprägung vergleichbarer, phänotypischer Änderungen notwendig als in Fusionsprotein-exprimierenden Pflanzen. Die beobachteten phänotypischen Veränderungen sind vermutlich nicht auf Kallose zurückzuführen, da keine signifikant erhöhten Kallosegehalte nachzuweisen waren. Daher deutet sich an, dass die Effekte eher durch MP17 induziert werden.

(2) Um den Zelltyp zu bestimmen, der für die phänotypischen, MP17-induzierten Änderungen verantwortlich ist, wurde MP17:GFP unter der Kontrolle von spezifischen Promotoren für chloroplastenhaltige, Bündelscheiden- und Geleitzellen exprimiert. Mittels biochemischer und physiologischer Analysen konnte die dosisabhängige Ausprägung des MP17-vermittelten Phänotyps auf die plasmodesmalen Verbindungen in chloroplastenhaltigen Zellen eingegrenzt werden. Dabei scheint es einen oberen Schwellenwert des MP17:GFP-Expressionsniveaus für den förderlichen Effekt in Hinblick auf Samenertrag zu geben. Eine erhöhte reproduktive Leistung korrelierte mit der MP17:GFP-Expression in Bündelscheidenzellen, so dass vermutet werden kann, dass diesen Zelltypen eine Schlüsselfunktion an der Regulation der PD-vermittelten Assimilat- und Biomasseverteilung zukommt, wobei die Veränderungen erst während dem reproduktivem Entwicklungsstadium signifikant waren. Der Beitrag der plasmodesmalen Verbindungen von Geleitzellen an Assimilatbereitstellung und -verteilung konnte in den analysierten transgenen Linien, in denen keine augenscheinlichen Auswirkungen auf Kohlenhydratgehalte und Biomasseproduktion auftraten, aufgrund der geringen Expressionsstärke nicht abschließend aufgeklärt werden.

(3) Durch Selbstung von M2-Suppressormutanten mit Reversion der MP17-vermittelten Wachstumshemmung konnte gezeigt werden, dass die identifizierten Revertanten molekular stabile Mutationen tragen. Metabolische, physiologische und virologische Analysen belegen, dass der MP17-induzierte Phänotyp in den Suppressormutanten vollständig aufgehoben war. Mittels genetischer Charakterisierung konnten PG p 6-2-1RR und PG f 10-3-1RR als Kandidaten mit rezessiver Mutation identifiziert werden, die zur Identifizierung der zugrunde liegenden Mutation mittels markergestützter Kartierungsverfahren geeignet sind. Zu diesem Zweck wurde, ausgehend von der phänotypischen Parentallinie Col-0-35S-MP17:GFP-16 (Col-0-16, NM), durch Einkreuzung MP17:GFP-exprimierender Individuen über insgesamt 8 Zyklen, ein Kreuzungspartner zur Erzeugung der Kartierungspopulation erhalten, der durch identische molekulare und vergleichbare phänotypische Eigenschaften gekennzeichnet ist wie die NM-Parentallinie.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

35S	CaMV 35S Promotor
Abb.	Abbildung
<i>A. t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat-p-toluidin
BDMV	<i>Bean dwarf mosaic virus</i>
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CCMV	<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i>
cDNA	“complementary DNA”, komplementäre DNA
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CLSM	“Confocal laser scanning microscope”, konfokales Laser-skanning-Mikroskop
cm	Zentimeter
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
Col-0	Columbia
CP	Capsid Protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	“days post infection”, Tage nach Infektion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylenmonosulfat
F	Tochtergeneration bei Kreuzungen
FG	Frischgewicht
g	Gramm oder Erdbeschleunigung

GFP	“Green Fluorescent Protein“, Grün Fluoreszierendes Protein
GUS	β-Glukoronidase
GZ/SE-Komplex	Geleitzell/Siebelement-Komplex
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-N´-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-Galaktopyranosid
IgG	Immunglobulin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L700	Promotor des <i>ST-LS1</i> -Gens aus <i>Solanum tuberosum</i>
<i>Ler</i>	<i>Landsberg erecta</i>
LMV	<i>Lettuce mosaic virus</i>
μE	mikro-Einstein (μmol Photonen m ⁻² s ⁻¹)
m	Meter oder Milli
mg	Milligramm
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MP	„Movement Protein“, Transportprotein
MS	Salze bzw. Nährmedium nach Murashige und Skoog
n	Nano
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
<i>N. t.</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD	optische Dichte
ORF	“open reading frame“, offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	“Polymerase Chain Reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PD	Plasmodesma
PEP	deletierter <i>AtSUC2</i> -Promotor aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
PG	“parental group“, Parentalgruppe
pH	potential Hydrogenii
PLRV	<i>Potato leafroll virus</i>
PR-Protein	“pathogenesis-related protein“, Pathogen-induziertes Protein
PVX	<i>Potato virus X</i>

PVY	<i>Potato virus Y</i>
RbcS	“Rubisco small subunit “, kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
RCNMV	<i>Red clover necrotic mosaic viurs</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNN	Samsun NN (<i>Nicotiana tabacum</i>)
sog.	sogenannt
SqLCV	<i>Squash leaf curl virus</i> ,
<i>S. t.</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
T	Tochtergeneration zur Erzeugung hozygoten Saatgutes
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TG	Trockengewicht
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TP Δ	Protmotor des <i>gdcS</i> T-Gens aus <i>Flaveria anomala</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
Tris	Tri-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tx	Tochtergeneration bei transgenen Linien
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
vergl.	vergleich
Vol.	Volumen
vs.	versus
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aktins, D., Hull, R., Wells, B., Robberts, K., Moore, P. und Beachy, R. N.** (1991). The tobacco mosaic virus 30K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *Journal of General Virology* **72**: 209-211.
- Almon, E., Horowitz, M., Wang, H. L., Lucas, W. J., Zamski, E. und Wolf, S.** (1997). Phloem-Specific Expression of the Tobacco Mosaic Virus Movement Protein Alters Carbon Metabolism and Partitioning in Transgenic Potato Plants. *Plant Physiology* **115**: 1599-1607.
- Alonso-Blanco, C., El-Assal, S. E.-D., Coupland, G. und Koornneef, M.** (1998). Analysis of Natural Allelic Variation at Flowering Time Loci in the Landsberg *erecta* and Cape Verde Islands Ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**: 749-764.
- Ashby, J., Boutant, E., Seemanpillai, M., Sambade, A., Ritzenthaler, C. und Heinlein, M.** (2006). Tobacco Mosaic Virus Movement Protein Functions as a Structural Microtubule-Associated Protein. *Journal of Virology* **80** (17): 8329-8344.
- Badur, R.** (1998). Molekularbiologische und funktionelle Analyse von pflanzlichen Isoenzymen am Beispiel der Fruktose-1,6-Bisphosphat Aldolase, Phosphoglucose-Isomerase und der 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase. Dissertation. Universität zu Göttingen, Göttingen, Deutschland.
- Balachandran, S., Hull, R. J., Vaadia, Y., Wolf, S. und Lucas, W. J.** (1995). Alteration in carbon partitioning induced by the movement protein of tobacco mosaic virus originates in the mesophyll and is independent of change in the plasmodesmal size exclusion limit. *Plant, Cell & Environment* **18**: 1301-1310.
- Balachandran, S., Hull, R. J., Martins, R. A., Vaadia, Y. und Lucas, W. J.** (1997). Influence of Environmental Stress on Biomass Partitioning in Transgenic Tobacco Plants Expressing the Movement Protein of Tobacco Mosaic Virus. *Plant Physiology* **114**: 475-481.
- Baluska, F., Cvrckova, F., Kendrick-Jones, J. und Volkmann, D.** (2001). Sink Plasmodesmata as Gateways for Phloem Unloading. Myosin VIII and Calreticulin as Molecular Determinants of Sink Strength? *Plant Physiology* **126**: 39-46.
- Bechthold, N., Ellis, J. und Pelettier, G.** (1993). In planta Agrobacterium-mediated transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Academy of Sciences Paris* **316**: 1194-1199.
- Beebe, D. U. und Turgeon, R.** (1991). Current perspectives on plasmodesmata: structure and function *Physiologia Plantarum* **83**: 194-199.
- Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A. und Lejeune, P.** (1993). Physiological Signals That Induce Flowering. *The Plant Cell* **5**: 1147-1155.

- Blackmann, L. M. und Overall, R. L.** (1998). Immunolocalisation of the cytoskeleton to plasmodesmata of *Chara corallina*. *Plant Journal* **14**: 733-741.
- Blackmann, L. M., Harper, J. D. I. und Overall, R. L.** (1999). Localisation of a centrin-like protein to higher plant plasmodesmata. *European Journal of Cell Biology* **78**: 297-304.
- Boevink, P. und Oparka, K.** (2005). Virus-Host Interactions during Movement Process. *Plant Physiology* **138**: 1815-1821.
- Bostwick, D. E., Dannenhoffer, J. M., Skaggs, M. I., Lister, R. M., Larkins, B. A. und Thompson, G. A.** (1992). Pumpkin phloem lectin genes are specifically expressed in companion cells. *Plant Cell* **4**: 1538-1548.
- Botha, C. E. J., Hartley, B. J. und Cross, R. H. M.** (1993). The ultrastructure and computer-enhanced digital image analysis of plasmodesmata at the Kranz mesophyll-bundle sheath interface of *Themeda triandra* var. *imberbis* (Retz) A. Campus in conventionally-fixed leaf blades. *Annals of Botany* **72**: 255-261.
- Botha, C. E. J., Cross, R. H. M., van Bell, A. J. E. und Peter, C. I.** (2000). Phloem loading in the sucrose-export-defective (*SXD-1*) mutant maize is limited by callose deposition at plasmodesmata in bundle sheath-vascular parenchyma interface. *Protoplasma* **214**: 65-72.
- Boyko, V., Ferralli, J., Ashby, J., Schellenbaum, P. und Heinlein, M.** (2000). Function of microtubules in intracellular transport of plant virus RNA. *Nature Cell Biology* **2**: 826-832.
- Boyko, V., Ferralli, J., Ashby, J., Schellenbaum, P. und Heinlein, M.** (2000a). Function of microtubules in intracellular transport of plant virus RNA. *Nature Cell Biology* **2**: 826-832.
- Bret-Harte, M. S. und Silk, W. K.** (1994). Nonvascular, symplasmic diffusion of sucrose cannot satisfy the carbon demands of growth in the primary root tip of *Zea mays* L. *Plant Physiology* **105**: 19-33.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M.** (1987). XLI-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-378.
- Bürkle, L., Hibberd, J. M., Quick, W. P., Kühn, C., Hirner, B. und Frommer, W. B.** (1998). The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology* **118**: 59-68.
- Cantrill, L. C., Overall, R. L. und Goodwinn, P. B.** (1999). Cell-to-cell communication via plant endomembranes. *Cell Biol Int* **23**: 653-661.
- Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K. und Schaad, M. C.** (1996). Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *The Plant Cell* **8**: 1669-1681.

