

Pathogenitätsfaktor P25 und einem putativen Auxin-induzierbaren Transkriptionsfaktor aus *Beta vulgaris* und deren subzellulärer Ko-Lokalisation

Heike Thiel & Mark Varrelmann

Institut für Zuckerrübenforschung, Holtenser Landstr. 77, 37079 Göttingen, thiel@ifz-goettingen.de; +49 (0) 551 5056271

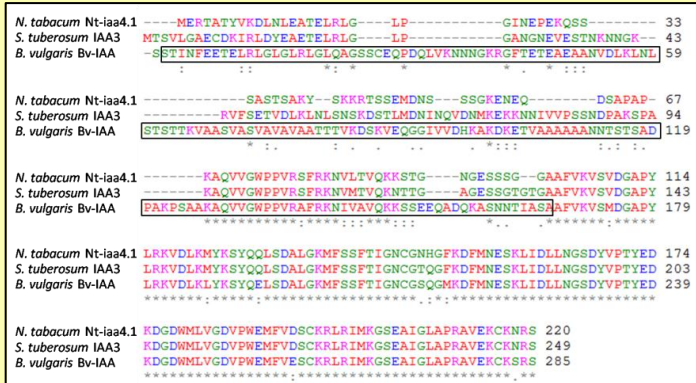


Abbildung 1: ClustalW2 – Aminosäure Sequenzalignment von Bv-IAA mit homologen Sequenzen (identifiziert mittels Blastn) aus *N. tabacum* (Dargeviciute et al., 1989) und *S. tuberosum* (Terrile et al., 2010). In schwarz eingrahmt der ursprüngliche cDNA Klon des Bv-IAA Kandidaten.

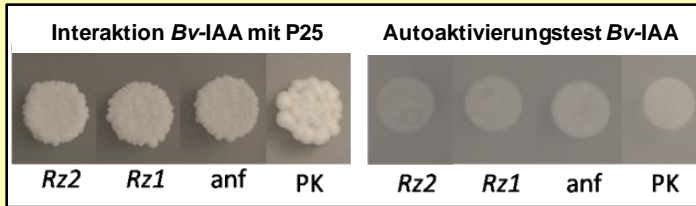


Abbildung 2: LexA-YTH, links: pJG4-5-Bv-IAA-Rz2, -Rz1, -anf mit pEG202-P25. rechts: Test auf Autoaktivierung pJG4-5-Bv-IAA-Rz2, -Rz1, -anf mit pEG202.

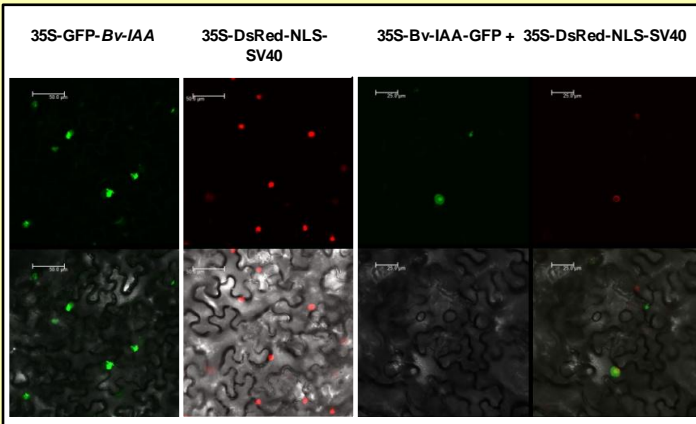


Abbildung 3: Agroexpression von DsRed und GFP Fusionsproteinen in *N. benthamiana* Epidermiszellen. Überprüfung der Kernlokalisierung des Kandidaten Bv-IAA mit DsRed-NLS-SV40 nach 3dpi mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM).

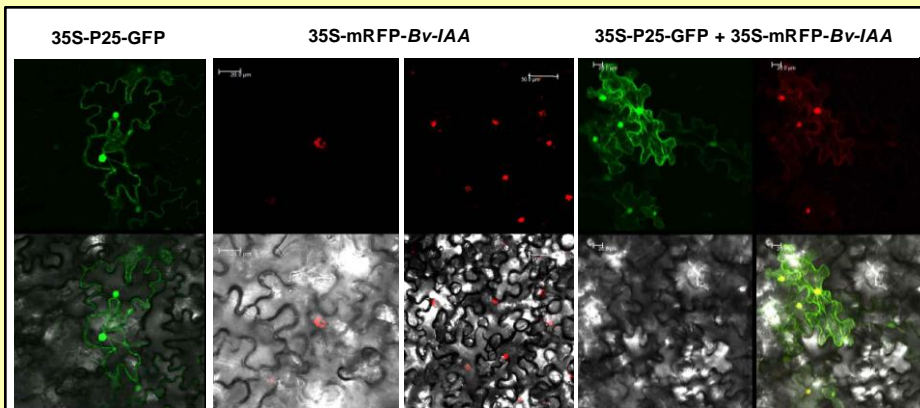


Abbildung 4: Agroexpression von mRFP und GFP Fusion proteinen in *N. benthamiana* Epidermiszellen. Überprüfung der subzellulären Ko-Lokalisation des Kandidaten Bv-IAA mit P25 nach 3dpi mittels CLSM.

