

# Erreger auf Wanderschaft

## Transportproteine verraten pflanzenpathogenen Viren den Weg von Zelle zu Zelle



Prof. Dr. Joachim Schiemann, Leiter der Fachgruppe für Gentechnik und biologische Sicherheit, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft



Dr. Martina Paape, Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universität Rostock



PD Dr. Jan-W. Kellmann, Forschungskordinator und wiss. Referent, Max-Planck-Institut für chemische Ökologie

### Durchtrittspforte durch die Zellwand: Plasmodesmata

Ein Unterschied zwischen Pflanzen und Tieren ist allgemein bekannt: Pflanzen können durch Photosynthese organische Bestandteile ihres Organismus selbst herstellen – Tiere nicht. Ein zweiter Unterschied ist weniger bekannt: Pflanzengewebe bilden ein Syncytium, d.h. alle Zellen sind miteinander in Kontakt, und zwar durch Plasmodesmata, das sind enge, mit Membranen ausgekleidete Kanäle. Plasmodesmata benutzen diejenigen Viren, die Pflanzen als Wirte erschlossen haben, als Eintrittspforten in ihren Wirt. Aber wie?

In den viralen Genomen befinden sich die Leseraster sog. Transport-Proteine, sie sind essenziell für den Durchtritt von viralen Genomen oder verpackten viralen Nukleinsäuren durch die Plasmodesmata. Der Transportmechanismus ist unbekannt, allerdings haben Virusforscher mit Hilfe neuer Techniken Pflanzenproteine aufgespürt, die mit den Transport-Proteinen der Viren interagieren und so – zum Verhängnis der Pflanze – den Viruspartikeln den Weg durch das Gewebe ermöglichen und die Infektion einleiten (Abb. 1).

### TSWV: Ein Transport-Protein, zwei Interaktionspartner

Das viele Pflanzenarten befallende „Tomato spotted wilt virus“ (TSWV), welches im Zierpflanzenbau und in amerikanischen Erdnussplantagen große Schäden anrichten kann, besteht aus einem dreigeteilten RNA-Genom. Die Verteilung der sich darauf befindenden fünf Gene ist denen der tier- und humanpathogenen Erreger aus der Familie der *Bunyaviridae* sehr ähnlich – bis auf einen Unterschied: Das pflanzenbefallende TSWV besitzt ein zusätzliches Cistron, das in befallenen Zellen exprimiert wird (NSm, Abb. 2). Immunologische Untersuchungen zeigten, dass NSm das Transport-Protein ist – es stellt wahrscheinlich die Adaptation der *Bunyaviridae* an Pflanzenwirte dar. Genetische und cytologische Untersuchungen weiterer pflanzenpathogener Viren haben ergeben, dass bis zu fünf Leseraster auf deren Genomen vorhanden sein können, die alle für die systemische Ausbreitung der Erreger im Pflanzengewebe wichtig sind und dabei verschiedene Aufgaben übernehmen können (Abb. 2).



*Arabidopsis*

Die Wechselwirkung von virus- und wirtskodierten Proteinen ermöglicht den Transport von Pflanzenviren vom Infektionsort durch das Blatt bis in die Leitgewebe. Von dort gelangen die Erreger in die Pflanze und lösen Krankheiten aus, die zu starken Ernteverlusten führen können. Als viruskodierte Genprodukte konnten sog. Transport-Proteine identifiziert werden, die den Schlüssel für die Tür von Zelle zu Zelle darstellen. Das Schloss bilden pflanzliche Proteine, die mit den Transport-Proteinen interagieren.