- Carrington, J. C., Jensen, P. und Schaad, M. C.** (1998). Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *The Plant Journal* **14** (4): 393-400.
- Chaffey, N. und Barlow, P.** (2001). The cytoskeleton facilitates a three-dimensional symplasmic continuum in the long-lived ray and axial parenchyma cells of angiosperm trees. *Planta* **213**: 811-823.
- Chen, M. H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A. K. und Citovsky, V.** (2000). Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *The EMBO Journal* **19** (5): 913-920.
- Chiou, T. J. und Bush, D. R.** (1999). Sugar transporters in plant biology. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 187-91.
- Chu, C.** (1996). Molecular Structure and Expression Pattern of Glycine Decarboxylase Genes from *Flaveria springlei* (C3) and *Flaveria anomala* (C3-C4). Martin-Luther Universität, Halle, Deutschland.
- Church, G. M. und Gilbert, W.** (1984). Genomic Sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1991-1995.
- Citovsky, V., Wong, M. L., Shaw, A. L., Venkataram Prasad, B. V. und Zambryski, P.** (1992). Visualization and Characterization of Tobacco Mosaic Virus Movement Protein Binding to Single-Stranded Nucleic Acids. *The Plant Cell* **4**: 397-411.
- Citovsky, V., McLean, B. G., Zupan, J. R. und Zambryski, P.** (1993). Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes & Development* **7**: 904-910.
- Clak, A. M., Jacobsen, K. R., Bostwick, D. E., Dannenhoffer, J. M., Skaggs, M. I. und Thompson, G. A.** (1997). Molecular characterization of a phloem-specific gene encoding the filament protein, phloem protein 1 (PP1), from *Cucurbita maxima*. *Plant Journal* **12**: 49-61.
- Clough, S. J. und Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 735-743.
- Cook, M. E., Graham, L. E., Botha, C. E. J. und Lavin, C. A.** (1997). Comparative ultrastructure of plasmodesmata of *Chara* and selected bryophytes: toward an elucidation of the evolutionary origin of plant plasmodesmata. *American Journal of Botany* **84**: 1169-1178.
- Corbesier, L., Lejeune, P. und Bernier, G.** (1998). The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* **206** (1): 131-137.

- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C. und Coupland, G.** (2007). FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signalling in Floral Induction of Arabidopsis. *Science*.
- Crawford, K. und Zambryski, P.** (1999). Plasmodesmata signaling: many roles, sophisticated statutes. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 382-387.
- Crawford, K. und Zambryski, P.** (2001). Non-Targeted and Targeted Protein Movement through Plasmodesmata in Leaves in Different Developmental and Physiological States. *Plant Physiology* **125**: 1802-1812.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M. C. und Carrington, J. C.** (1995). Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase *Plant Cell* **7**: 549-559.
- Cutler, S. R., Ehrhardt, D. W., Griffitts, J. S. und Somerville, C. R.** (2000). Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (7): 3718-3723.
- Damari-Weissler, H., Kandel-Kfir, M., Gidoni, D., Mett, A., Beusov, E. und Granot, D.** (2006). Evidence for intracellular spatial separation of hexokinases and fructokinases in tomato plants. *Planta* **224** (6): 1595-1502.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. und Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-delivered vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research* **13** (13): 4777-4788.
- Dinar, M., Rudich, J. und Zamski, E.** (1983). Effects of heat stress on carbon transport from tomato leaves. *Ann. Bot.* **51**: 97-103.
- Ding, B., Haudenschild, J. S., Hull, R. J., Wolf, S., Beachy, R. N. und Lucas, W. J.** (1992). Secondary Plasmodesmata are Specific Sites of Localization of the Tobacco Mosaic Virus Movement Protein in Transgenic Tobacco Plants. *The Plant Cell* **4**: 915-928.
- Ding, B., Turgeon, R. und Parthasarathy, M. V.** (1992b). Substructure of freeze-substituted plasmodesmata. *Protoplasma* **169**: 28-41.
- Ding, B.** (1998). Intercellular protein trafficking through plasmodesmata. *Plant Molecular Biology* **38**: 279-310.
- Ding, X. S., Carter, S. A., Deom, C. M. und Nelson, R. S.** (1998). Tobamovirus and Potyvirus Accumulation in Minor Veins of Inoculated Leaves form Representatives of the Solanaceae and Fabaceae. *Plant Physiology* **116**: 125-136
- Ding, B., Itaya, A. und Woo, Y. M.** (1999). Plasmodesmata and cell-to-cell communication in plants. *International Review of Cytology* **190**: 251-316.

- Dolja, V. V., Haldeman, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G. und Carrington, J. C.** (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO Journal* **13**: 1482-1491.
- Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandenbosch, K. A. und Carrington, J. C.** (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* **206**: 1007-1016.
- Dorokhov, Y. L., Mäkinen, K., Frolova, O. Y., Merits, A., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Atabekov, J. G. und Saarma, M.** (1999). A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Letters* **461**: 223-228.
- Epel, B. L.** (1994). Plasmodesmata: composition, structure and trafficking. *Plant Molecular Biology* **26**: 1343-1356.
- Escobar, N. M., Haupt, S., Thow, G., Boevink, E., Chapman, S. und Oparka, K.** (2003). High-Throughput Viral Expression of cDNA-Green Fluorescent Protein Fusions Reveals Novel Subcellular Addresses and Identifies Unique Proteins That Interact with Plasmodesmata. *The Plant Cell* **15**: 1507-1523.
- Evert, R. F. und Russin, W. A.** (1993). Structurally, phloem unloading in the maize leaf cannot be symplastic. *Am. J. Bot.* **80**: 1310-1317.
- Fisher, D. B. und Oparka, K.** (1996). Post-phloem transport: principles and problems. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1141-1154.
- Fisher, D. B.** (1999). The estimated pore diameter for plasmodesmal channels in the Abutilon nectary trichome should be about 4 nm rather than 3 nm. *Planta* **208**: 299-300.
- Franceschi, V. R., Ding, B. und Lucas, W. J.** (1994). Mechanism of plasmodesmata formation in characean algae in relation to evolution of intercellular communication in higher plants. *Planta* **192**: 347-358.
- Fryer, M. J., Ball, L., Oxborough, K., Karpinski, S., Mullineaux, P. M. und Barker, N. R.** (2003). Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves. *Plant Journal* **33** (4): 691-705.
- Fujiwara, T., Giesman-Cookmeyer, D., Ding, B., Lommel, S. A. und Lucas, W. J.** (1993). Cell-to-cell trafficking of macromolecules through plasmodesmata potentiated by the red clover necrotic virus movement protein. *Plant Cell* **5**: 1783-1794.
- Gallagher, K. L. und Benfey, P. N.** (2005). Not just another hole in the wall: understanding intercellular protein trafficking. *Genes & Development* **19**: 189-195.
- Gamalei, Y. V.** (1989). Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. *Trees* **3**: 96-110.

- Gamalei, Y. V.** (2000). Comparative anatomy and physiology of minor veins and paraveinal parenchyma in the leaves of dicots. *Bot. Z.* **85**: 34-49.
- Ghoshroy, S., Lartey, R., Sheng, J. und Citovsky, V.** (1997). Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 27-50.
- Giese, J. O.** (2005). Molekulare und biochemische Charakterisierung der Hexokinase-Genfamilie von *Nicotiana tabacum*. Martin-Luther Universität, Halle, Deutschland.
- Gilbertson, R. L. und Lucas, W. J.** (1996). How do viruses traffic on the `vascular highway`? *Trends in Plant Science* **1** (8): 260-267.
- Gonzali, S., Pistelli, L., De Bellis, L. und Alpi, A.** (2001). Characterization of two *Arabidopsis thaliana* fructokinases. *Plant Science* **160** (6): 1107-1114.
- Gottwald, J. R., Krysan, P. J., Young, J. C., Evert, R. F. und Sussman, M. R.** (2000). Genetic evidence for the *in planta* role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *PNAS* **97** (25): 13979-13984.
- Grusak, M. A., Beebe, D. U. und Turgeon, R.** (1996). *Phloem loading. In Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships.* Marcel Dekker, New York.
- Günther, E.** (1984). *Lehrbuch der Genetik.* VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Haupt, S., Duncan, G. H., Holzberg, S. und Oparka, K.** (2001). Evidence for Symplastic Phloem Unloading in Sink Leaves of Barley. *Plant Physiology* **125**: 209-218.
- Hay, R. K. M.** (1995). Harvest index: a review o its use in plant breeding and crop physiology. *Annual applied Biology* **126**: 197-216.
- Haywood, V., Kragler, F. und Lucas, W. J.** (2002). Plasmodesmata: Pathways for Protein and Ribonucleoprotein Signaling. *The Plant Cell* **14** (Supplement): 303-325.
- Hedden, P.** (2003). The genes of the Green Revolution. *Trends in Genetics* **19** (1): 5-9.
- Heese-Peck, A. und Raikhel, N. V.** (1998). A glycoprotein modified with terminal N-acetylglucosamine and localized at the nuclear rim shows sequence similarity to aldose-1-epimerases. *Plant Cell* **10**: 599-612.
- Heinlein, M., Padgett, H. S., Gens, J. S., Pickard, B. G., Casper, S. J., Epel, B. L. und Beachy, R. N.** (1995). Changing pattern of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *The Plant Cell* **10**: 1107-1120.
- Heinlein, M., Padgett, H. S., Gens, J. S., Pickard, B. G., Casper, S. J., Epel, B. L. und Beachy, R. N.** (1998). Changing pattern of localization of the tobacco mosaic

virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *The Plant Cell* **10**: 1107-1120.

Heinlein, M. und Epel, B. (2004). Macromolecular Transport and Signaling Through Plasmodesmata. *International Review of Cytology* **235**: 93-164.

