



1 Einleitung

1.1 Virus-Wirt-Beziehungen

Proteine steuern die vielfältigen Funktionen des Lebens. Dabei sind Interaktionen mit anderen Proteinen zur Erfüllung ihrer zellulären Funktion entscheidend. Diese umfassen die Zellarchitektur, den Stoffwechsel, das Signalsystem sowie die Verfügbarmachung von zellulärer Energie (Brückner et al. 2009). Komplexe biologische Systeme zeichnen sich durch die Anwesenheit von Protein-Netzwerken aus. Zum Verständnis der essentiellen Prozesse und molekularen Zusammenhänge ist eine Entschlüsselung dieser Protein-Netzwerke unumgänglich. Pathogene nutzen zur eigenen Vermehrung die Protein-Protein-Interaktionsnetzwerke der Wirtsorganismen.

Insbesondere Viren als obligate Parasiten sind für ihre Vermehrung auf die Syntheseleistung der lebenden Wirtszellen angewiesen, weil sie keinen eigenen Stoffwechsel haben (Meyer-Kahsnitz 1993). Virusinfektionen an Pflanzen können zu erheblichen ökonomischen und ökologischen Schäden führen (Büttner et al. 2013). So sind in vielen Pflanzenarten Ertragseinbußen bis zu 100 % keine Seltenheit (Scholthof et al. 2011). Alexander et al. (2014) fassen die besonderen Charakteristika der Pflanzenviren zusammen. Pflanzenviren sind innerhalb verschiedener Taxa und Ökosysteme weit verbreitet. Umfangreiche Wirtspflanzenkreise, die auch verschiedene Taxa umfassen können, kommen häufig vor. Viren weisen oftmals eine erhöhte Mobilität in der Natur auf, indem sie sich bei der Übertragung verschiedener Vektoren wie Arthropoden, Pilze und Nematoden bedienen. Da Virusinfektionen einen großen Einfluss auf den Ertrag und die Fitness der Pflanze haben können, ist das Verständnis der Epidemiologie von eminenter Bedeutung. Gleichzeitig gilt es aufzuklären, welche molekularen Mechanismen dem Virustransport zu Grunde liegen.

Die systemische Virusinfektion einer Wirtspflanze ist ein sehr komplexer Prozess, der auf balancierten und geordneten Interaktionen von viralen und pflanzlichen Faktoren beruht. Der komplexe virale Replikationszyklus umfasst den Eintritt des Virus in die Pflanze, die En- und Dekapsidierung, die Replikation und Translation, den Kurz- und Langstreckentransport innerhalb der Wirtspflanze sowie das Umgehen der pflanzlichen Abwehr und kann nur durch die vielfältigen Interaktionen mit Wirtsproteinen ermöglicht werden (Brizard et al. 2006, Harries und Ding 2011). Für die Untersuchung von interagierenden Proteinen steht heute ein umfangreiches Methodenspektrum zur Verfügung, mit dem die Analyse von spezifischen Protein-Protein-Interaktionen aber auch des Interaktoms einer Zelle oder eines Organismus bzw. die Suche nach bisher unbekanntem Interaktionspartnern möglich ist. Gängige Methoden sind unter anderem das Hefe Zwei-Hybrid System (*Yeast Two-Hybrid System*, YTHS) und die bimolekulare



Fluoreszenzkomplementation (BiFC). Bis heute konnten mittels dieser Methoden zahlreiche pflanzliche Faktoren identifiziert werden, die den viralen Proteinen als Interaktionspartner dienen.