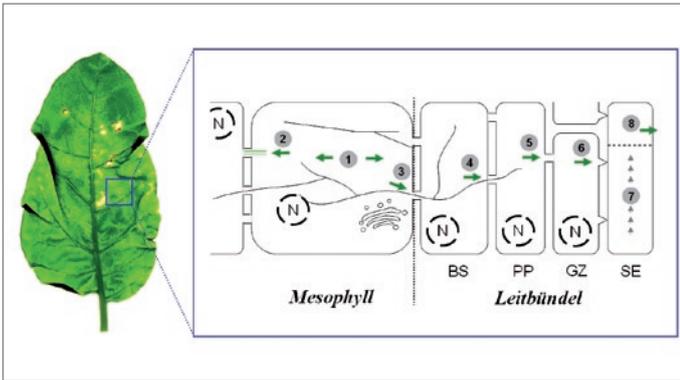


Abb. 1: „Tomato spotted wilt virus“ befallenes Blatt, schematische Darstellung pflanzlicher Mesophyllzellen und Leitgewebe. (1) Intrazelluläre Ausbreitung der Viren in Richtung Plasmodesmata. (2) Systemische Ausbreitung in Mesophyllzellen. (3-6) Passage verschiedener Zelltypen im Phloem: Bündelscheidenzellen (BS), Parenchymzellen (PP), Geleitzellen (GZ) und Siebelemente (SE). In den SE werden Viren wahrscheinlich passiv in unbefallene Gewebe transportiert (7,8). (N): Nukleus. (Bild: S. v. Bargen).

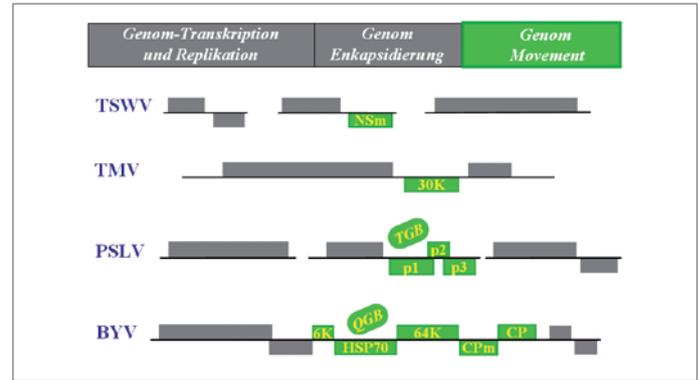


Abb. 2: Kodierung der drei Hauptfunktionen von Pflanzenviren: Replikation, Transkription, Partikelbildung, Transport. Die Zahl der Cistrons, die diese Funktionen kodieren, ist je nach Virustyp unterschiedlich. Am Beispiel der Transport-Protein kodierenden Cistrons (grün) ist ersichtlich, dass ein (TSWV, TMV: Tobacco mosaic virus) bis mehrere (PSLV: *Poa semilatifolia* virus; BYV: Beet yellows virus) Leseraster vorhanden sein können, die die Transportfunktionen bedienen. TGB: triple gene block; QGB: quadruple gene block.

Schon die geringe Anzahl an Genen in Viruspartikeln impliziert, dass in der befallenen Zelle noch Wirtsproteine rekrutiert werden müssen, um Vorgänge wie Replikation, Verpackung und Ausbreitung der Erreger zu ermöglichen. In der ganzheitlichen Sicht, dass Viren nichts anderes als mobile genetische Elemente darstellen (keine Lebewesen im biologischen Sinne sind), ist die Ausnutzung der molekularen Maschinerien ihrer Wirte unabdingbar.

Verschiedene experimentelle Ansätze wurden also gewählt, um pflanzliche Wirtsfaktoren aufzuspüren – mit Erfolg. Ein Ansatz ist die Suche nach Protein-Interaktionspartnern eines viralen Transport-Proteins, beispielsweise mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems. Mit dem TSWV-kodierten NSm-Protein als Köder konnten cDNAs zweier spezifischer Interaktionspartner aus Tomate, Tabak und *Arabidopsis thaliana* isoliert werden [1, 2].