Henkes, S., Sonnewald, U., Badur, R., Flachmann, R. und Stitt, M. (2001). A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **13**: 535-551.

Hepler, P. K. (1982). Endoplasmic reticulum in the formation of the cell plate and plasmodesmata. *Protoplasma* **111**: 121-133.

Herbers, K., Mönke, G., Badur, R. und Sonnewald, U. (1995). A simplified procedure for the subtractive cDNA cloning of photoassimilate-responding genes: isolation of cDNAs encoding a new class of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* **79**: 1-40.

Herbers, K., Meuwly, P., Metraux, J. P. und Sonnewald, U. (1996a). Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: Possible hexose sensing in the secretory pathway. *The Plant Cell* **8**: 793-803.

Herbers, K., Tacke, E., Hazirezaei, M., Krause, K. P., Melzer, M., Rhode, W. und Sonnewald, U. (1997). Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. *The Plant Journal* **12** (5): 1045-1056.

Heyer, A. G., Raap, M., Schroeer, B., Marty, B. und Willmitzer, L. (2004). Cell wall invertase expression at the apical meristem alters floral, architectural, and reproductive traits in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **39**: 161-169.

Ho, L. C. (1988). Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**: 355-378.

Höfgen, R. und Willmitzer, L. (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research* **16**: 9877.

Höfgen, R. und Willmitzer, L. (1990). Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Science* **66** (2): 221-230.

Hofius, D. (1998). Untersuchungen zum Einfluß des PLRV Movement Proteins auf den Kohlenhydratmetabolismus in transgenen Tabakpflanzen. Diplomarbeit. Universität Hohenheim, Stuttgart-Hohenheim.

Hofius, D., Herbers, K., Melzer, M., Omid, A., Tacke, E., Wolf, S. und Sonnewald, U. (2001). Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the potato leafroll virus movement protein in transgenic tobacco plants. *The Plant Journal* **28** (5): 529-543.

- Hofius, D.** (2003). Identifizierung molekularer Faktoren des plasmodesmalen Makromolekül- und Assimilattransportes in Pflanzen. Dissertation. Martin-Luther Universität, Halle, Deutschland
- Hofius, D., Hajirezaei, M. R., Geiger, M., Tschiersch, H., Melzer, M. und Sonnewald, U.** (2004). RNAi-Mediated Tocopherol Deficiency Impairs Photoassimilate Export in Transgenic Potato Plants. *Plant Physiology* **135**: 1256-1268.
- Hoth, S., Schneiderei, A., Lauterbach, C., Scholz-Starke, J. und Sauer, N.** (2005). Nematode Infection Triggers the de Novo Formation of Unloading Phloem That Allows Macromolecular Trafficking of Green Fluorescent Protein into Syncytia. *Plant Physiology* **138**: 383-392.
- Iglesias, V. A. und Meins, F.** (2000). Movement of plant viruses is delayed in a β -1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *Plant Journal* **21** (2): 157-166.
- Imlau, A., Truernit, E. und Sauer, N.** (1999). Cell-to-Cell and Long-Distance Trafficking of the Green Fluorescent Protein in the Phloem and Symplastic Unloading of the Protein into Sink Tissues. *The Plant Cell* **11**: 309-322.
- Ishiwatari, Y., Fujiwara, T., McFarland, K. C., Nemoto, K., Hayashi, H., Chino, M. und Lucas, W. J.** (1998). Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport. *Planta* **205**: 12-22.
- Itaya, A., Hickman, H., Bao, Y., Nelson, R. S. und Ding, B.** (1997). Cell-to-cell trafficking of cucumber mosaic virus movement protein: green fluorescent protein fusion produced by biolistic gene bombardment in tobacco. *Plant Journal* **12** (5): 1223-1230.
- Itaya, A., Woo, Y. M., Masuta, C., Bao, Y., Nelson, R. S. und Ding, B.** (1998). Developmental Regulation of Intercellular Protein Trafficking through Plasmodesmata in Tobacco Leaf Epidermis. *Plant Physiology* **118**: 373-385.
- Itaya, A., Ma, F., Qi, Y., Matsuda, Y., Zhu, Y., Liang, G. und Ding, B.** (2002). Plasmodesmata-Mediated Selective Protein Traffic between "Symplasmically Isolated" Cells Probed by a Viral Movement Protein. *The Plant Cell* **14**: 2071-2083.
- Jackson, D. und Hake, S.** (1997). Morphogenesis on the move: cell-to-cell trafficking of plant regulatory proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**: 495-500.
- Jackson, D.** (2002). Double labeling of KNOTTED1 mRNA and proteins reveals multiple potential sites of protein trafficking in the shoot apex. *Plant Physiology* **129**: 1423-1429.
- Jander, G., Norris, S. R., Rounsley, S. D., Bush, D. F., Levin, I. M. und Last, R. L.** (2002). Arabidopsis Map-Based Cloning in the Post-Genome Era. *Plant Physiology* **129**: 440-450.

- Jefferson, R. A., Burgess, S. M. und Hirsh, D.** (1986). β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (22): 8447-8451.
- Jorgensen, R. A., Atkinson, R. G., Forster, R. L. S. und Lucas, W. J.** (1998). An RNA-Based Information Superhighway in Plants. *Science* **279**: 1486-1487.
- Kaneko, Y. H., Inukai, T., Suehiro, N., Natsuaki, T. und Masuta, C.** (2004). Fine genetic mapping of the TuNI locus causing systemic veinal necrosis by turnip mosaic virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* **110** (1): 33-40.
- Karni, L. und Aloni, B.** (2002). Fructokinase and hexokinase from pollen grains of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) possible role in pollen germination under conditions of high temperature and CO₂ enrichment. *Annals of Botany* **90** (5): 607-612.
- Kasschau, K. D., Cronin, S. und Carrington, J. C.** (1997). Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* **228**: 251-262.
- Kempers, R. und van Bel, A. J. E.** (1997). Symplasmic connections between sieve element and companion cell in the stem phloem of *Vicia faba* L. have a molecular exclusion limit of at least 10 kDa. *Planta* **201**: 195-201.
- Kim, J. Y., Yuan, Z. und Jackson, D.** (2003a). Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in *Arabidopsis*. *Development* **130**: 4351-4362.
- Kim, I. und Zambryski, P. C.** (2005). Cell-to-cell communication via plasmodesmata during *Arabidopsis* embryogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 593-599.
- Kim, J. Y., Rim, Y., Wang, L. und Jackson, D.** (2005a). A novel cell-to-cell trafficking assay indicates that the KNOX homeodomain is necessary and sufficient for intercellular protein and mRNA trafficking. *Genes Dev* **19**: 788-793.
- Köhle, H., Jeblick, W., Poten, F., Blaschek, W. und Kauss, H.** (1985). Chitosan-Elicited Synthesis in Soybean Cells as a Ca²⁺-Dependent Process. *Plant Physiology* **77**: 544-551.
- Kollmann, R. und Glockmann, C.** (1985). Studies on graft unions. I. Plasmodesmata between cells of plants belonging to different unrelated taxa. *Protoplasma* **124**: 224-235.
- Kollmann, R. und Glockmann, C.** (1991). Studies on graft unions. III. On the mechanism of secondary formation of plasmodesmata at graft interface. *Protoplasma* **165**: 71-85.
- Kragler, F., Monzer, J., Shash, K., Xoconostle-Cazares, B. und Lucas, W. J.** (1998). Cell-to-cell transport of proteins: requirement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *The Plant Journal* **15** (3): 367-381.

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

Kragler, F., Curin, M., Trutnyeva, K., Gansch, A. und Waigmann, E. (2003). MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of tobacco mosaic virus movement protein. *Plant Physiology* **132** (4): 1870-1883.

Kühn, C., Quick, W. P., Schulz, A., Riesmeier, J. W. und Sonnewald, U. (1996). Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant Cell Environment* **19**: 1115-1123.

Kurata, T., Ishida, T., Kawabata-Awai, C., Noguchi, M., Hattori, S., Sano, R., Nagasaka, R., Tominaga, R., Koshino-Kimura, Y., Kato, T., Sato, S., Tabata, S., Okada, K. und Wada, T. (2005a). Cell-to-Cell movement of the CAPRICE protein in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development* **132**: 5387-5398.

Kurata, T., Okada, K. und Wada, T. (2005b). Intercellular movement of transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* **8** (6): 600-605.

Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J. W. und Frommer, W. B. (1999). The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *The Plant Cell* **11**: 707-726.

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

Lazarowitz, S. G. und Beachy, R. N. (1999a). Viral Movement Proteins as Probes for Intracellular and Intercellular Trafficking in Plants. *The Plant Cell* **11**: 535-548.

Lazarowitz, S. G. und Beachy, R. N. (1999b). Probing plant cell structure and function with viral movement proteins. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 332-338.

Lawson, T., Bryant, B., Lefebvre, S., Lloyd, J. C. und Raines, C. A. (2006). Decreased SBPase activity alters growth and development in transgenic tobacco plants. *Plant Cell and Environment* **29** (1): 48-58.

Lee, J. Y., Yoo, B. C., Rojas, M. R., Gomez-Ospina, N., Staehelin, L. A. und Lucas, W. J. (2003). Selective trafficking of non-cell-autonomous proteins mediated by NtNCAPP1. *Science* **299**: 392-396.

Lee, J. Y., Taoka, K., Yoo, B. C., Ben-Nissan, G., Kim, D. J. und Lucas, W. J. (2005). Plasmodesmal-Associated Protein Kinase in Tobacco and *Arabidopsis* Recognizes a Subset of Non-Cell-Autonomous Proteins. *The Plant Cell* **17**: 2817-2831.

Lemoine, R., Kühn, C., Thiele, N., Delrot, S. und Frommer, W. B. (1996). Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: effects on amount and activity. *Plant Cell Environment* **19**: 1124-1131.