1.2 Identifizierung von Virus-Virus-/ und Virus-Wirt-Interaktionen mit dem YTHS

1.2.1 Grundlagen der systemischen Infektion einer Wirtspflanze

Jede Pflanzenzelle ist von einer Zellwand sowie i.d.R. einer Kutikula umgeben, die für Pflanzenviren undurchlässig sind. Für eine erfolgreiche Infektion muss diese Barriere überwunden werden (Scholthof 2005). Die Notwendigkeit des Eindringens durch die Zellwand kann umgangen werden, indem eine Übertragung durch Samen und Pollen oder vegetative Vermehrung erfolgt (Drews et al. 2013). Grundsätzlich wird zwischen einer vektoriellen Übertragung durch saugende bzw. stechende Nematoden oder Arthropoden und einer nicht-vektoriellen Übertragung durch mechanische Verletzung oder kontaminiertes Boden- oder Nährwasser unterschieden (Drews et al. 2013). Nach erfolgreichem Eindringen in die Wirtszelle werden die Organellen der Zelle als Replikations- und Ausbreitungsmaschinerie verwendet. Für eine erfolgreiche systemische Infektion muss zunächst der Kurzstreckentransport von der primär-infizierten Zelle in benachbarte Zellen erfolgen. Dazu müssen die Viruspartikel nach der Replikation vom Ort der Replikation zu den Plasmodesmata (PD) und diesen zytoplasmatischen Kanal erfolgreich passieren. Auf diese Weise können verschiedene Gewebe infiziert werden, bis schließlich der Langstreckentransport über das vaskuläre System erfolgt (Tilsner et al. 2014). Bereits 1934 wurde postuliert, dass der Transport des *Tobacco mosaic virus* (TMV) über diese Prozesse erfolgt (Samuel 1934). Inzwischen ist bewiesen, dass die Passage von Pflanzenviren durch spezialisierte virale Proteine, die Transportproteine (*movement* Proteine, MP), kontrolliert wird. Diese vermitteln den Durchtritt von viralen Genomen oder ganzen Viruspartikeln durch die PD als zytoplasmatische Zell-zu-Zell-Verbindungen und die Passage durch das vaskuläre System (Niehl und Heinlein 2011, Harries und Ding 2011, Harries und Nelson 2008, Schoelz et al. 2011).

Die systemische Infektion einer Wirtspflanze erfordert die Fähigkeit des Virus, sich in verschiedene Zelltypen (Mesophyllzellen, Bündelscheidenzellen, Parenchym- und Geleitzellen, Siebelemente) auszubreiten, während der lokale Zell-zu-Zell Transport lediglich epidermale und Mesophyllzellen umfasst. Lediglich 1 bis 15 virale Genome realisieren die Neuinfektion einer benachbarten Zelle (Gutiérrez et al. 2012). Dabei ist die Passage durch die PD der limitierende Prozess. Je nach Typ, pflanzlichem Gewebe und Entwicklungszustand weisen PD unterschiedliche Eigenschaften auf (Lucas und Gilbertson 1994). Zudem besitzen PD einen Durchmesser von ca. 50 nm. Der zytoplasmatische Kanal



weist einen Durchmesser von 3 bis 4 nm auf und erlaubt entsprechend des *Stokes*-Radius die Passage eines etwa 30 kDa globulären Proteins (Tilsner et al. 2014, Lucas und Lee 2004, Lucas und Gilbertson 1994). Die natürliche Konformation bzw. das Größenausschlussvolumen (*size exclusion limit*, SEL) der PD ermöglicht die freie Diffusion von Ionen und kleinen Molekülen wie Metaboliten und Pflanzenhormonen, verhindert aber die Passage größerer Moleküle (Hull 2014, Oparka et al. 1999, Lucas und Wolf 1999). Auch virale Transportkomplexe (virale Ribonukleoproteinkomplexe, vRNP) oder Virionen überschreiten in ihrer Größe das SEL um ein Vielfaches. Isometrische Virionen und vRNP-Komplexe weisen einen Durchmesser zwischen 18 und 80 nm auf. Flexible stäbchenförmige und filamentöse Viren sind lediglich 2,5 bis 15 nm breit, können aber eine Länge bis 2 µm erreichen. Deshalb ist die Modifikation der PD durch die viralen MP für einen erfolgreichen Transport von Zelle zu Zelle essentiell.

Die Vergrößerung des SEL und damit verbunden ein erfolgreicher Transport von Viruspartikeln oder vRNP-Komplexen wird durch verschiedene Strategien innerhalb der Pflanzenviren realisiert. Die zentrale Rolle in der Modifikation der Viruspartikel übernimmt das virale MP. Große Unterschiede gibt es in der Art und der Anzahl der viruskodierten MP sowie der Notwendigkeit der Beteiligung weiterer viraler Proteine. Generell lassen sich zwei Transportstrategien unterscheiden (Niehl und Heinlein 2011, Tilsner et al. 2014) (Abb. 1.1):