### At-4/1 – Ein Plasmodesma-Protein?

Während sich einer der Interaktionspartner von NSm als Chaperon aus der DnaJ-

Familie, die nachfolgend auch in anderen Virus-Wirt-Interaktionen gefunden wurden, herausstellte, war der zweite Partner, als At-4/1 bezeichnet, im Kabinett funktionaler Genausprägungen in Pflanzen ein Unbekanntes. Daher sollte insbesondere durch Markierung mit dem green fluorescent protein (GFP) herausgefunden werden, wo sich At-4/1 in Pflanzenzellen aufhält. Die Aminosäuresequenz zeigt Verwandtschaft mit Myosin- bzw. Kinesin-ähnlichen Proteinen, was vermuten ließ, dass es sich bei At-4/1 um einen Bestandteil des Cytoskeletts handeln könnte. Bewerkstelligt die NSm-At-4/1-Interaktion den intrazellulären Transport der TSWV-Partikel zu den Plasmodesmata?

Dieses Ergebnis stellte sich nicht ein. Stattdessen lieferte konfokales Laser-Scanning überraschende Bilder: Grün strahlende Punkte an der Zellwand, teilweise gepaart oder, vielleicht bedingt durch Spiegelungen, dreifach [3] (Abb. 3a). Nicht nur diese kortikale Verteilung der Punkte, sondern besonders feinere Analysen machen die Lokalisation von At-4/1 in der Nähe von Plasmodesmata wahrscheinlich.

Die cytologischen Untersuchungen passen zur Hypothese, dass die im Zwei-Hybrid-System gezeigte Interaktion zwischen NSm und At-4/1 funktional sein könnte, d.h. eine Rolle beim Virustransport durch Plasmodesmata spielt. Einen weiteren Hinweis auf die Richtigkeit dieser Annahme lieferten ähnliche Untersuchungen, die wir in Zusammenarbeit mit Moskauer Kollegen mit einem Transport-Protein des *Poa semilatifolia* virus (PSLV) durchführten. Mithilfe der Markierung des Transport-Proteins TGBp3 durch GFP wurde das gleiche Bild erhalten, das auch der pflanzliche Wirtsfaktor At-4/1 lieferte: an den Zellwänden lokalisierte Punkte [4]. Ein aussagekräftiges Experiment war also, beide Proteine, nämlich das viruskodierte Transport-Protein TGBp3 und das pflanzenkodierte At-4/1, in derselben Zelle zu exprimieren und zu schauen, ob beide co-lokalisieren – was tatsächlich der Fall war (Abb. 3b) [3].

### Wirt oder Virus: Wer hat die genetische Information für die Ausbreitung?

Vermutlich haben p3 und At-4/1 spezielle Rezeptoren (in den Nanokanälen der

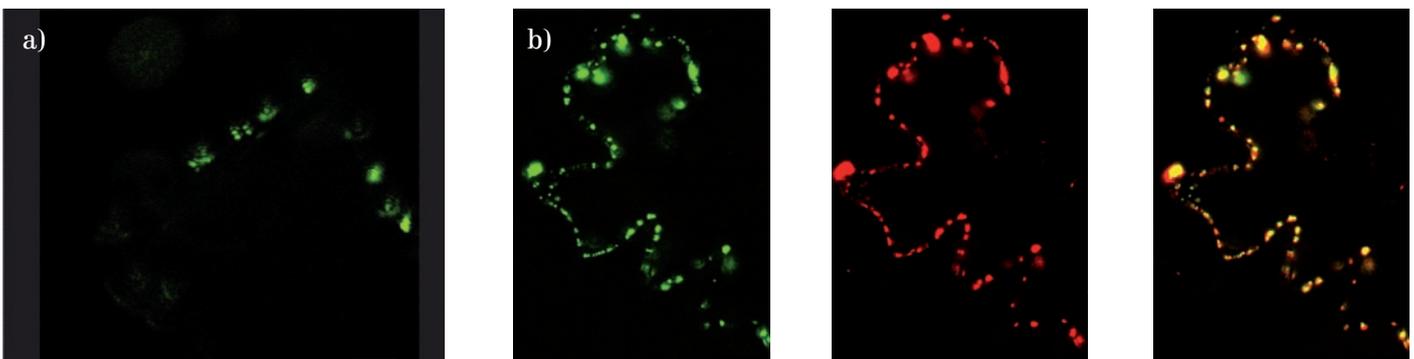


Abb. 3: (a) Epidermiszelle von *A. thaliana*, die nach Partikelbeschluss ein Fusions-Konstrukt aus At-4/1 und GFP exprimiert. Nach wenigen Stunden war GFP-markiertes Protein in kortikalen Bereichen auch in Form von Zwillingkörpern sichtbar. (b) Co-Expression von At-4/1-GFP (grün) und TGBp3-YFP (rot) in Tabak. Im dritten Bild (rechts) sind die beiden ersten Bilder überlagert: Gelbe Punkte zeigen die gleiche zelluläre Lokalisation des Wirts- (At-4/1) bzw. Virus-kodierten Proteins (TGBp3) an.