- Lerchl, J., Geigenberger, P., Stitt, M. und Sonnewald, U.** (1995). Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of phyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. *Plant Cell* **7**: 259-2709.
- Levy, A., Erlanger, M., Rosenthal, M. und Epel, B.** (2007). A plasmodesmata-associated beta-1,3-glucanase in Arabidopsis. *Plant Journal* **49** (4): 669-682.
- Liarzi, O. und Epel, B.** (2005). Development of a quantitative tool for measuring changes in the coefficient of conductivity of plasmodesmata induced by developmental, biotic, and abiotic signals. *Protoplasma* **225** (1-2): 67-76.
- Lim, P. O., Kim, H.-J. und Nam, H. G.** (2006). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*.
- Logemann, J., Schell, J. und Willmitzer, L.** (1987). Improved Method for the Isolation of RNA from Plant Tissues. *Analytical Biochemistry* **163**: 16-20.
- Lucas, W. J., Olesinski, A., Hull, R. J., Haudenschild, J. S., Deom, C. M., Beachy, R. N. und Wolf, S.** (1993). Influence of the Tobacco Mosaic Virus 30 kDa movement protein of carbon metabolism and photosynthate partitioning in transgenic tobacco plants. *Planta* **190**: 88-96.
- Lucas, W. J., Ding, B. und van der Schoot, C.** (1993b). Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol.* **125**: 435-476.
- Lucas, W. J. und Wolf, S.** (1993). Plasmodesmata: the intercellular organells of green plants. *Trends in Cell Biology* **3**: 308-315.
- Lucas, W. J., Balachandran, S., Park, J. und Wolf, S.** (1996). Plasmodesmal companion cell-mesophyll communication in the control over carbon metabolism and phloem transport: insights gained from viral movement proteins. *Journal of Experimental Botany* **47** (Special Issue): 1119-1128.
- Lucas, W. J.** (1999). Plasmodesmata and the cell-to-cell transport of proteins and nucleoprotein complexes. *Journal of Experimental Botany* **50**: 979-987.
- Lucas, W. J. und Wolf, S.** (1999). Connections between virus movement, macromolecular signaling and assimilate allocation. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 192-197.
- Lucas, W. J. und Lee, J. Y.** (2004). PLASMODESMATA AS A SUPRACELLULAR CONTROL NETWORK IN PLANTS. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 712-726.
- Lucas, W. J.** (2006). Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* **344**: 169-184.
- Lukowitz, W., Gillmor, C. S. und Scheible, W. R.** (2000). Positional Cloning in Arabidopsis. Why It Feels Good to Have a Genome Initiative Working for You. *Plant Physiology* **123**: 795-805.

- Madea, H., Song, W., Sage, T. L. und DellaPenna, D.** (2006). Tocopherols Play a Crucial Role in Low-Temperature Adaptation and Phloem Loading in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18** (10): 2710-2732.
- Martindale, V. E. und Salisbury, J. L.** (1990). Phosphorylation of algal centrin is rapidly responsive to changes in the external milieu. *Journal of Cell Science* **96**: 395-402.
- Matros, A., Amme, S., Kettig, B., Buck-Sorlin, G. H., Sonnewald, U. und Mock, H. P.** (2006). Growth at elevated CO₂ concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with *potato virus Y*. *Plant Cell and Environment* **29** (1): 126-137.
- Matsushita, Y., Hanazawa, K., Yoshioka, K., Oguchi, T., Kawakami, S., Watanabe, Y. und Nishiguchi, M.** (2000). *In vitro* phosphorylation of the movement protein of tomato mosaic tobamovirus by a cellular kinase. *Journal of General Virology* **81**: 2095-2102.
- Matsushita, Y., Miyakawa, O., Deguchi, M., Nishiguchi, M. und Nyunoya, H.** (2002a). Cloning of a tobacco cDNA coding for a putative transcriptional coactivator MBF1 that interacts with the tomato mosaic virus movement protein. *Journal of Experimental Botany* **53** (373): 1531-1532.
- Matsushita, Y., Yoshioka, K., Shigyo, n., Takahashi, H. und Nyunoya, H.** (2002). Phosphorylation of the movement protein of *Cucumber mosaic virus* in transgenic tobacco plants. *Virus Genes* **24**: 231-234.
- Mayo, M. A., Barker, H., Robinson, D. J., Tamada, T. und Harrison, B. D.** (1982). Evidence that the potato leafroll virus RNA is positive-stranded, is linked to a small protein and does not contain polyadenylate. *Journal of General Virology* **59**: 163-167.
- McCauley, M. M. und Evert, R. F.** (1989). Minor veins of the potato leaf. Ultrastructure and plasmodesmal frequency. *Bot. Gaz.* **150**: 351-368.
- McLean, B. G., Zupan, J. R. und Zambryski, P.** (1995). Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell* **7**: 2101-2114.
- Münch, E.** (1930). *Die Stoffbewegung in der Pflanze*. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Murillo, I., Roca, R., Bortolotti, C. und Segundo, B. S.** (2003). Engineering photoassimilate partitioning in tobacco plants improves growth and productivity and provides pathogen resistance. *The Plant Journal* **36**: 330-341.
- Nakajima, K. und Benfey, P. N.** (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413**: 307-311.
- Nakamura, N., Shimizu, M. und Suzuki, H.** (1991). Characterisation of hexose kinases from camellia and lily pollen grains. *Physiol Plant* **81**: 215-220.

Narvaez-Vasquez, J. und Ryan, C. A. (2004). The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta* **218** (3): 360-369.

Nelson, R. S. und van Bel, A. J. E. (1998). The Mystery of Virus Trafficking Into, Through and Out of Vascular Tissue. *Progress in Botany* **59**: 476-533.

Noeiry, A. O., Lucas, W. J. und Gilbertson, R. L. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* **76**: 925-932.

Olesinski, A. A., Lucas, W. J., Galun, E. und Wolf, S. (1995). Pleiotropic effects of Tobacco Mosaic Virus movement protein on carbon metabolism in transgenic tobacco plants. *Planta* **197**: 118-126.

Olesinski, A. A., Almon, E., Navot, N., Perl, A., Galun, E., Lucas, W. J. und Wolf, S. (1996). Tissue-Specific Expression of the Tobacco Mosaic Virus Movement Protein in Transgenic Potato Plants Alters Plasmodesmal Function and Carbohydrate Partitioning. *Plant Physiology* **111**: 541-550.

Oparka, K. (1990). What is phloem unloading? *Plant Physiology* **94**: 393-396.

Oparka, K. J., Roberts, A. G., Boevenik, P., Santa Cruz, S., Roberts, I., Pradel, K. S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N. und Epel, B. (1999). Simple, but Not Branched, Plasmodesmata Allow the Nonspecific Trafficking of Proteins in Developing Tobacco Leaves. *Cell* **97**: 743-754.

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

Oparka, K. J. und Santa Cruz, S. (2000). The Great Escape: Phloem Transport and Unloading of Macromolecules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 323-347.

Oparka, K. J. (2004). Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends in Plant Science* **9** (1): 33-41.

Orozco-Cardenas, M. L., Narvaez-Vasquez, J. und Ryan, C. A. (2001). Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. *Plant Cell* **13**: 179-191.

Overall, R. L. und Blackmann, L. M. (1996). A model of the macromolecular structure of plasmodesmata. *Trends in Plant Science* **1**: 307-311.

Paap, B. K. (2002). Wechselwirkungen zwischen Genprodukten des Kartoffelblattrollvirus (PLRV) und Wirtsfaktoren der Kartoffel (*Solanum tuberosum*). Dissertation. Universität zu Köln, Köln, Deutschland.

Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P.,

- Snape, J. W., Gale, M. D. und Harberd, N. P.** (1999). "Green revolution" genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**: 256-261.
- Pickard, B. G. und Beachy, R.** (1999). Intercellular connections are developmentally controlled to help move molecules through the plant. *Cell* **98**: 5-8.
- Provencher, L. M., Miao, L., Sinha, N. und Lucas, W. J.** (2001). *Sucrose Export Defective1* Encodes a Novel Protein Implicated in Chloroplast-to-Nucleus Signaling. *Plant Cell* **13**: 1127-1141.
- Qi, Y., Pelissier, T., Itaya, A., Hunt, E., Wassengger, M. und Ding, B.** (2004). Direct Role of a Viroid RNA Motif in Mediating Directional RNA Trafficking across a Specific Cellular Boundary. *Plant Cell* **16**: 1741-1752.
- Radford, J. E. und White, R. G.** (1998). Localization of a myosin-like protein to plasmodesmata. *The Plant Journal* **14** (6): 743-750.
- Raven, J. A.** (1991). Long-term functioning of enucleate sieve elements: Possible mechanisms of damage avoidance and damage repair. *Plant Cell Environment* **14**: 139-146.
- Reichardt, M. J. und Rogers, S. J.** (1993). Plant DNA Isolation using CTAB. *Current Protocols in Molecular Biology*. F. M. In Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et al. John Wiley & Sons, Inc., New York. **1**.
- Reichel, C. und Beachy, R.** (1999). The role of the ER and cytoskeleton in plant viral trafficking. *Trends in Plant Science* **4**: 458-462.
- Reichel, C., Mas, P. und Beachy, R.** (1999). The role of the ER and cytoskeleton in plant viral trafficking. *Trends in Plant Science* **4**: 458-462.
- Reichelt, S., Knight, A. E., Hodge, T. P., Baluska, F., Samaj, J., Volkmann, D. und Kendrick-Jones, J.** (1999). Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *The Plant Journal* **19** (5): 555-567.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L. und Frommer, W. B.** (1994). Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO Journal* **13**: 1-7.
- Rinne, P. L. H., van den Boogaard, R., Mensink, M. G. J., Kopperud, C., Kormelink, R., Goldbach, R. und van der Schoot, C.** (2005). Tobacco plants respond to the constitutive expression of the tospovirus movement protein NS_M with a heat-reversible sealing of plasmodesmata that impairs development. *The Plant Journal* **43** (5): 688-707.
- Robards, A. W.** (1971). The ultrastructure of plasmodesmata. *Protoplasma* **72**: 315-323.
- Robards, A. W. und Lucas, W. J.** (1990). Plasmodesmata. *Annual Review of Plant Physiology* **41**: 369-419.