Durch MP von Vertretern der Gattungen *Nepo*-, *Como*-, *Alfamo*- und *Tospovirus* wird eine strukturelle Veränderung der PD herbei geführt, indem der Desmotubulus durch eine röhrenartige Struktur aus multimerisierten MP ersetzt wird (*tubule-guided movement*). Die Lokalisation dieser Tubuli erfolgt in Interaktion mit Wirtsproteinen. Tubuli-bildende Viren werden als kleine sphärische Virionen bzw. als vRNP-Komplexe im Falle der Tospoviren (Tilsner et al. 2014) transportiert. Das *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) ist ein Vertreter der Familie *Nepovirus* und wird über tubuläre Strukturen transportiert (Kalašjan et al. 1979, Ritzenthaler et al. 1995). Die Virusreplikation erfolgt am ER, translatierte MPs diffundieren im Zytoplasma und binden schließlich an PD-lokalisierte Proteine (PDLP). An den PD kommt es zur Ausbildung tubulärer Strukturen aus multimerisierenden MP. Virionen werden in die benachbarte Zelle in einem dynamischen Prozess von polarer Assemblierung und Deassemblierung der MP an den Röhren transportiert (Abb. 1.1). Dabei interagiert das MP mit dem C-Terminus der viralen Hüllproteine (Belin et al. 1999). PDLPs 1-8 sind Typl-Transmembranproteine, die den Myosin-abhängigen sekretorischen Stoffwechselweg nutzen, um zu den PD transportiert zu werden (Amari et al. 2010, Amari et al. 2011). PDLP sind entlang der inneren Membran der PD sowie an der Basis der MP-Tubuli lokalisiert. Sie fungieren als Rezeptoren für das MP von GFLV. Sie sind für die Multimerisierung von MP an PD essentiell, da deren Mutation eine defekte Tubulibildung bedingt, die den GFLV-Transport einschränkt (Amari et al. 2010, Amari et al. 2011). Es konnte gezeigt werden,

dass auch weitere MP von Tubuli-induzierenden Viren, wie das *Cowpea mosaic virus* (CPMV), mit den PDLPs *in planta* interagieren (den Hollander et al. 2016).

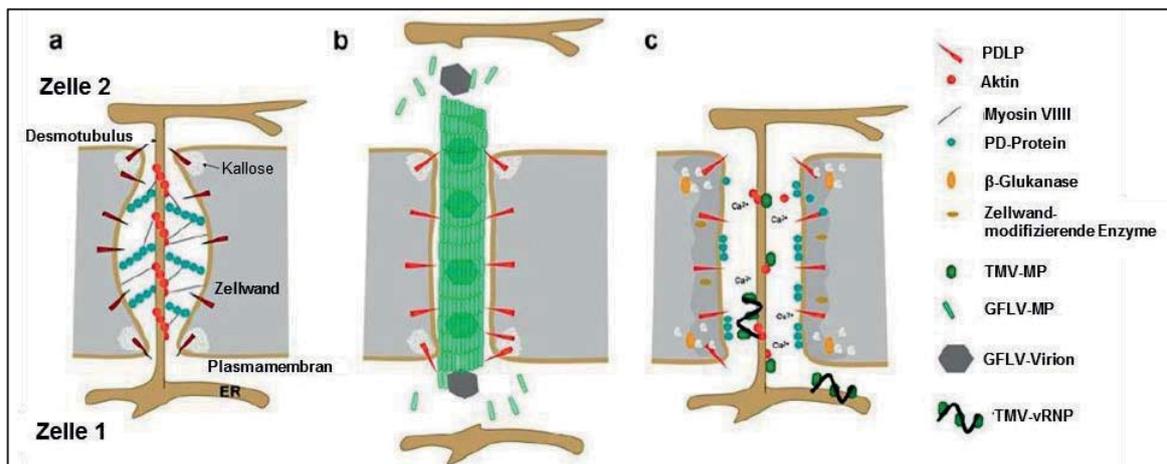


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Modifikation der Plasmodesmata (PD) durch virale Transportproteine (modifiziert nach Niehl and Heinlein 2011). Generell lassen sich zwei Strategien unterscheiden. a) Natürliche Struktur der PD; b) *Tubule-guided movement* am Beispiel des *Grapevine fanleaf virus* (GFLV): Die Transportproteine multimerisieren in tubuläre Strukturen in Interaktion mit den Plasmodesmata-located proteins (PDLPs) und ersetzen den Desmotubulus. Viruspartikel werden entlang der Tubuli durch polare Assemblierung und Deassemblierung von Zelle zu Zelle transportiert. c) *Non-tubule-guided movement* am Beispiel des *Tobacco mosaic virus* (TMV): Um den Transport des vRNP-Komplexes durch die PD zu ermöglichen, bewirkt das TMV-MP die Anlieferung von β -1,3-Glukanase zur Zellwand (ZW). Das Enzym hydrolysiert die glykosidische Bindung der Callose an den PD und führt zu einer Vergrößerung der PD-Pore. Gleichzeitig aktiviert der Ionenstrom über die Plasmamembran (PM) andere ZW-modifizierende Enzyme, die die Starrheit der ZW verringern. TMV-MP rufen die Abtrennung von Aktin hervor, was in der Ablösung der proteinösen PD-Komponenten vom Desmotubulus resultiert.