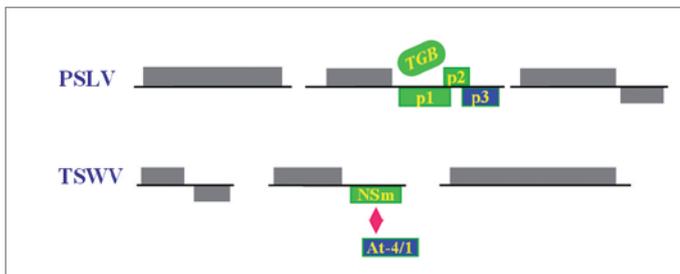


Abb. 4: Genome von PSLV und TSWV: Von den drei im „triple gene block“ (TGB) zusammengefassten Transport-Proteinen (PSLV) bindet p3 wahrscheinlich direkt an Plasmodesmata. NSm, das Transport-Protein von TSWV, birgt keine genetische Information für die Bindung an Plasmodesmata, vollführt aber diese Interaktion indirekt via At-4/1, einem vom Wirt kodierten Protein.

Plasmodesmata?), die den Transport von PSLV (direkt vermittelt via p3) oder von TSWV (indirekt via NSm, das mit At-4/1 interagiert) freigeben. Abbildung 4 schematisiert, dass im Falle von PSLV, das die drei Transport-Proteine p1, p2 und p3 besitzt, letzteres die Funktion des Wirtsfaktors At-4/1 widerspiegeln könnte – wobei die Aminosäuresequenzen von p3 und At-4/1 keine Ähnlichkeiten miteinander haben. TSWV also rekrutiert die Transportfunktion des Wirts mit NSm indirekt via At-4/1, PSLV hingegen direkt via p3.

### Virusausbreitung in der Pflanze: ein noch unerforschter Vorgang

Mit den hier vorgestellten Arbeiten gehen Untersuchungen in Pflanzen zum interzellulären Transport wirtseigener Makromoleküle einher, beispielsweise Transkriptionsfaktoren, die in einer bestimmten Zelle exprimiert und dann sehr spezifisch in angrenzende Gewebe transportiert werden – über Plasmodesmata, die solche „Grenzübertritte“ regulieren können. Viren nutzen diese in der Pflanze ablaufenden Transportprozesse für sich aus – deswegen sind virale Transport-Proteine geeignete Werkzeuge, um die Funktionsweise von Plasmodesmata zu studieren.

### Danksagung

Förderung durch DFG, Land Mecklenburg-Vorpommern,

Volkswagenstiftung, EU (IN-TAS-Programm)

### Referenzen

- [1] von Bargen S. *et al.*: Plant Physiol. Biochem. 39, 1083–1093 (2001)
- [2] Soellick T.R. *et al.*: PNAS 97, 2373–2378 (2000)
- [3] Paape M. *et al.*: Mol. Plant-Microbe Interact. 19, 874–883 (2006)
- [4] Gorshkova E.N. *et al.*: J. Gen. Virol. 84, 985–994 (2003)

Weitere Referenzen bei den Autoren

### Autoren:

**PD Dr. Jan-W. Kellmann**  
MPI für chemische Ökologie, Jena  
**Dr. Martina Paape**  
Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock  
**Prof. Dr. Joachim Schiemann**  
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig

### Kontakt:

**Jan-Wolffhard Kellmann**  
Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena  
Tel.: 03641/57-1000  
jkellmann@ice.mpg.de