- Roberts, A. G., Cruz, S. S., Roberts, I. M., Prior, D. A. M., Turgeon, R. und Oparka, K.** (1997). Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a fluorescent solute with a fluorescent Virus. *Plant Cell* **9**: 1381-1396.
- Roberts, I. M., Boevink, P., Roberts, A. G., Sauer, N. und Oparka, K. J.** (2001). Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. *Protoplasma* **218**: 31-44.
- Roberts, A. G. und Oparka, K. J.** (2003). Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell & Environment* **26**: 103-124.
- Roldan, M., Gomez-Mena, C., Ruiz-Garcia, L., Salinas, J. und Martinez-Zapater, J.** (1999). Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. *Plant Journal* **20** (5): 582-590.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. und Sheen, J.** (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 675-709.
- Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L. und Lucas, W. J.** (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**: 283-295.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cazares, B. und Lucas, W. J.** (1999). Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* **126**: 4405-4419.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cazares, B. und Kragler, F.** (2004). The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 641-650.
- Russin, W. A., Evert, R. F., Vanderveer, P. J., Sharkey, T. D. und Briggs, S. P.** (1996). Modification of a Specific Class of Plasmodesmata and Loss of Sucrose Export Ability in the *sucrose export defective 1* Maize Mutant. *The Plant Cell* **8**: 645-658.
- Sachs, L.** (2004). *Angewandte Statistik*. Berlin, Springer.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Santa Cruz, S.** (1999). Perspective: phloem transport of viruses and macromolecules - what goes in and must come out. *Trends in Microbiology* **7** (6): 237-241.
- Sasaki, A., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Itoh, H., Nishimura, A., Swapan, D., Ishiyama, K., Saito, T., Kobayashi, M., Khush, G. S., Kitano, H. und Matsuoka, M.** (2002). A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* **416**: 701-702.

- Sattler, S. E., Cahoon, E. B., Coughlan, S. J. und DellaPenna, D.** (2003). Characterization of Tocopherol Cyclases from Higher Plants and Cyanobacteria. Evolutionary Implications for Tocopherol Synthesis and Function. *Plant Physiology* **132**: 2184-2195.
- Scheible, W. R., Fry, B., Kochevenko, A., Schindelasch, D., Zimmerli, L., Somerville, S., Loria, R. und Somerville, C. R.** (2003). An Arabidopsis Mutant Resistant to Thaxtomin A, a Cellulose Synthesis Inhibitor from *Streptomyces* Species. *The Plant Cell* **15**: 1781-1794.
- Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prüfer, D., Rhode, W. und O., R.** (1997). *In Situ* Localization of the Putative Movement Protein (pr17) from Potato Leafroll Luteovirus (PLRV) in Infected and Transgenic Potato Plants. *Virology* **235**: 311-322.
- Sessions, A., Yanofsky, M. F. und Weigel, D.** (2000). Cell-cell signalling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. *Science* **289**: 779-781.
- Shalitin, D., Wang, Y., Omid, A., Gal-On, A. und Wolf, S.** (2002). Cucumber mosaic virus movement protein affects sugar metabolism and transport in tobacco and melon plants. *Plant Cell Environment* **25**: 989-997.
- Sinclair, T. R.** (1998). Historical Changes in Harvest Index and Crop Nitrogen Accumulation. *Crop Science* **38** (3): 638-643.
- Sokolova, M., Prüfer, D., Tacke, E. und Rohde, W.** (1997). The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Letters* **400**: 201-205.
- Sonnewald, U.** (1992). Expression of *E. coli* inorganic pyrophosphatase in transgenic plants alters photoassimilate partitioning. *The Plant Journal* **2** (4): 571-581.
- Sonnewald, U., Hajirezaei, M. R., Kossmann, J., Heyer, A. G., Trethewey, R. N. und Willmitzer, L.** (1995). Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nat. Biotechnol.* **15**: 794-797.
- Stadler, R., Brandner, J., Schulz, A., Gahrtz, M. und Sauer, N.** (1995). Phloem loading by the PmSUC2 sucrose carrier from *Plantago major* occurs into companion cells. *Plant Cell* **7**: 1545-1554.
- Stadler, R. und Sauer, N.** (1996). The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot. Acta* **109**: 299-306.
- Stadler, R., Wright, K. M., Lauterbach, C., Amon, G., Gahrtz, M., Feuerstein, A., Oparka, K. J. und Sauer, N.** (2005). Expression of GFP-fusions in Arabidopsis companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *The Plant Journal* **41**: 319-331.

- Stitt, M., Mc Lilley, R., Gerhardt, R. und Heldt, H. W.** (1989). Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol.* **174**: 518-552.
- Stitt, M.** (1996). Plasmodesmata Play an Essential Role in Sucrose Export from Leaves: A Step toward an Integration of Metabolic Biochemistry and Cell Biology. *The Plant Cell* **8**: 565-571.
- Stockhaus, J., Schell, J. und Willmitzer, L.** (1989). Correlation of the expression of the nuclear photosynthetic gene ST-LS1 with the presence of chloroplasts. *The EMBO Journal* **8** (9): 2445-2451.
- Sun, K., Hunt, K. und Hauser, B. A.** (2004). Ovule Abortion in Arabidopsis Triggered by Stress. *Plant Physiology* **135**: 2358-2367.
- Sun, K., Cui, Y. und Hauser, B. A.** (2005). Environmental stress alters genes expression and induces ovule abortion: reactive oxygen species appear as ovules commit to abort. *Planta* **222** (4): 632-642.
- Tacke, E., Prüfer, D., Schmitz, J. und Rohde, W.** (1991). The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *Journal of General Virology* **72**: 2035-2038.
- Tacke, E., Schmitz, J., Prüfer, D. und Rodhe, W.** (1993). Mutational Analysis of the Nucleic Acid-Binding 17 kDa Phosphoprotein of Potato Leafroll Luteovirus Identifies an Amphipathic α -Helix as the Domain for Protein/Protein Interactions. *Virology* **197**: 274-282.
- Tacke, E., Salamini, F. und Rhode, W.** (1996). Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. *Nature Biotechnology* **14** (11): 1597-1601.
- Taliansky, M., Mayo, M. A. und Barker, H.** (2003). *Potato leafroll virus*: a classic pathogen shows some new tricks. *Molecular Plant Pathology* **4** (2): 81089.
- Tian, G. W., Mohanty, A., Chary, S. N., Li, S., Paap, B. K., Dakakaki, G., Kopec, C. D., Li, J. Y., Ehrhardt, D. W. und Jackson, D.** (2004). High-throughput fluorescent tagging of full-length *Arabidopsis* gene products *in planta*. *Plant Physiology* **135**: 25-38.
- Tomenius, K., Clapham, D. und Meshi, T.** (1987). Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves injected with tobacco mosaic virus. *Virology* **160**: 363-371.
- Truernit, E. und Sauer, N.** (1995). The promotor of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of β -glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* **196**: 564-570.
- Truernit, E.** (2001). Plant physiology: The importance of sucrose transporters. *Curr Biol* **11** (5): R169-R171.

- Turgeon, R.** (1989). The sink-source transition in leaves *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 119-138.
- Turgeon, R.** (1991). *Symplastic phloem loading and the sink-source-transition in leaves: a model*. Quest Editions, Nantes, France.
- Turgeon, R.** (1996). Phloem loading and plasmodesmata. *Trends in Plant Science* **1**: 418-423.
- Turgeon, R., Medville, R. und Nixon, K. C.** (2001). The evolution of minor vein phloem and phloem loading. *Am. J. Bot.* **88**: 1331-1339.
- Turgeon, R. und Medville, R.** (2004). Phloem loading. A reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. *Plant Physiology* **136**: 3795-3803.
- van Bel, A. J. E.** (1993). Strategies of phloem loading. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol Biol.* **44**: 253-281.
- van Bel, A. J. E. und van Kesteren, W. J. P.** (1999). *Plasmodesmata: Structure, function, role in cell communication*. Springer Verlag, New York.
- Vaughn, M. W., Harrington, G. N. und Bush, D. R.** (2002). Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Aust J Plant Physiol* **27**: 477-487.
- Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., Van Montagu, M. und Schell, J.** (1975). Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium*. *Journal of General Virology* **26** (1): 33-48.
- Viola, R., Roberts, A. G., Haupt, S., Gazzani, S., Hancock, R. D., Marmioli, N., Machray, G. C. und Oparka, K.** (2001). Tuberization in Potato Involves a Switch from Apoplastic to Symplastic Phloem Unloading. *The Plant Cell* **13**: 385-398.
- Vogel, F., Hofius, D. und Sonnewald, U.** (2007). Intracellular trafficking of potato leaf roll virus movement protein in transgenic *Arabidopsis*. *Traffic*, angenommen.
- Voitsekhovskaja, O. V., Koroleva, O. A., Batashev, D. R., Knop, C., Tomos, A. D., Gamalei, Y. V., Heldt, H. W. und Lohaus, G.** (2006). Phloem Loading in Two Scrophulariaceae Species. What Can Drive Symplastic Flow via Plasmodesmata? **140**: 383-395.
- von Schaewen, A., Stitt, M., Schmidt, R., Sonnewald, U. und Willmitzer, L.** (1990). Expression of yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to inhibition of sucrose export, accumulation of carbohydrate, and inhibition of photosynthesis, and strongly influences the growth and habitus of transgenic tobacco. *EMBO Journal* **9**: 3033-3044.
- Wagmann, E., Lucas, W. J., Citovsky, V. und Zambryski, P.** (1994). Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and

identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1433-1437.

Waigmann, E. und Zambryski, P. (1995). Tobacco mosaic virus movement protein-mediated protein transport between trichome cells. *The Plant Cell* **7**: 2069-2079.

Waigmann, E., Turner, A., Peart, J., Roberts, K. und Zambryski, P. (1997). Ultrastructural analysis of leaf trichome plasmodesmata reveals major differences from mesophyll plasmodesmata. *Planta* **203**: 75-84.

Waigmann, E., Chen, M. H., Bachmaier, R., Ghoshroy, S. und Citovsky, V. (2000). Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *The EMBO Journal* **19** (18): 4875-4884.

Weber, H., Heim, U., Golombek, S., Borisjuk, L., Manteufel, R. und Wobus, U. (1998). Expression of a yeast-derived invertase in developing cotyledons of *Vicia narbonensis* alters the carbohydrate state and affects storage functions. *Plant Journal* **16**: 163-172.

Weigel, D. und Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Weschke, W., Panitz, R., Gubatz, S., Wang, Q., Radchuk, R., Weber, H. und Wobus, U. (2003). The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant Journal* **33**: 395-411.

Williams, L. E., Lemoine, R. und Sauer, N. (2000). Sugar transporters in higher plants: a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* **5** (7): 283-290.

Wolf, S., Deom, C. M., Beachy, R. und Lucas, W. J. (1989). Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* **246**: 377-379.