Die Mehrheit der viralen MP formt keine tubulären Strukturen, so dass die Passage der PD unabhängig davon ist (*non-tubule guided movement*). Vertreter der Gattungen *Tobamo*-, *Diantho*-, *Beny*-, *Tobra*-, *Tombus*- und *Hordeivirus* folgen diesem Mechanismus. Bisher konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden, welche Mechanismen dabei zum Tragen kommen. Der Transport kann in Form von Virionen oder als vRNP-Komplex erfolgen. Das 30 kDa Protein von TMV vermittelt erfolgreich den Transport als vRNP-Komplex und gilt als Modellprotein für diesen Mechanismus. Erste Untersuchungen wurden bereits in den 80er Jahren durchgeführt und halfen bis heute dabei, das Funktionsprinzip der PD und den Molekültransport in der Pflanze zu verstehen (Tomenius et al. 1987, Atkins et al. 1991). Homologe des TMV-MP bilden die 30 K Superfamilie viraler MP (Melcher 2000, Mushegian und Elena 2015). Für Vertreter dieser Familie sind verschiedene gemeinsame Eigenschaften beschrieben. Dazu gehören die Bindung von Nukleinsäuren, die Lokalisation und Akkumulation an den PD sowie die Erhöhung des SEL. Zudem sind 30 K MP in der Lage, in tubuläre Strukturen zu multimerisieren. Trotz dieser gemeinsamen Funktionen weisen die Proteine nur wenig konservierte Bereiche auf. Neben dem Transportprotein sind oftmals weitere viruskodierte Proteine am Transportprozess beteiligt. Zur schnellen



Adaption an neue Wirtspflanzen, Vektoren und sich verändernde Umweltbedingungen ist ein Wechsel zwischen den Transportmechanismen denkbar (Niehl und Heinlein 2011).

1.2.2 Prinzip des YTHS

Das YTHS ist bis heute eine der leistungsfähigsten Methoden, um im lebenden Organismus Protein-Protein-Interaktionen zu detektieren. Ebenso ist es möglich, spezifische Interaktionen bekannter Proteine nachzuweisen und interagierende Proteindomänen zu identifizieren. Die Entwicklung des YTHS basiert auf der Entdeckung, dass eukaryotische Transkriptionsfaktoren (TF) modular aufgebaut sind. Transkriptionsfaktoren, wie Gal4 aus *Saccharomyces cerevisiae*, bestehen aus zwei räumlich und funktionell voneinander unabhängigen Domänen (Ma und Ptashne 1987a, Ma und Ptashne 1987b, Keegan et al. 1986): Die DNA-Bindedomäne (DNA-BD) ermöglicht die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, die sog. *upstream activating sequences* (UAS). Die Aktivierungsdomäne (DNA-AD) dagegen aktiviert durch Bindung an den RNA-Polymerase-II-Komplex die Transkription der abwärts der UAS liegenden Gene. Sowohl DNA-BD als auch DNA-AD sind für die volle Funktionalität essentiell, müssen dafür aber nicht über kovalente Bindungen verknüpft sein. Dass eine Funktionalität auch bei räumlicher Nähe durch nicht-kovalente Rekonstituierung zu Stande kommt, nutzten erstmals Fields und Song (1989) zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Die DNA-BD wird mit einem Protein fusioniert, das charakterisiert werden soll. Dieses Köderprotein (*bait*) wird auf Interaktion mit bekannten oder unbekannt Proteinen untersucht. Diese sog. Beuteproteine (*prey*) sind an die DNA-AD fusioniert. Das ursprüngliche Gal4-basierte System verwendete nur ein einzelnes Reporter gen, *lacZ*, zur Selektion der Protein-Protein-Interaktionen.

In aktuellen Systemen kommt eine Kombination aus mindestens zwei Reporter genen zum Einsatz. Die parallele Expression von zwei Selektionsmarkern setzt eine stabile Transkriptionsaktivierung voraus und minimiert so die Anzahl an falsch-positiven Interaktionen durch Erhöhung der Stringenz der Methode (Brückner et al. 2009). Zum einen werden Auxotrophie-Marker verwendet, die für bestimmte Aminosäure-Biosynthese-Gene kodieren und auf entsprechenden Mangelmedien eine Selektion ermöglichen. Zum anderen kann die Expression von Reporter genen wie *lacZ* oder *gusA* visuell erfasst werden. Interagieren die Fusionsproteine miteinander, entsteht ein rekonstituierter Gal4-TF, der die Expression der Reporter gene aktiviert (Abb. 1.2).