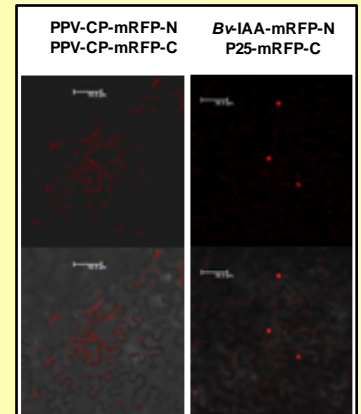


Abbildung 5: Bestätigung der Interaktion zwischen P25 und Bv-IAA mittels BiFC nach 3dpi. links: Positivkontrolle, rechts: Interaktion Bv-IAA und P25

Im Rahmen einer YTH-Interaktionsstudie (LexA) zwischen dem Pathogenitätsfaktor P25 des BNYVV und einer cDNA Bibliothek einer resistenten Zuckerrübenlinie, wurde ein cDNA Klon (Bv-IAA) mit hoher Homologie zu „Auxin induzierbaren Transkriptionsfaktoren“ identifiziert (Abb. 1). Dieser Kandidat wurde mit Hilfe der Genvorhersage und der cDNA Sequenzierung (pers. Mitteilung H. Himmelbauer, CRG, Barcelona) als fast vollständige Sequenz mittels RT-PCR aus resistenten und anfälligen Linien amplifiziert und auf Interaktion mit P25 erfolgreich im „Yeast-two hybrid“ bestätigt (Abb. 2). Des Weiteren wurde mittels der Pfam Proteindatenbank die konservierte Proteindomäne Aux-iaa im Bereich Aminosäure 4-277 identifiziert.

Wie zu erwarten, zeigt der Bv-IAA Kandidat in Agrobakterium vermittelter transienter Expression (basierend auf fluoreszenzmarkierten Fusionsproteinen, 35S-GFP-Bv-IAA) eine Lokalisation im Zellkern von *N. benthamiana* Epidermiszellen. Diese Kernlokalisierung konnte durch die Ko-Expression mit kernlokalisiertem DsRed (PKKKRKV, NLS-SV40) bestätigt werden (Abb. 3). Dabei wurde gezeigt, dass Bv-IAA sich spezifisch im Zellkern (in inhomogener Verteilung) aufhält, wohingegen DsRed-NLS-SV40 den gesamten Zellkern lokalisiert (Abb. 3).

In Ko-Expressionsuntersuchungen mit BNYVV P25 wurde eine Ko-Lokalisation und eine Re-Lokalisation von Bv-IAA in Tabak gezeigt. Wie beschrieben (Vetter et al., 2004), ist P25 mit einem NLS und NES ausgestattet und im Cytoplasma wie auch im Zellkern nachweisbar. Durch P25 kommt es durch direkte oder indirekte Effekte zu einer Re-Lokalisation von Bv-IAA ins Cytoplasma (Abb. 4). Ob es sich bei der Re-Lokalisation von Bv-IAA um Import oder Exportprozesse handelt, kann bisher nicht ausgesagt werden.

Um einerseits die YTH Interaktion *in planta* zu bestätigen und den subzellulären Ort der Interaktion zu bestimmen, wurde ein „Bimolecular fluorescence complementation“ (BiFC) System (zur Verfügung gestellt von AG E. Maiss, Universität Hannover) ausgewählt. Der Nachweis von BiFC Fluoreszenz im Nukleus (Abb. 5) stellt den *in planta* Nachweis der Interaktion dar und deutet darauf hin, dass P25 möglicherweise Bv-IAA aus dem Kern exportiert. Weitere Arbeiten unter Nutzung von NLS-Defektmutanten des P25 müssen diese Hypothese bestätigen.

Im Rahmen dieser durchgeführten Analysen sind keine Polymorphismen auf Nukleotid- oder Proteinebene zwischen resistenten und anfälligen Zuckerrübenlinien für den Kandidaten Bv-IAA gefunden worden. Des Weiteren sind genaue Funktionen von Auxin responsiven Genen nicht vollständig bekannt. Abschließend lässt sich aus den hier dargestellten Untersuchungen ableiten, dass zwischen P25 und Bv-IAA eine direkte Interaktion stattfindet und somit eine Wirkung auf den Auxinmetabolismus anzunehmen ist. Final wird vermutet, dass durch diese Interaktion der typische Rizomania-Wurzelbart mit vermehrter Seitenwurzelbildung induziert werden könnte.