Wolf, S., Deom, C. M., Beachy, R. und Lucas, W. J. (1991). Plasmodesmatal Function Is Probed Using Transgenic Tobacco Plants that Express a Virus Movement Protein. *The Plant Cell* **3**: 593-604.

Wright, K. M. und Oparka, K. (1997). Metabolic inhibitors induce symplastic movement of solutes from the transport phloem of *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1807-1814.

Wright, K. M., Roberts, A. G., Martens, H. J., Sauer, N. und Oparka, K. J. (2003). Structural and Functional Vein Maturation in Developing Tobacco Leaves in Relation to *AtSUC2* Promotor Activity. *Plant Physiology* **131**: 1555-1565.

Wu, X., Weigel, D. und Wigge, P. A. (2002). Signaling in plants by intercellular RNA and protein movement. *Genes & Development* **16**: 151-158.

Wu, X., Dinneny, J. R., Crawford, K., Rhee, S. Y., Citovsky, V., Zambryski, P. und Weigel, D. (2003). Modes of intercellular transcription factor movement in the *Arabidopsis* apex. *Development* **130**: 3735-3745.

Xoxonostle-Cazares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H. L., Monzer, J., Yoo, B. C., McFarland, K. C., Franceschi, V. R. und Lucas, W. J. (1999). Plant Paralog to Viral Movement Protein That Potentiates Transport of mRNA into the Phloem. *Science* **283**: 94-98.

Xoxonostle-Cazares, B., Ruiz-Medrano, R. und Lucas, W. J. (2000). Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome *b₅* reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. *The Plant Journal* **24** (6): 735-747.

Zambryski, P. und Crawford, K. (2000). PLASMODESMATA: Gatekeepers for Cell-to-Cell Transport of Developmental Signals in Plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 393-421.

Zambryski, P. (2004). Cell-to-cell transport of proteins and fluorescent tracers via plasmodesmata during plant development. *The Journal of Cell Biology* **162** (2): 165-168.

Zimmermann, M. H. und Ziegler, H. (1975). *Transport in Plants*. Encycl. Plant Physiol., Springer, Berlin.

8 ANHANG

I Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
D256	5'-ATGGCAGACGGTGAGGATATTCA-3'	5' Aktin AC1 (neu)
D257	5'-GCCTTTGCAATCCACATCTGTTG-3'	3' Aktin AC2 (neu)
D98	5'-AT CC ATG GCA ATG TCA ATG GTG GTG TAC AAC-3'	5'-MP17, AtSUC2-Prom. (<i>NcoI</i>)
D197	5'-C CAT GGC TCC GCG CTT GAT AAG TTT TGG-3'	3'-MP17, AtSUC2-Prom. (<i>NcoI</i>)
D213	5'-GGA TCC TGT GCT TTA TTC TTT AGA AAC AAA AAA TAA-3'	3'-Tprom (<i>BamHI</i>)
D214	5'-GTC GAC GTT GAT GTT AAT ACA CGT TTC ACA ACT GAG-3'	5'-Tprom_DL(-1645) (<i>SallI</i>)
D221	5'-AT GAG CTC TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GC-3'	3'-GFP f. TPA-Fusion (<i>SacI</i>)
D222	5'-AT GGA TCC TCC GCG CTT GAT AAG TTT TGG-3'	3'-MP17 f. TPA-GUS (<i>BamHI</i>)
KK8	5'-AGG TTT TAT TGC TTT TCA CA-3'	5' ciw12, Chr. I, Genomk.
KK9	5'-CTT TCA AAA GCA CAT CAC A -3'	3' ciw12, Chr. I, Genomk.
KK10	5'-TGT TTT TTA GGA CAA ATG GCG -3'	5' nga111, Chr. I, Genomk.
KK11	5'-CTC CAG TTG GAA GCT AAA GGG-3'	3' nga111, Chr. I, Genomk.
KK12	5'-CCC AAA AGT TAA TTA TAC TGT -3'	5' ciw2, Chr. II, Genomk.
KK13	5'-CCG GGT TAA TAA TAA ATG T-3'	3' ciw2, Chr. II, Genomk.
KK14	5'-GCA CAG TCC AAG TCA CAA CC-3'	5' nga1126, Chr. II, Genomk.
KK15	5'-CGC TAC GCT TTT CGG TAA AG-3'	3' nga1126, Chr. II, Genomk.
KK16	5'-CTC TGT CAC TCT TTT CCT CTG G-3'	5' nga162, Chr. III, Genomk.
KK17	5'-CAT GCA ATT TGC ATC TGA GG-3'	3' nga162, Chr. III, Genomk.
KK18	5'-ATG GAG AAG CTT ACA CTG ATC-3'	5' nga6, Chr. III, Genomk.
KK19	5'-TGG ATT TCT TCC TCT CTT CAC-3'	3' nga6, Chr. III, Genomk.
KK20	5'-GGT TAA AAA TTA GGG TTA CGA-3'	5' ciw5, Chr. IV, Genomk.
KK21	5'-AGA TTTACG TGG AAG CAA T-3'	3' ciw5, Chr. IV, Genomk.
KK22	5'-AAT TTG GAG ATT AGC TGG AAT-3'	5' ciw7, Chr. IV, Genomk.
KK23	5'-CCA TGT TGA TGA TAA GCA CAA-3'	3' ciw7, Chr. IV, Genomk.
KK24	5'-TAG TGA AAC CTT TCT CAG AT-3'	5' ciw8, Chr. V, Genomk.
KK25	5'-TTA TGT TTT CTTCAA TCA GTT-3'	3' ciw8, Chr. V, Genomk.
KK26	5'-CCA CATTTCCT TCT TTC ATA-3'	5' ciw10, Chr. V, Genomk.
KK27	5'-CAA CAT TTA GCA AAT CAA CTT-3'	3' ciw10, Chr. V, Genomk.
KK28	5'-GGC TTT CTC GAA ATC TGT CC-3'	5' F21M12, Chr. I, Genomk.
KK29	5'-TTA CTT TTT GCC TCT TGT CAT TG-3'	3' F21M12, Chr. I, Genomk.
KK30	5'-ACA TTT TCT CAA TCC TTA CTC-3'	5' ciw1, Chr. I, Genomk.
KK31	5'-GAG AGC TTC TTT ATT TGT GAT-3'	3' ciw1, Chr. I, Genomk.

KK32	5'-CTG ATC TCA CGG ACA ATA GTG C-3'	5' nga280, Chr. I, Genomk.
KK33	5'-GGC TCC ATA AAA AGT GCA CC-3'	5' ciw3, Chr. II, Genomk.
KK34	5'-GAA ACT CAA TGA AAT CCA CTT-3'	5' ciw3, Chr. II, Genomk.
KK35	5'-TGA ACT TGT TGT GAG CTT TGA-3'	3' ciw3, Chr. II, Genomk.
KK36	5'-TCG TCT ACT GCA CTG CCG-3'	5' nga168, Chr. II, Genomk.
KK37	5'-GAG GAC ATG TAT AGG AGC CTC G-3'	3' nga168, Chr. II, Genomk.
KK38	5'-CCC CGA GTT GAG GTA TT-3'	5' ciw11, Chr. III, Genomk.
KK39	5'-GAA GAA ATT CCT AAA GCA TTC-3'	3' ciw11, Chr. III, Genomk.
KK40	5'-GTT CAT TAAACT TGC GTG TGT-3'	5' ciw4, Chr. III, Genomk.
KK41	5'-TAC GGT CAG ATT GAG TGA TTC-3'	3' ciw4, Chr. III, Genomk.
KK42	5'-CTC GTA GTG CAC TTT CAT CA-3'	5' ciw6, Chr. IV, Genomk.
KK43	5'-CAC ATG GTT AGG GAA ACA ATA -3'	3' ciw6, Chr. IV, Genomk.
KK44	5'-GCG AAA AAA CAA AAA AAT CCA-3'	5' nga1107, Chr. IV, Genomk.
KK45	5'-CGA CGA ATC GACAGA ATT AGG-3'	3' nga1107, Chr. IV, Genomk.
KK48	5'-CTC AGA GAA TTC CCA GAA AAA TCT-3'	5' PHYC, Chr. V, Genomk.
KK49	5'-AAA CTC GAG AGT TTT GTC TAG ATC-3'	3' PHYC, Chr. V, Genomk.
KK50	5'-CAG ACG TAT CAA ATG ACA AAT G-3'	5' ciw9, Chr. V, Genomk.
KK51	5'-GAC TAC TGC TCA AAC TAT TCG G-3'	3' ciw9, Chr. V, Genomk.

II Kohlenhydratgehalte in MP17:GFP-transgenen *Arabidopsis*

Pflanzenlinie	Glukose (mmol m ⁻²)	Fruktose (mmol m ⁻²)	Saccharose (mmol m ⁻²)	Stärke (mmol m ⁻²)	Lösliche Zucker/Stärke
Col-0 WT	0,48 ± 0,06	0,92 ± 0,11	1,15 ± 0,07	11,29 ± 0,46	0,23 ± 0,01
Col-9	0,52 ± 0,06	1,87 ± 0,36*	0,99 ± 0,08	10,43 ± 0,56	0,32 ± 0,03*
Col-14	1,01 ± 0,15**	1,64 ± 0,06***	1,07 ± 0,07	10,88 ± 0,43	0,34 ± 9,61e-3***
Col-16	5,26 ± 0,54***	2,11 ± 0,16***	2,65 ± 0,24***	23,10 ± 2,01***	0,44 ± 0,0***
<i>Ler</i> WT	0,82 ± 0,10	1,62 ± 0,13	1,21 ± 0,04	12,04 ± 0,43	0,30 ± 0,02
<i>Ler-1</i>	5,52 ± 0,58 ***	4,72 ± 0,37***	2,48 ± 0,15***	17,10 ± 1,26 **	0,78 ± 0,09***
<i>Ler-12</i>	3,49 ± 0,61***	3,37 ± 0,29***	2,02 ± 0,26**	13,21 ± 1,43	0,76 ± 0,16*
C24 WT	1,18 ± 0,15	1,02 ± 0,18	1,00 ± 0,06	13,05 ± 0,66	0,25 ± 0,03
C24-81	0,92 ± 0,12	0,93 ± 0,12	0,78 ± 0,06*	12,05 ± 0,85	0,22 ± 0,01
C24-84	0,84 ± 0,07	1,08 ± 0,09	0,79 ± 0,06*	13,90 ± 0,93	0,20 ± 0,01
C24-74	1,10 ± 0,15	1,20 ± 0,10	1,09 ± 0,06	14,76 ± 0,52	0,20 ± 0,03

Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler der einzelnen Zuckermessungen aus je 10 Doppelproben von 5 Wochen alten *source*-Blättern. Signifikante Unterschiede (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001) im Vergleich zur jeweiligen Wildtyp-Kontrolle wurden mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt. Col-0: Columbia, *Ler*: *Landsberg erecta*.

III Biomasseverteilung in konstitutiv MP17:GFP-exprimierenden *Arabidopsis*

Anzucht	Linie	vegetative Biomasse (Blattfrischgewicht) [g]	vegetative Biomasse (Blatttrockengewicht) [g]	generative Biomasse (Blattfrischgewicht) [g]	Samenertrag [g]	Anmerkungen
1	Col-0 WT	2,026 ± 0,068	0,180 ± 0,005		0,152 ± 0,015	A Sept. 2004 nach 6 Wochen Kurztag Transfer unter Langtag
	Col-0-9	2,532 ± 0,098	0,227 ± 0,008		0,140 ± 0,007	
	Col-0-14	1,948 ± 0,062	0,185 ± 0,009		0,199 ± 0,010	
	Col-0-16	0,361 ± 0,021	0,044 ± 0,003		0,217 ± 0,012	
	Ler WT	2,381 ± 0,102	0,199 ± 0,007		0,128 ± 0,007	
	Ler-1	0,222 ± 0,008	0,027 ± 0,001		0,215 ± 0,016	
2	Col-0 WT				0,158 ± 0,009	A Feb. 2005 nach 2 Wochen Kurztag Transfer unter Langtag
	Col-0-9				0,132 ± 0,013	
	Col-0-14				0,174 ± 0,010	
	Col-0-16				0,188 ± 0,012	
3	Col-0 WT	2,106 ± 0,151	0,184 ± 0,010		0,120 ± 0,012	A Aug. 2005 nach 6 Wochen Kurztag Transfer unter Langtag
	Col-0-9	2,242 ± 0,135	0,185 ± 0,009		0,165 ± 0,009	
	Col-0-14	1,774 ± 0,173	0,150 ± 0,011		0,138 ± 0,012	
	Col-0-16	0,255 ± 0,020	0,037 ± 0,002		0,151 ± 0,060	
	Ler WT	1,972 ± 0,131	0,154 ± 0,009		0,084 ± 0,009	
	Ler-1	0,219 ± 0,022	0,026 ± 0,002		0,168 ± 0,020	
4	Col-0 WT	1,563 ± 0,106			0,1748 ± 0,0084	A Dez. 2005 nach 6 Wochen Kurztag Transfer unter Langtag
	Col-0-9	1,839 ± 0,044			0,177 ± 0,016	
	Col-0-14	1,343 ± 0,057			0,188 ± 0,012	
	Col-0-16	0,158 ± 0,012			0,197 ± 0,006	
	Ler WT	2,414 ± 0,136			0,124 ± 0,014	
	Ler-1	0,155 ± 0,017			0,185 ± 0,011	
	Ler-12	0,204 ± 0,024			0,156 ± 0,011	
5	Col-0 WT	1,739 ± 0,103		0,323 ± 0,028	0,139 ± 0,005	A Aug. 2006 nach 6 Wochen Kurztag Transfer unter Langtag
	Col-0-9	1,907 ± 0,057		0,411 ± 0,019	0,133 ± 0,008	
	Col-0-14	1,548 ± 0,078		0,327 ± 0,022	0,145 ± 0,011	
	Col-0-16	0,367 ± 0,011		0,102 ± 0,003	0,163 ± 0,005	
	Ler WT	2,167 ± 0,138		0,375 ± 0,022	0,125 ± 0,002	
	Ler-1	0,368 ± 0,036		0,147 ± 0,007	0,153 ± 0,008	
	Ler-12	0,464 ± 0,007		0,148 ± 0,009	0,151 ± 0,009	

Die Daten repräsentieren die Verteilung der Biomasse in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von 5 unabhängigen Anzuchten. Die vegetative Blattbiomasse wurde nach 6 Wochen Kurztag ermittelt, die generative Blattbiomasse zu Beginn der Sprossausbildung, nachdem die verbleibenden Pflanzen der

vegetativen Biomassebestimmung unter Langtagbedingungen transferiert wurden. Nach vollständigem Abreifen der Pflanzen wurde der Samenertrag bestimmt. Pro Datenset wurden die Mittelwerte mit Standardfehler von 5-10 Pflanzen bestimmt. Angegeben sind die absoluten Werte in [g]. A: Aussaat, Col-0: Columbia, *Ler. Landsberg erecta*.

IV Biomasseverteilung in Col-0-*Arabidopsis* mit Zell-spezifischer MP17:GFP-Expression

Anzucht	Linie	vegetative Biomasse (Blattfrischgewicht) [g]	vegetative Biomasse (Blattfrischgewicht) [g]	Samenertrag [g]	Anmerkungen
1	Col-0 WT	2,196 ± 0,154		0,218 ± 0,040	A Nov. 2005 nach 6 Wochen Kurztag Transfer unter Langtag
	Col-0-16	0,256 ± 0,013		0,234 ± 0,043	
	L700-10	0,717 ± 0,087		0,228 ± 0,023	
	L700-12	0,275 ± 0,021		0,226 ± 0,008	
	PEP-4	2,788 ± 0,237		0,204 ± 0,008	
	PEP-14	1,758 ± 0,176		0,210 ± 0,036	
	TPΔ-6	2,496 ± 0,218		0,302 ± 0,300	
	TPΔ-8	2,302 ± 0,13		0,288 ± 0,00	
	TPΔ-16	2,240 ± 0,198		0,339 ± 0,027	
2	Col-0 WT	1,644 ± 0,101	0,346 ± 0,020	0,131 ± 0,013	A April 2006 nach 6 Wochen Kurztag Transfer unter Langtag
	Col-0-16	0,251 ± 0,017	0,162 ± 0,010	0,166 ± 0,008	
	L700-10	0,714 ± 0,048	0,229 ± 0,009	0,165 ± 0,010	
	L700-12	0,079 ± 0,007	0,157 ± 0,010	0,173 ± 0,006	
	PEP-4	1,587 ± 0,078	0,291 ± 0,017	0,136 ± 0,011	
	PEP-14	1,696 ± 0,103	0,340 ± 0,018	0,128 ± 0,005	
	TPΔ-6	1,388 ± 0,102	0,321 ± 0,019	0,190 ± 0,008	
	TPΔ-8	1,731 ± 0,061	0,371 ± 0,015	0,191 ± 0,008	
	TPΔ-16	1,937 ± 0,182	0,346 ± 0,017	0,195 ± 0,006	
3	Col-0 WT	1,739 ± 0,103	0,323 ± 0,028	0,139 ± 0,005	A Aug. 2006 nach 6 Wochen Kurztag Transfer unter Langtag
	Col-0-16	0,367 ± 0,011	0,102 ± 0,003	0,163 ± 0,005	
	L700-10	0,904 ± 0,060	0,175 ± 0,008	0,150 ± 0,005	
	L700-12	0,299 ± 0,028	0,100 ± 0,003	0,160 ± 0,009	
	PEP-4	1,618 ± 0,185	0,316 ± 0,025	0,128 ± 0,007	
	PEP-14	1,714 ± 0,136	0,337 ± 0,044	0,135 ± 0,013	
	TPΔ-6	1,968 ± 0,215	0,372 ± 0,029	0,185 ± 0,008	
	TPΔ-8	1,949 ± 0,026	0,376 ± 0,049	0,182 ± 0,015	
	TPΔ-16	1,964 ± 0,037	0,371 ± 0,020	0,184 ± 0,008	

In der Tabelle ist die Verteilung der Biomasse während unterschiedlicher Entwicklungsstadien von drei unabhängigen Anzuchten transgener *Arabidopsis*-Pflanzen zusammengefasst, die im Vergleich zur WT- und konstitutiven Col-0-16-Referenz MP17:GFP unter der Kontrolle eines Photosystem II- (L700), Geleitzell- (PEP) und Bündelscheiden-spezifischen (TPΔ) Promotors exprimieren. Die vegetative Blattbiomasse wurde nach 6 Wochen Kurztag ermittelt, die generative Blattbiomasse zu Beginn der Sprossausbildung, nachdem die verbleibenden Pflanzen der vegetativen Biomassebestimmung unter Langtagbedingungen transferiert wurden. Nach vollständigem Abreifen der Pflanzen wurde der

Samenertrag bestimmt. Pro Datenset wurden die Mittelwerte mit Standardfehler von 5-10 Pflanzen bestimmt. Angegeben sind die absoluten Werte in [g] sowie der prozentuale Anteil bezogen auf die WT-Referenz. A: Aussaat, Col-0: Columbia.

V Kohlenhydratgehalte in *Arabidopsis* mit Zell-spezifischer MP17:GFP-Expression

Pflanzenlinie	Glukose (mmol m ⁻²)	Fruktose (mmol m ⁻²)	Saccharose (mmol m ⁻²)	Stärke (mmol m ⁻²)	Lösliche Zucker/Stärke
Col-0 WT	0,72 ± 0,08	0,80 ± 0,12	0,70 ± 0,04	13,00 ± 0,55	0,17 ± 0,01
Col-16	4,62 ± 0,30***	1,77 ± 0,21***	1,84 ± 0,18***	22,88 ± 2,64**	0,41 ± 0,06**
L700-10	4,14 ± 0,57***	1,49 ± 0,11***	1,84 ± 0,13***	22,19 ± 2,16***	0,37 ± 0,05**
L700-10	5,67 ± 0,95***	2,04 ± 0,24***	2,15 ± 0,19***	24,99 ± 2,14***	0,42 ± 0,06***
PEP-4	1,56 ± 0,26**	0,77 ± 0,13	0,75 ± 0,04	12,18 ± 0,45	0,25 ± 0,02**
PEP-14	2,09 ± 0,40**	0,67 ± 0,11	0,72 ± 0,07	12,62 ± 0,55	0,28 ± 0,04*
TPΔ-6	0,92 ± 0,25	0,81 ± 0,19	0,45 ± 0,04**	10,73 ± 0,54*	0,21 ± 0,02
TPΔ-8	0,69 ± 0,12	1,09 ± 0,09	0,69 ± 0,05	11,54 ± 0,79	0,22 ± 0,02
TPΔ-16	1,45 ± 0,20**	0,89 ± 0,07	0,67 ± 0,05	10,77 ± 1,28	0,32 ± 0,10

Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler der einzelnen Zuckermessungen aus je 10 Doppelproben der WT-, Col-0-16- und L700-Linien und aus 4-6 Doppelproben der PEP- und TPΔ-Linien von 5 Wochen alten *source*-Blättern. Signifikante Unterschiede (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001) im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle wurden mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt. Col-0: Columbia, L700: Konstrukt zur MP17:GFP-Expression in chloroplastenhaltigem Gewebe unter Kontrolle des ST-LS1-Promotors aus *Solanum tuberosum*, PEP: Konstrukt zur MP17:GFP-Expression in Geleitzellen unter Kontrolle des AtSUC2-Promotors aus *Arabidopsis thaliana*, TPΔ: Konstrukt zur MP17:GFP-Expression in Bündelscheidenzellen unter Kontrolle des TPΔ-Promotors des *gdc3T*-Gens aus *Flaveria anomala*.

VI Ergänzende Bestimmung von Frisch- und Trockengewicht von MP17- und MP17:GFP transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen mit konstitutiver und spezifischer Expression

Zur Überprüfung der Biomasseverteilung während der vegetativen Wachstumsphase wurde neben dem Frischgewicht das Trockengewicht der konstitutiv MP17:GFP- bzw. MP17-exprimierenden *Arabidopsis*-Linien im Col-0-, *Ler*- und C24-Hintergrund sowie von Col-0-Linien, welche MP17:GFP unter der Kontrolle eines Geleitzell-, Bündelscheiden- und Chloroplasten-spezifischen Promotors exprimieren, ermittelt. Nach 6 Wochen unter Kurztagbedingungen wurde das Frischgewicht und nach

weiteren zwei Tagen im Trockenschrank bei 50°C das Trockengewicht bestimmt (s. Abb.).

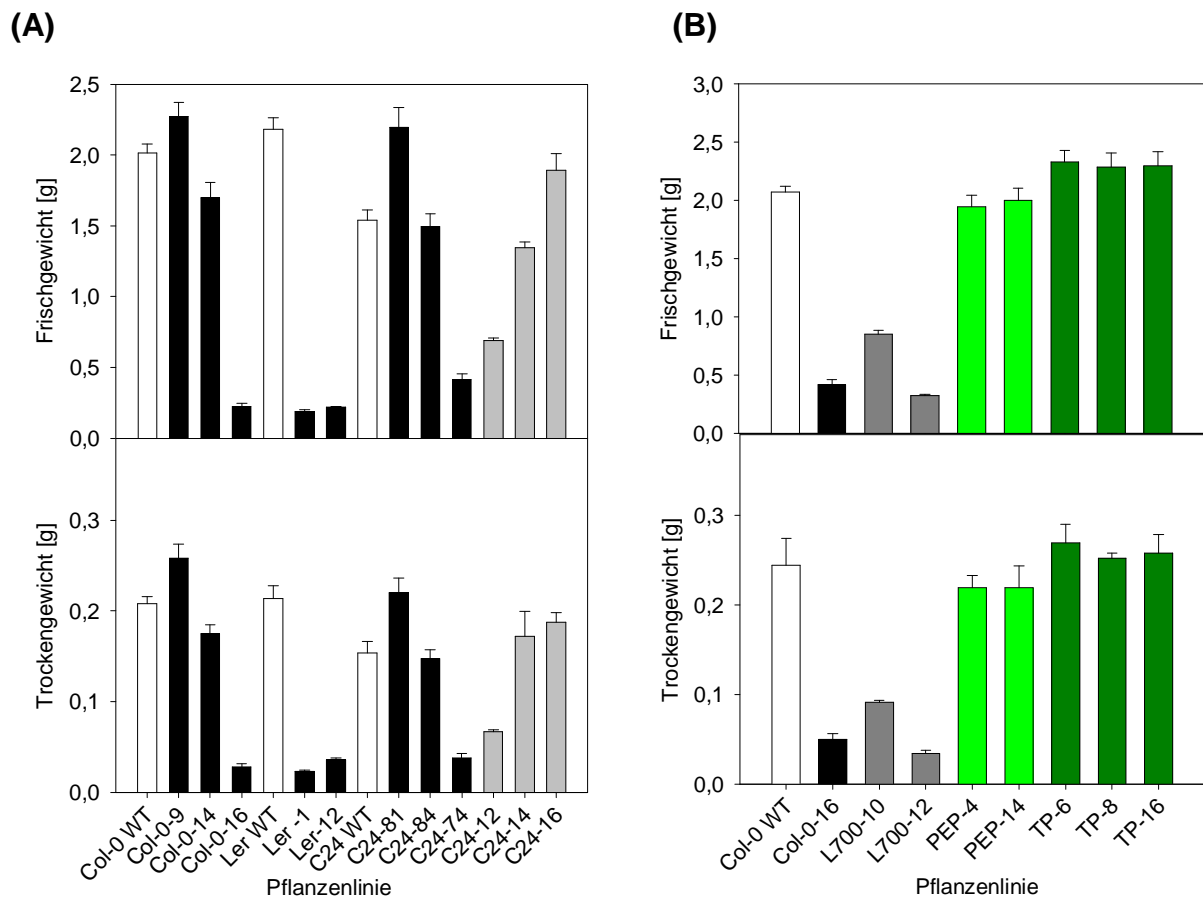


Abbildung 8-1: Frisch- und Trockengewichte konstitutiv MP17:GFP- und MP17 sowie spezifisch MP17:GFP-exprimierender *Arabidopsis*-Linien während vegetativem Wachstumsstadium im Vergleich zur Ökotyp-spezifischen WT-Kontrolle

Nach 6 Wochen Kurztagbedingungen wurden die Frischgewichte und nach weiteren zwei Tagen im Trockenschrank bei 50°C wurden die Trockengewichte bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte in Gramm mit Standardabweichung von 6-10 Pflanzen je Linie. Col-0: Columbia, Ler: Landsberg erecta, L700: Chloroplasten-spezifische Expression (*ST LS-1*-Promotor), PEP: Geleitzell-spezifische Expression (*At SUC2Δ SphI*-Promotor), TPΔ: Bündelscheiden-spezifische Expression (TPΔ-Promotor).

Publikationsliste

Publikationen

2007: K. Kronberg, F. Vogel, T. Rutten, M. Hajirezaei, U. Sonnewald, D. Hofius.

The silver lining of a viral agent: increasing seed yield and harvest index in Arabidopsis by ectopic expression of the Potato leaf roll virus movement Protein.

Plant Physiol., eingereicht

Posterbeiträge

2003: D. Hofius, K. Kronberg, U. Sonnewald

Development of a genetic screen to isolate Arabidopsis suppressor mutants defektive in putative plant receptors of the PLRV movement protein.

“International Conference on Phloem Transport, Bayreuth, 31.08.-05.09.2003

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran danke ich Herrn Prof. Dr. Uwe Sonnewald für die Überlassung des Themas und seine anregenden Diskussionen bei der Entwicklung der Arbeit.

Besonders danken möchte ich Daniel Hofius für seine aufschlussreichen Arbeiten mit MP17-transgenen Pflanzen sowie seine unzähligen Hilfestellungen und Ratschläge im Laboralltag.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Humbeck, der sich auch kurzfristig zur Betreuung der Arbeit bereit erklärt hat, und Dr. Ruth Stadler bedanke ich mich herzlich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates.

Mein persönlicher Dank ist an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe „Molekulare Pflanzenphysiologie“ gerichtet, die maßgeblich an der angenehmen Arbeitsatmosphäre beteiligt waren und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Andrea Knospe und Sibylle Freist danke ich für die Transformation und fürsorgliche Pflege meiner Pflanzen in Gewebekultur.

Stellvertretend für alle Mitarbeiter der Gärtnerei bedanke ich mich bei Enk Geyer für die Betreuung meiner zahlreichen Pflanzen im Gewächshaus.

Für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten möchte ich Dr. Michael Melzer und Dr. Twan Rutten danken sowie Bernhard Claus für die wertvolle Unterstützung am konfokalen Laserscanningmikroskop.

Mein abschließender Dank gilt den Menschen, die mir am nächsten stehen und mich auf meinem bisherigen Weg unermüdet unterstützend begleitet haben, insbesondere meiner Familie und ganz besonders Andreas Rothe, der mir mit viel Verständnis Halt und Ziel gegeben hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Kristin Kronberg
Geburtsdatum	23.01.1979
Geburtsort	Quedlinburg
Familienstand	ledig

Schulbildung

1985 - 1991	Zehnklassige Polytechnische Oberschule, Ballenstedt
1991 - 1997	Wolterstorff-Gymnasium, Ballenstedt, Abschluss: Abitur

Freiwilliges soziales Jahr

09/1997 – 10/1997	KIEZ, Kinder- und Erholungszentrum, Güntersberge
-------------------	--

Studium

10/1997 – 12/2002	Studium der Diplom-Biologie an der Martin-Luther-Universität zu Halle/Saale
04.10.1999	Vordiplom
18.12.2001	Mündliche Diplomprüfung im Hauptfach Genetik/Molekularbiologie sowie in den Nebenfächern Pflanzenphysiologie, Humanbiologie und Biochemie
01/2002 - 12/2002	Diplomarbeit am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rüdiger Hell unter Anleitung von Dr. Markus Wirtz, Thema: „Untersuchungen zur Regulation der Cystein-Biosynthese in Pflanzen“
04.12.2002	Diplomverteidigung mit Note 1,8

Berufliche Tätigkeiten

01/2003 - 02/2003	wissenschaftliche Hilfskraft, IPK Gatersleben, Arbeitsgruppe Molekulare Mineralstoffassimilation
02/2003 - 04/2003	wissenschaftliche Hilfskraft, IPK Gatersleben, Arbeitsgruppe Hefegenetik
seit 04/2003	Doktorand am IPK Gatersleben in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Sonnewald und Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation

Gatersleben, im Juni 2007

Erklärung

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

Gatersleben, im Juni 2007

Kristin Kronberg